



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS

**“EVALUACIÓN DE TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS ACOPLADAS A
MASAS PARA LA DETERMINACIÓN DE 9,10
FENANTRENOQUINONA”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN DISEÑO MOLECULAR Y NANOQUÍMICA

PRESENTA:

ATZIMBA MABEL SALGADO TORRES

DIRECTOR DE TESIS

DR. MARIO ALFONSO MURILLO TOVAR

CUERNAVACA, MORELOS

NOVIEMBRE, 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS



Control Escolar de Licenciatura

VOTOS DE APROBATORIOS

Secretaria ejecutiva del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
P r e s e n t e .

Por medio de la presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó la C. **SALGADO TORRES ATZIMBA MABEL** con número de matrícula **20154012938** cuyo título es:

“Evaluación de técnicas cromatográficas acopladas a masas para la determinación de 9,10 Fenantrenoquinona”

Consideramos que **SI** reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **LICENCIADO EN DISEÑO MOLECULAR Y NANOQUÍMICA**.

Cuernavaca, Mor a 26 de octubre del 2021

Atentamente
Por una universidad culta

Se adiciona página con la e-firma UAEM de los siguientes:

DR. ISMAEL LEÓN RIVERA
DR. JORGE ANTONIO GUERRERO ÁLVAREZ
DR. MARIO ALFONSO MURILLO TOVAR
DRA. IRIS JANET MONTOYA BALBAS
DR. JOSÉ DE JESÚS DÍAZ TORRES

PRESIDENTE
SECRETARIO
VOCAL
PRIMER SUPLENTE
SEGUNDO SUPLENTE

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JORGE ANTONIO GUERRERO ALVAREZ | Fecha: 2021-10-26 16:36:37 | Firmante

XxOfx6GD+Xt+mzROi6697fLuWHihv89iGk.J4GdlVQNWfNy3vmqF+CLX3VAKGrUI70+ttWWWJiS+ueaLukgEGwRwrEhIXBd9qnfZvE6zTpZTPP8RVhWtLjxTC4jjiJgm6lk68tbP8S/sN
YSX9zwWMNAnjy6k1PTVNghRelc25+e02AENjkPOsn6EIOXwnu8scDacWlJnUOGqpAOjzqJmjThvkf+5NejL4DYNNUdN3xcaR4JMHQyKGIxS.JqMSRwjsKOV09hWvxZFE1ul0i9
JB00/+aPHre4p6o/Xyd04FdtSCekSGJTIDx7H1NIW/YbfZa3cJkKTPAWZ4lxOccdHnGP0+Q==

MARIO ALFONSO MURILLO TOVAR | Fecha: 2021-10-26 17:39:23 | Firmante

A5mep2CqmNhf5f5CmZBmad/WHY4P8sWssc82kj/UNHz+9uuWsXovLk3FTnG7mZ/mAIPLOwf255Y/B+DVdxpob7L17FPB0A3uQ+BPTYNn7vOlrzp2KC9PujvihmULS8oBtlxZ+
KtC2DieU/vUDTIKoOIGXbWcGKQT41J6+yDmDPDeVQIM+ice86v4mRK/kZoStkVFn68xWf8UdOHRfBKnsPTIjyRyRk1ozRHcJacJWw04oRUBXCeHfPI2OReRh3fAXJfNaOIO
E2ogskr+0fuT/6rvFWD0MahFaia3DySQywMMBHAn3xfVlwgJjRaSXznM83DFSNMVTIEIIH7QAEaQ==

ISMAEL LEON RIVERA | Fecha: 2021-10-26 18:00:49 | Firmante

gMnBBYcmVmfWwTmu8bXQ/hTJpBQ5p060gqzAcu4gPiUU9EhTB7ajuPcSbLXHxbljYxg4m7I63VdovKfMy8jhsqFVV4ELLQdAlJTdKs7XZK0RADHy5TY1f5kCohROdRVBg+OBk
Gm32LfsS/ZEK3ORKwMH8GUvugZwLmZSCgAAqvmh1/xDgNVIPDKP+s3yLAheFnGawWLPQhMYlw37ykNS4CJ4QEwz+Y73YIXbnLpbeJpfsn2vRPfmSljXeWm5f/xeo2IBN03xo
0uo19zQ7d17Xg5wp5J+k5t517sJyJI6YDYbSy4Tz3WSWQAjF7/T1K3LUPjdlng35wSx4bcLG/31Q==

JOSÉ DE JESÚS DÍAZ TORRES | Fecha: 2021-10-29 20:20:44 | Firmante

PwaBUWBIEeYigaP7iR55O6XKQEMd0/n/8xaAwqzAbExsBh+8x+xl1VkXZF31bf1g/qAnywABYiQ6zf15KphfXvJB+tzJe+OriUIVJG8j9bhQs/PpYUz6mW51oFOZDn1G0hXi4ffVn50Q
wPt6+H9y7zYwGiJClaxItP0pn/YsPIBujw359AF9eiyXT9CTvnEBkKnt1E7q+pazZ15Dy20Zn2rEoc03VXL54PAc7DuPkp1/vZHBbE8ec8tOCuKDhlez5/ubLcQb+yIXLsyBy/OloamI
WRTSHBrnSNGpOzOfbV098oaDh7vH4GXL9qtGLF3LZM/TShhZ2IAj9YsvRP1BA==

IRIS JANET MONTOYA BALBAS | Fecha: 2021-11-05 16:56:07 | Firmante

NATL0cgkE61SY9aCqy09UFUwloQU02Bkb659ZVLraYP7iVw2trXIOisgvtRK57+I4TrKbuJaHv/PM1bfJv2OS2U1KJ2zQtctTsFpjXWC5SZhr+wiwecul5lualmtOCniiDszPPD0YcO
AZIyY6KODbKPKZKClvgQaKHfUaR62oPhPxSbKIX7j3O9/1EQHrgCHc2ysJHNyyYnTTIhOuWmUPoUH6Jex35TzaG6+4LXLarj6HXQ3PLPuAj3sQe5yCt2oc0qG5CH7bQuQjnw0B
uH9KqGe206JU1/+TBDTWo4XjKnlb8W3pG675qmJ3JBIJvIb50zVQavVQ27Ss74mO3P/g==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



b6j0UMfLk

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/PSOnAmzw2FfMTKYa3AnlnsDD2CBMvngf>

AGREDECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma del estado de Morelos por permitirme culminar mis estudios de licenciatura

Al Centro de investigaciones químicas por su apoyo a lo largo de la carrera.

A mi director de Tesis, Dr. Mario

Por todas sus enseñanzas y aprendizajes formando parte de su grupo de trabajo, por su paciencia y el tiempo dedicado, pero sobre todo por la confianza brindada, por impulsarme a dar lo mejor de mí, así como por sus consejos académicos

A mi comité tutorial

Por sus sabios consejos que me guiaron durante este proceso, su apoyo y sus palabras que me brindaron para dar lo mejor de mí, mi profunda admiración por su compromiso, su nivel de profesionalidad y su sencillez como personas.

A mi familia

Por todo su apoyo y amor durante toda mi vida y este proceso, gracias por sus palabras de aliento para poder llegar hasta

A mis amigos

Por apoyarme en esta etapa, y por todos esos grandes momentos que vivimos juntos y en especial a los que estuvieron conmigo en los momentos más difíciles.

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a mis padres por todo su apoyo, comprensión y paciencia, sin ustedes no habría llegado hasta en donde estoy en estos momentos, gracias por acompañarme a lo largo de toda mi vida y estar conmigo en todos los momentos más importantes. Mi profunda admiración para ustedes por todo lo que han logrado y tantos sacrificios que han hecho para que tenga lo mejor. Gracias por todas esas enseñanzas de vida, por no dejar que me diera por vencida; a mis hermanos por su apoyo y todo el amor que me han dado, por estar conmigo esos momentos tan especiales, hacer que todo fuera más alegre y feliz en este proceso; y a mis abuelitos por darme su amor y comprensión en todo momento.

El presente trabajo se realizó en el Centro de investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (CIQ-UAEM) en el laboratorio 313, bajo la dirección del Dr. Mario Alfonso Murillo Tovar.

RESUMEN

La 9,10-Fenantrenoquinona (9,10-FQ) es un compuesto de interés toxicológico ya que se ha encontrado que puede ser nocivo para el ambiente y la salud humana, se ha reportado que su inhalación puede causar inflamaciones en las vías respiratorias, alergias, asma y cáncer a largo plazo, sin embargo, su monitoreo y regulación se ha dificultado por que la determinación de esta molécula en compartimientos ambientales representa un desafío analítico debido principalmente a que se encuentra en concentraciones traza y dentro de una mezcla química compleja de otros numerosos componentes que pueden sesgar su identificación y cuantificación. En este trabajo se realizó una investigación bibliográfica con el propósito de revisar distintos métodos cromatográficos acoplados a espectrometría de masas y otros detectores que han sido aplicados o podrían ser de utilidad para la identificación y cuantificación de la 9,10-FQ en muestras ambientales, principalmente en aire urbano.

En este mismo documento se presentan y se integran, dentro de la discusión, resultados obtenidos a través ensayos de laboratorio preliminares, con disoluciones estándares de la quinona, utilizados para observar el efecto de la temperatura de inyección en cromatografía de gases y el funcionamiento y utilidad de la espectrometría de masas en impacto electrónico y ionización química para confirmar la estructura de la molécula. La investigación bibliográfica muestra que hay distintos métodos para la determinación de esta y otras quinonas, se encontró que los parámetros que más difieren entre técnicas son la sensibilidad, resolución y sencillez. A pesar de las limitaciones entre métodos propuestos tanto en cromatografía de gases como en líquidos, la 9,10-FQ se ha determinado en muestras de aire en distintos países, sin embargo, hay todavía discrepancia por el uso de la derivatización en cromatografía de gases. Entre los métodos más promisorios, se resaltan aquellos que involucran ionización química e incluyen espectrometría de masas tándem en particular por el grado de selectividad que se podría alcanzar.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN	1
1.2. OBJETIVOS	4
1.2.1. <i>General</i>	4
1.2.2. <i>Específicos</i>	4
2. MARCO TEÓRICO	5
2.1. QUINONAS	5
2.2. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS IMPORTANTES PARA SU ANÁLISIS	6
2.3. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS IMPORTANTES DE SU PRESENCIA EN EL AMBIENTE	8
2.4. ORIGEN Y FORMACIÓN	8
2.5. EFECTOS A LA SALUD	11
2.6. ANÁLISIS TÉRMICO	15
2.6.1. <i>Análisis termogravimétrico</i>	15
2.6.2. <i>Calorimetría diferencial de barrido</i>	16
2.7. DERIVATIZACIÓN	16
2.7.1. <i>Alquilación</i>	18
2.7.2. <i>Acilación</i>	18
2.7.3. <i>Sililación</i>	18
2.8. FUNDAMENTOS DE LAS TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS	19
2.8.1. <i>Cromatografía de gases</i>	20
2.8.2. <i>Cromatografía de líquidos</i>	21
2.9. ESPECTROMETRÍA DE MASAS	26
2.9.1. <i>Fuentes de ionización</i>	28
2.9.2. <i>Analizadores de masa</i>	32
2.10. ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM	35
2.10.1. <i>Triple cuadrupolo</i>	37
2.10.2. <i>QTOF</i>	38
3. METODOLOGÍA	40
3.1. INVESTIGACIÓN BIBLIOGRÁFICA	40
3.1.1. <i>Diseño y estrategia de búsqueda</i>	40
3.1.2. <i>Criterios de inclusión y exclusión</i>	40
3.1.3. <i>Extracción de datos</i>	41
3.1.4. <i>Análisis de datos</i>	41
3.2. SECCIÓN EXPERIMENTAL	41
3.2.1. <i>Acondicionamiento de material</i>	41
3.2.2. <i>Preparación de muestras de trabajo</i>	42
3.2.3. <i>Análisis instrumental</i>	43
3.2.4. <i>Optimización de condiciones</i>	44
4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS DE INVESTIGACIÓN BIBLIOGRÁFICA Y TRABAJO EXPERIMENTAL	46
4.1. ESTABILIDAD Y ANÁLISIS TÉRMICO	46
4.2. DERIVATIZACIÓN DE LA 9,10-FENANTRENOQUINONA	48

4.3.	<i>Fuentes de ionización</i>	53
4.3.1.	<i>Para CG-EM</i>	53
4.3.2.	<i>Para CL-EM</i>	55
4.4.	DETERMINACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE GASES	56
4.5.	CG-EM/EM	68
4.6.	DETERMINACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS	69
4.7.	CL-EM/EM	77
5.	PROPUESTA DE PROTOCOLO DE ANÁLISIS	82
6.	CONCLUSIONES	83
7.	PERSPECTIVAS	84
	BIBLIOGRAFÍA	85
	ANEXOS	93
	ANEXO A: PROPIEDADES QUÍMICAS DE 9,10-FENANTRENOQUINONA Y SU PRECURSOR	93
	ANEXO B: CÁLCULOS PARTE EXPERIMENTAL	94
	ANEXO C: ANÁLISIS CG-EM (EQUIPO DE TRIPLE CUADRUPOLO, USANDO MODO SIMPLE)	95
	ANEXO D: ANÁLISIS CG-EM	98
	ANEXO E: PRODUCTOS ACADÉMICOS	99
	ANEXO F: CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	112

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ESTRUCTURA DE LA 9,10 FENANTRENOQUINONA	7
FIGURA 2. SÍNTESIS DE LA 9,10-FENANTRENOQUINONA A PARTIR DEL FENANTRENO (CANNON 2019)	9
FIGURA 3. SÍNTESIS DE 9,10-FENANTRENOQUINONA A PARTIR DE 2,2'-BIFENIL DICARBOXIBENZALDEHÍDO (HAWTHORNE 1963)	9
FIGURA 4. PROPUESTA DE FORMACIÓN FOTOQUÍMICA (JONT BARBAS 1996)	10
FIGURA 5. CICLOS REDOX DE 9,10-FQ PARA LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS) (YANG 2018)	13
FIGURA 6. EFECTOS TÓXICOS Y LA CITOPROTECCIÓN QUE OFRECE EL QUELANTE INTRACELULAR DE METALES OP (SUGIMOTO 2005)	13
FIGURA 7. MODELO PROPUESTO DE LA FORMACIÓN DE SUPERÓXIDO DURANTE EL CICLO REDOX DE FENANTRENOQUINONA EN CORAZÓN DE CERDO (SHIMADA 2004)	14
FIGURA 8. ESQUEMA DE UN CROMATÓGRAFO DE GASES (CALZADA S.F.)	20
FIGURA 9. ESQUEMA DE UN CROMATÓGRAFO DE LÍQUIDOS	22
FIGURA 10. DIAGRAMA DE JABLONSKI	26
FIGURA 11. DIAGRAMA DE BLOQUES DE LOS COMPONENTES DE UN ESPECTRÓMETRO DE MASAS	27
FIGURA 12. ANALIZADOR SECTOR MAGNÉTICO	33
FIGURA 13. ESQUEMA DE FUNCIONAMIENTO DE UN CUADRUPOLO	34
FIGURA 14. ESQUEMA DE UN ANALIZADOR TOF	35
FIGURA 15. ESQUEMA GENERAL DE UN SISTEMA EM/EM (FERNÁNDEZ-LAINEZ 2009)	36
FIGURA 16. DIAGRAMA DE UN SISTEMA DE TRIPLE CUADRUPOLO	38
FIGURA 17. ESQUEMA DE UN SISTEMA QTOF	39
FIGURA 18. ESQUEMA DE LA PREPARACIÓN DE LAS DISOLUCIONES DE TRABAJO	42
FIGURA 19. A) SISTEMA DE CROMATOGRFÍA DE GASES (CG) 7890B (AGILENT TECHNOLOGIES) ACOPLADO A UN ESPECTRÓMETRO DE MASAS TRIPLE CUÁDRUPLO (QQQ) 7000D (AGILENT TECHNOLOGIES); B) SISTEMA DE CROMATOGRFÍA DE GASES (AGILENT TECHNOLOGY) 6890 ACOPLADO A UN DETECTOR DE MASAS 5973 N, EN UN MODO DE IONIZACIÓN POR IMPACTO ELECTRÓNICO	43
FIGURA 20. ESPECTRÓMETRO DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN JMS-700 JEOL (SECTOR MAGNETICO)	44
FIGURA 21. RAMPA DE TEMPERATURA PARA LAS PRUEBAS DE INYECCIÓN	45
FIGURA 22. CURVAS SIMULTÁNEAS DE TGA-DSC DE LA 9,10 FENANTRENOQUINONA (SOUSA 2012)	47
FIGURA 23. INYECCIONES SUCESIVAS DE SOLUCIONES DE QUINONAS (SOUSA 2012)	47
FIGURA 24. DERIVATIZACIÓN 9,10-FENANTRENOQUINONA (CHO 2004)	49
FIGURA 25. REACCIÓN DE DERIVATIZACIÓN REDUCTIVA ONE-POT CON TRIMETILSILIL SOBRE HAPQ´S (TORIBA 2016)	50
FIGURA 26. REACCIÓN QUÍMICA DE CARBONILOS CON PFBHA PARA FORMAR SUS CORRESPONDIENTES ISÓMEROS DE OXIMA (JAKOBER 2005)	50
FIGURA 27. ESQUEMA DE REACCIÓN PARA LA DERIVATIZACIÓN POR FLUORESCENCIA DE FQ CON BENZALDEHÍDO Y ACETATO DE AMONIO (KISHIKAWA 2004) (KISHIKAWA 2006)	51
FIGURA 28. ESTRUCTURA SUGERIDA DEL DERIVADO FLUORESCENTE OBTENIDO POR LA REACCIÓN DE PQ CON 2-ATHP (KISHIKAWA 2010)	52
FIGURA 29. ESPECTRO DE MASAS DE 9,10 PQ; CON UNA TÉCNICA DE IMPACTO ELECTRÓNICO 70eV	53
FIGURA 30. FRAGMENTOS PROPUESTOS DEL ANÁLISIS DE 9,10-FQ	54
FIGURA 31. CROMATOGRAMA EN UN MODO DE IONIZACIÓN QUÍMICA (+)	55
FIGURA 32. CROMATOGRAMA DEL ESTÁNDAR DE LA 9,10-FQ OBTENIDO CON UNA TEMPERATURA DE INYECCIÓN DE 210°C	57
FIGURA 33. ESPECTRO DE MASAS EXTRAÍDO DEL CROMATOGRAMA CON UN TEMPERATURA DE INYECCIÓN DE 210°C A UN TIEMPO DE RETENCIÓN DE 6.195 MIN	57
FIGURA 34. FRAGMENTACIÓN DEL TOLUENO (EGE 2000)	57

FIGURA 35. BLANCO DE TOLUENO INYECTADO A UNA TEMPERATURA DE 170°C	58
FIGURA 36. COMPARACIÓN DEL A) ESPECTRO DE MASAS DE LA BIBLIOTECA NIST Y B) ESPECTRO DEL ESTÁNDAR DE 9,10-FQ OBTENIDO	59
FIGURA 37. CROMATOGRAMA DEL ESTÁNDAR DE 9,10-FQ OBTENIDO CON UNA TEMPERATURA DE INYECCIÓN DE 170°C	59
FIGURA 38. 9,10-FQ SIN DERIVATIZAR	61
FIGURA 39. 9,10-FQ DERIVATIZADA	62
FIGURA 40. CROMATOGRAMAS DE UNA MEZCLA DE QUINONAS: A) FORMA NO DERIVATIZADA (18 MG/L) Y B) FORMA DERIVATIZADA ACETILADA (19 MG /L).	67
FIGURA 41. ESPECTROS EM/EM DE IONES [M] ⁺ DE 9,10-FQ DERIVATIZADA	69
FIGURA 42. CROMATOGRAMAS A) BLANCO DEL REACTIVO, B) SOLUCIÓN ESTÁNDAR DE 9,10 FQ DERIVATIZADA, C) EN EL EXTRACTO DE PARTÍCULAS DE AIRE, D) PARTÍCULAS EN EL AIRE ENRIQUECIDA CON ESTÁNDAR.	71
FIGURA 43. CROMATOGRAMA DE 9,10-FQ DERIVATIZADA EN EL EXTRACTO DE PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN (KISHIKAWA 2004)	72
FIGURA 44. CROMATOGRAMAS DE A) BLANCO DE REACTIVO, B) SOLUCIÓN ESTÁNDAR DE 10 PMOL / INYECCIÓN DE 9,10-FQ DERIVATIZADA Y C) 9,10-FQ DERIVATIZADA EN EL EXTRACTO DE PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN EN EL AIRE. (KISHIKAWA 2011)	73
FIGURA 45. CROMATOGRAMAS DE LA 9,10-FQ A) ESTÁNDAR DERIVATIZADA, B) DERIVATIZADA EN EL EXTRACTO DE PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN Y B) SIN REACCIÓN DE DERIVATIZACIÓN POSTERIOR A LA COLUMNA (KISHIKAWA 2010)	75
FIGURA 46. CROMATOGRAMAS IÓNICOS CL-TOFMS DE UNA SOLUCIÓN ESTÁNDAR DE NPAH Y OPAH CON APCI EN MODO DE IONES NEGATIVOS (MIRIVEL 2010)	76
FIGURA 47. CROMATOGRAMA DE 9,10-FQ Y SU METABOLITO	77
FIGURA 48. ESPECTROS EM/EM DEL ION [M+H] ⁺ DEL ESTÁNDAR 9,10-FQ OBTENIDO DE LOS ESTÁNDARES CORRESPONDEN A 50 PMOL /INYECCIÓN	80

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: TIPOS DE REACCIONES DE DERIVATIZACIÓN	17
TABLA 2: CONDICIONES DE MONITORIZACIÓN DE IONES SELECCIONADOS PARA LA 9,10-FQ	61
TABLA 3: COMPARACIÓN DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN DE LA 9,10-FQ DERIVATIZADA Y NO DERIVATIZADA	61
TABLA 4 : CONCENTRACIÓN DE 9,10-FQ QUINONA (µG/G) EN DEP	61
TABLA 5: CONCENTRACIONES EXPERIMENTALES DE 9,10-FQ	63
TABLA 6: CONDICIONES DE MONITORIZACIÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE 9,10-FQ	64
TABLA 7: CIFRAS PARA LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO PROPUESTO	65
TABLA 8: RECUPERACIÓN DE 9,10-FQ EN MUESTRAS DE AGUA	65
TABLA 9: RESULTADOS OBTENIDOS CON SOLUCIONES ESTÁNDAR DE LA 9,10-FQ Y SUS DERIVADOS	66
TABLA 10: RESULTADOS DEL ANÁLISIS 9,10-FQ DE LAS MUESTRAS AMBIENTALES EN LA FORMA DERIVATIZADA ACETILADA Y NO DERIVATIZADA	68
TABLA 11: CONCENTRACIÓN (NG/G1) DE 9,10-FQ	75
TABLA 12: IONES UTILIZADOS PARA LA DETECCIÓN DE 9,10-FQ EN EM/EM CON MODO APCI POSITIVO	78
TABLA 13: PARÁMETROS PARA MONITORIZACIÓN PARA LA DETECCIÓN EN EM-EM CON INTERFAZ APCI	78
TABLA 14: LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN PARA EL MÉTODO CL-APCI-EM-EM CON IONIZACIÓN NEGATIVA O POSITIVA DE LA 9,10-FQ	79
TABLA 15: 9,10-FQ A: MEDIDA DURANTE 24 HORAS, B: MEDIDA DURANTE EN DÍA, C: MEDIDA DURANTE LA NOCHE	80

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes y Justificación

La 9,10-Fenantrenoquinona (9,10-FQ) es una sustancia de interés toxicológico muy importante, ya que se encuentra con frecuencia en el ambiente y particularmente en las atmosferas urbanas. En general, las quinonas son compuestos altamente reactivos y tóxicos, capaces de incrementar el estrés oxidativo celular al elevar las concentraciones de peróxido de hidrógeno intracelular, por eso se considera que esta quinona en el medio atmosférico puede estar implicada en el desarrollo de padecimientos respiratorios. En comparación con su precursor, el fenantreno, se ha reportado que la inhalación de la 9,10-FQ causa varias enfermedades como inflamaciones en las vías respiratorias, alergias, asma y puede causar cáncer a largo plazo (Yoshito 2002) también se ha sustentado posibilidades de modificar la replicación del ADN por estrés oxidativo (Hernández 2016) (Chesis 1984) y actuar como inhibidor de enzimas (Kumagai 1998). Se ha demostrado que desarrolla efectos citotóxicos tanto *in vitro* como *in vivo* (Yang 2018), además en estudios biológicos se ha reportado que la toxicidad específica de la cepa de 9,10-FQ puede resultar del estrés oxidativo (Tukaj 2007). También se sospecha que es un agente genotóxico de la fracción orgánica del material particulado del escape de diésel, por otro lado, se han reportado rutas de biotransformación mediante bacterias para conocer sus productos, lo cual fue favorable si consideramos que en el suelo se podría degradar naturalmente (Kanaly 2013).

En el aire ambiente, este compuesto proviene de la fotoxidación de la posición 9 y 10 del fenantreno (un contaminante ambiental común perteneciente a los hidrocarburos aromáticos policíclicos, HAPs), involucrando un proceso de fotólisis. Estudios de formación sugieren que las reacciones diurnas del fenantreno en fase gaseosa son iniciadas por OH^\cdot y durante la noche iniciadas por NO_3^- , estos pueden ser fuentes significativas de esta quinona en atmósferas ambientales (Wang 2007). Puede ser también emitida directamente por combustión incompleta de combustibles fósiles, en áreas urbanas se atribuye principalmente a los motores que

usan gasolina, diésel y algunos otros combustibles (Yang 2018) incluso se reporta que se encuentra en el aire de arenas petrolíferas (Wnorowski 2017).

La determinación de la 9,10-FQ en muestras biológicas y ambientales es de suma importancia para evaluar su presencia y proponer acciones destinadas a controlar sus niveles en el ambiente. Aunque el riesgo que representan para la sostenibilidad de ecosistemas y la salud humana es alta, esta quinona es todavía escasamente estudiada. Una de las principales razones es que se encuentran en niveles traza, lo cual implica un reto mayor para su extracción y análisis, ya que los compartimentos ambientales y en particular el aire que respiramos contiene una mezcla químicamente muy compleja que dificulta su separación de la matriz de la muestra y su identificación entre otras numerosas sustancias

Los precursores (los HAP) de las quinonas se regulan, monitorean y analizan de manera cotidiana en el ambiente, sin embargo, son todavía escasos los estudios que informen sobre concentraciones ambientales de quinonas. Debido principalmente a las bajas concentraciones y su inestabilidad se sabe relativamente poco sobre sus niveles en muestras de aire ambiental (EPA 1999; Wnorowski 2017; Kishikawa 2006; A. E. Fernandez 2008). La principal razón de su inestabilidad es que estas moléculas contienen grupos carbonilos. El análisis de este grupo funcional, en cromatografía de gases es frecuentemente limitado por la naturaleza polar, reactiva y semivolátil de estos compuestos.

Entre las distintas técnicas que se han empleado para la determinación de la 9,10-Fenantrenoquinona en muestras de aire la más frecuente es la cromatografía de gases acoplada a masas (CG-EM) (Cho 2004; Toriba 2016), la cual separa eficientemente la mezcla y brinda información estructural de la molécula. Otra técnica que ha mostrado promisorios resultados es la Cromatografía de Líquidos de Alto Desempeño (HPLC por sus siglas en inglés) acoplada a espectrometría de masas y otros detectores (Kishikawa 2010), sin embargo, las dos técnicas aun muestran dificultades para el análisis confiable de la molécula.

Una de las dificultades mayores para el análisis de la 9,10-Fenantrenoquinona en muestras de aire tiene que ver precisamente con la degradación térmica que puede experimentar en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases, debido a que es una molécula termolábil, por lo que, se requiere una modificación química para mejorar la confiabilidad de su determinación, sin embargo, esto podría incrementar la variabilidad de su análisis ya que se encuentra en niveles ambientales traza, por otro lado su determinación por cromatografía de líquidos presenta una menor resolución y puede experimentar coelución de picos o supresión de señales en los análisis debido a que es una muestra compleja, también requiere una modificación química ya que los detectores implementados en esta técnica requieren propiedades específicas que la molécula no posee, incrementando la variabilidad del análisis.

1.2. Objetivos

1.2.1. General

Evaluar el uso de técnicas cromatográficas acopladas a masas para la determinación de la 9,10-Fenantrenoquinona mediante una investigación bibliográfica y el análisis de ensayos preliminares

1.2.2. Específicos

- Realizar una investigación bibliográfica de los métodos cromatográficos que se han utilizado para el análisis de la 9,10-Fenantrenoquinona en muestras de aire.
- Presentar e integrar, dentro la discusión, los resultados obtenidos a través ensayos de laboratorio preliminares utilizando disoluciones estándares de la quinona.
- Seleccionar, entre las distintas aplicaciones revisadas, la combinación de técnicas, procedimientos y condiciones más promisorios para el análisis confiable de la 9,10-Fenantrenoquinona en muestra de aire.
- Proponer un protocolo para la identificación y cuantificación de la 9,10-Fenantrenoquinona en partículas respirables suspendidas en el aire.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Quinonas

Las quinonas por naturaleza son ubicuas, se pueden encontrar de forma natural ya que son muy abundantes en el reino vegetal, se pueden localizar en plantas, hongos y bacterias (Monks y Jones 2002), también juegan un papel muy importante en la fotosíntesis, así como en la coagulación de la sangre en algunos animales (J.Barber 1998), pero también pueden provenir de fuentes antropogénicas (Keyte 2013), y reacciones secundarias de sus precursores los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP). Son moléculas orgánicas que reaccionan como compuestos α,β insaturados (Gutsche 1979), generalmente semivolátiles, y pertenecientes a la clase de Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos Oxigenados (HPAO). Como su nombre lo indica son derivados de compuestos aromáticos como benceno, naftaleno, fenantreno o antraceno, mediante la conversión de un número par de grupos $-CH=$ en grupos carbonilo con cualquier reordenamiento necesario de dobles enlaces, dando lugar a una estructura de una diona cíclica conjugada (Griesbaum 2000). Las quinonas se caracterizan por presentar, en comparación con sus precursores de HAP, mayor masa molecular y solubilidad en agua, además de menores presiones de vapor.

La estructura de las quinonas tiene dos grupos carbonilo en un anillo insaturado de seis átomos de carbono, situados relativamente en posiciones "orto" o "para" (Sousa 2016), sin embargo, el término quinona también se utiliza de manera más general para una gran clase de compuestos que se derivan de las quinonas aromáticas mediante la sustitución de algunos átomos de hidrógeno por otros átomos o radicales (Griesbeck 2006). Algunas especies de quinonas son importantes desde el punto de vista biológico (Ege 2000), otras se pueden usar como colorantes o reactivos, hay quinonas relacionadas con vitaminas mientras que otras son empleadas para el área médica (Newman 2012) en algunos fármacos (Cedron 1998). Por el contrario, hay quinonas tóxicas para los humanos e incluso para el medio ambiente (Charlson 1992), así pues, la exposición humana a las

quinonas por lo tanto se puede ocasionar por dieta, clínicamente o mediante contaminantes transportados por el aire.

Las quinonas que provienen de los HAP suelen permanecer como contaminantes ambientales ya que se generan cuando se foto-oxidan con la luz solar y hace que sea una fuente importante de exposición para los humanos (Monks y Jones 2002). Las quinonas son reactivas en la atmosfera y a organismos vivos debido a sus propiedades electrofílicas (López 2015), por esta razón en las últimas décadas han sido un foco de atención muy importante debido a sus propiedades nocivas y su presencia en el ambiente conlleva a elevados riesgos a la salud ya que pueden relacionarse con enfermedades, en especial las quinonas generadas por HAP son sumamente perjudiciales ya que se ha comprobado que pueden inhibir el crecimiento celular, causar mutaciones, y llegar hasta enfermedades como cáncer a través de la generación de especies reactivas de oxígeno a través de su ciclo redox en el cuerpo humano (Huang 2014).

Desde el punto de vista toxicológico, las quinonas poseen dos propiedades químicas que le confieren su reactividad en sistemas biológicos, estas son oxidantes y electrófilos. Dependiendo de la estructura química estas propiedades contribuyen relativamente a su toxicidad (Monks y Jones 2002); por lo que es importante monitorear las quinonas que existen en el medio ambiente. Dada la importancia de las quinonas, su medición es necesaria tanto ambiental como a partir de fuentes de combustión.

2.2. Propiedades fisicoquímicas importantes para su análisis

La 9,10-FQ es una quinona que presenta los grupos carbonilo situados en la posición 9 y 10 del Fenantreno, lo que resulta en una *orto*-quinona (figura 1), su fórmula molecular es $C_{14}H_8O_2$, con un peso molecular de 208.2121 (NIST 2018).

Las quinonas son compuestos interesantes que tienen características únicas y varias funciones importantes. Todas las quinonas poseen una coloración que va desde un color amarillo pálido hasta rojo al negro, por esta razón se han utilizado

como colorantes, en especial las *orto*-quinonas tienen un color más intenso debido a los cromóforos y la dispersión conjugada de los dobles enlaces de la molécula.

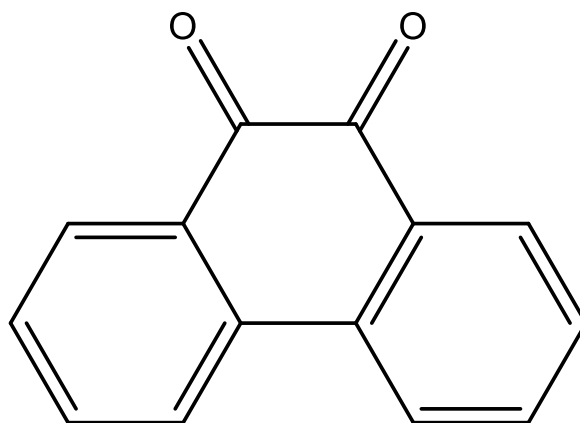


Figura 1. Estructura de la 9,10 Fenantrenoquinona

La 9,10-FQ suele ser físicamente agujas de color rojo-anaranjado, con un coeficiente de partición octanol/agua ($\log K_{ow}$) de 2.52 (Hansch 1995). Los compuestos con $\log K_{ow}$ menor a 1 se consideran altamente hidrófilos y los que tienen un $\log K_{ow}$ superior a 3-4 se consideran hidrofóbicos (Mitra 2003), la 9,10-FQ se encuentra en un punto medio, esto sugiere es que en la molécula se encuentra una parte insoluble al agua (el fenantreno) y sus grupos carbonilo son polares por lo que esta parte sería hidrofílica (Hansch 1995). Tiene una presión de vapor de 2.33×10^{-6} a 298 K (Howard y Meylan 1997) y su constante de Henry se encuentra clasificada dentro de las moléculas semivolátiles: volatiliza lentamente para $3 \times 10^{-7} < H < 1 \times 10^{-5} \text{ atm} \cdot \text{m}^3/\text{mol}$, (Mitra 2003), esto significa que la molécula consta de 2 partes como ya se mencionó, en este caso el fenantreno es la parte volátil y la diona es la parte que es menos volátil. Esta constante cuantifica la tendencia relativa de un compuesto a permanecer en forma de moléculas de vapor en contraposición a estar disuelto en agua, aunque para otros autores la molécula se considera con baja volatilidad debido a su bajo nivel de la constante de Henry (Meylan 1991)

La solubilidad de esta molécula en agua es de $7.5 \times 10^3 \mu\text{g/L}$ y $2.17 \times 10^4 \mu\text{g/L}$ a 25°C (Santos 2017), lo que refiere a que es soluble en agua, pero otras fuentes bibliográficas llegan a mencionar que es insoluble en agua (Chemical Book s.f.). En cambio en etanol su solubilidad es de 1 mg/ml, lo que significa que es ligeramente soluble, en agua hirviendo, éter dietílico, y en ácido acético glacial caliente (Griesbaum 2000) es fácilmente soluble y etilenglicol metil-eter es de 7 mg/ml, también suele ser soluble en ácido acético, acetonitrilo, ácido sulfúrico, benceno, éter (FJ 1990) (O'Neil 2006), lo que indica que se disuelve mejor en disolventes orgánicos.

2.3. Propiedades fisicoquímicas importantes de su presencia en el ambiente

La 9,10-FQ suele ser una molécula muy estable en el ambiente debido a su distribución y conjugación de sus dobles enlaces, tiene un valor de K_{ow} que está en un punto medio y en el ambiente los compuestos químicos con valores altos de K_{ow} tienden a acumularse en las porciones lipídicas de los organismos y a concentrarse en suelos y sedimentos, por el contrario, los compuestos con bajos K_{ow} tienden a distribuirse en el agua o aire (civil 2020), lo que explica por qué afecta a animales como a humanos y su permanencia en el ambiente, ya que se ha encontrado tanto en el agua como en el aire por su K_{ow} ya señalado y también se le puede atribuir a su constante de Henry.

2.4. Origen y formación

La 9,10-FQ es una molécula que se puede obtener sintéticamente en un laboratorio mediante diversas reacciones, se puede formar a partir de la oxidación del fenantreno mediante diversos métodos, puede ser mediante la oxidación del fenantreno con ácido crómico en ácido acético o en ácido sulfúrico (Clar 1964), mediante trióxido de cromo en ácido sulfúrico, también con una reacción de

bromocromato y cetiltrimetilamonio con irradiación de microondas, y con ácido acético y ácido yódico (figura 2) (Cannon 2019).

También se deriva a partir de la oxidación de fenoles, en donde los grupos C-OH se oxidan a grupos carbonilo (C=O). Se puede obtener (figura 3) a partir 2,2'-bifenildicarboxaldehído irradiándolo a través de una lámpara de vapor de mercurio usando disolventes como la acetona y el peróxido de benzoilo durante 72 horas (Hawthorne 1963).

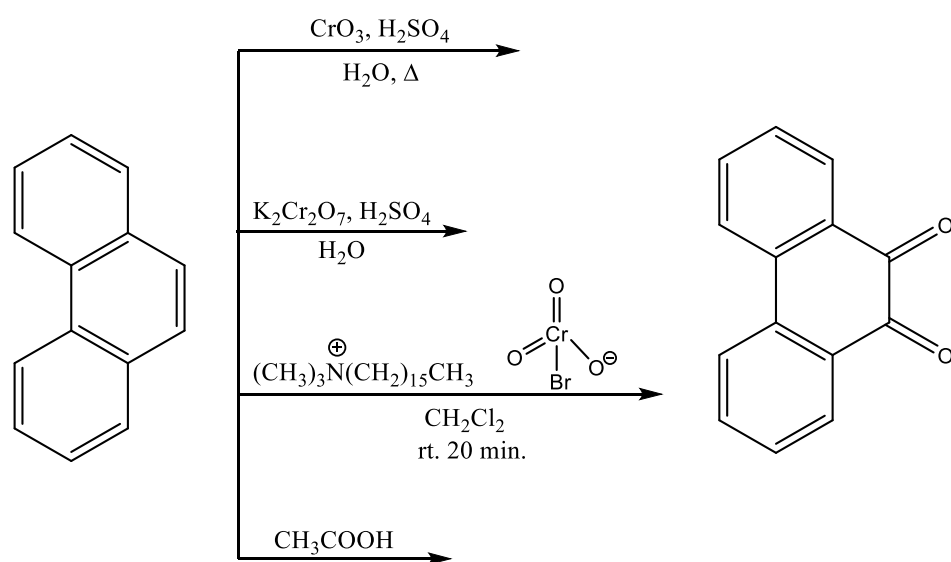


Figura 2. Síntesis de la 9,10-Fenantrenoquinona a partir del fenantreno (Cannon 2019)

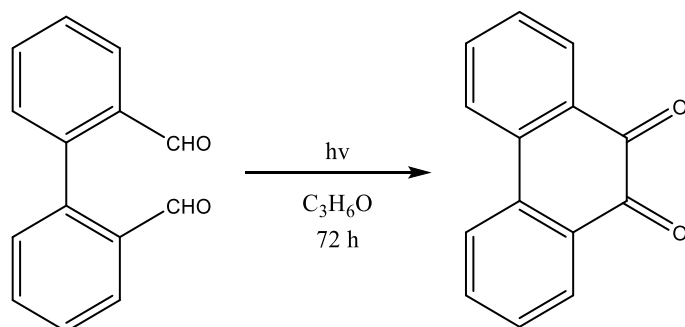


Figura 3. Síntesis de 9,10-Fenantrenoquinona a partir de 2,2'-bifenil dicarboxibenzaldehído (Hawthorne 1963)

La 9,10-FQ se puede formar por la oxidación del fenantreno en el ambiente. La combustión incompleta de combustibles fósiles principalmente el diésel se reporta como la principal fuente de formación de quinonas (C. Rodriguez 2008; Shimada 2004; Suguimoto 2005), se encuentra en la fase de partículas del aire ambiental, y es la principal fuente antrópica directa de emisiones de quinona. Por otra parte, la fotooxidación de HAP es la fuente secundaria más importante de generación de quinona en la atmósfera (Sousa 2016).

Los niveles de concentración de 9,10-Fenantrenoquinona durante días laborales son relativamente más altos que durante los fines de semana este resultado es atribuido al mayor tránsito de autos que se encuentra en la semana, esto sugiere que el tráfico de automóviles es una fuente de emisión importante de esta molécula (Kishikawa 2006). La 9,10-FQ se dispersa principalmente en condiciones de alta radiación ultravioleta (UV) como en la estación cálida-seca, y cuando hay largos períodos de corriente de masa de aire (Gimate 2017) , esto debido a que las reacciones de los HAP en el ambiente se ven favorecidas por la radiación UV, excitándolos a través de reacciones fotoquímicas y mediante una deslocalización de electrones que permita la absorción de la luz, en este caso al fenantreno (figura 4). El fenantreno en fase gaseosa atmosférica también interacciona con especies atmosféricas reactivas (NO_3^* , O_3 y $\cdot\text{OH}$) para producir diferentes compuestos oxigenados y nitrados que se encuentran en el aire ambiente (Wang 2007).

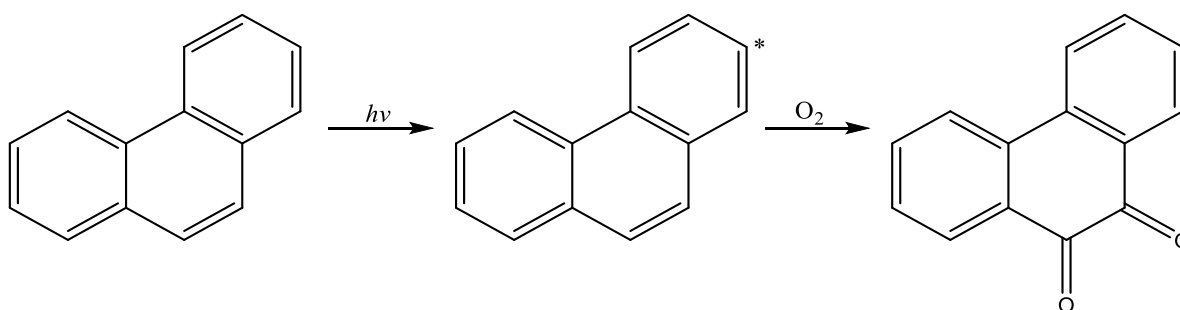


Figura 4. Propuesta de formación fotoquímica (Barbas 1996)

La gran cantidad de fenantreno en fase gaseosa en el ambiente sugiere que su reacción fotoquímica iniciada por $\cdot\text{OH}$ probablemente sea una fuente importante de estos oxigenados de HAPs en atmósferas urbanas contaminadas (Helmig 1994). Estudios ambientales reportan la comparación de reacciones del fenantreno en fase gaseosa con $\cdot\text{OH}$ y $(\text{NO}_3)\cdot$ (compuesto abundante en la noche), y observan que la tasa de formación es relativamente más alta cuando reacciona con el $(\text{NO}_3)\cdot$ por lo que se pueden observar concentraciones altas de 9,10-Fenantrenoquinona por la noche (Wang 2007) esto puede sugerir que los radicales $(\text{NO}_3)\cdot$ juegan un papel importante en los procesos de oxidación que condujeron a estos dos compuestos. Numerosos autores han sugerido que el $(\text{NO}_3)\cdot$ es un oxidante nocturno líder (Keyte 2013) (Wnorowski 2017).

2.5. Efectos a la salud

Estudios toxicológicos han comprobado que las quinonas son más tóxicas que sus precursores originales (HAP) (John Durant 1998), por esa razón la identificación de estas moléculas es de suma importancia, ya que poseen numerosas propiedades nocivas y representan una clase de intermediarios toxicológicos que pueden crear una variedad de efectos peligrosos, incluyendo citotoxicidad aguda, inmunotoxicidad y carcinogénesis (Bolton 2000).

La toxicidad de las quinonas ocurre por dos mecanismos: a) la formación de enlaces covalentes con biomoléculas por adición química de Michael, y b) la reducción catalítica de oxígeno (O_2) a anión superóxido (O_2^-) y otras especies reactivas del O_2 (Hernández 2016), Aunque el 9,10-FQ tiene grupos carbonilo α , β insaturados, esta quinona experimenta un ciclo redox y no actúa como aceptor de Michael (Kumagai 2002), esto indica que el 9,10-FQ es una molécula de riesgo en la atmósfera específicamente a través de la generación excesiva de ROS. Además, el cadmio que se encuentra en el ambiente hace que mejoren las respuestas proinflamatorias inducidas por 9,10-FQ en las células epiteliales de las vías respiratorias (Honda 2017).

Principalmente las *o*-quinonas activas proporcionan una ruta alternativa a los metabolitos que pueden actuar como carcinógenos directos, ya que ejercen potencialmente citotoxicidad en células de hepatoma de rata y humano, (Peters 2007) y también se ha demostrado que es citotóxica para la línea de células epiteliales pulmonares humanas A549, lo que quiere decir que lesiona el tejido pulmonar (Sugimoto 2005), así como para algunas bacterias, levaduras y lenteja de agua (C. E. Rodriguez 2004).

Existen 3 clases de *orto*-quinonas, la 9,10-Fenantrenoquinona se encuentra en la clase 1 donde los análisis comprueban que inhiben la viabilidad y la supervivencia celulares, producen la mayor cantidad de radicales libres evaluados como anión superóxido celular y radical *o*-semiquinona, e inducen la muerte celular por un cambio en el estado (Bolton 2000).

Este es un compuesto que puede inactivar irreversiblemente proteínas celulares clave y revelan que esta molécula conduce a deleciones de ADN y mutaciones puntuales solo en presencia de oxígeno, la molécula causa una disminución significativa en la generación de células diploide, pero con el triple de concentración que, en presencia de oxígeno, también genera es una disminución de enzimas que están en el proceso de la glucólisis. (C. Rodriguez 2008).

Se ha confirmado que la 9,10-FQ genera especies reactivas de oxígeno (ROS) (Yoshito 2002) a través de su ciclo redox lo que resulta en su toxicidad tanto *in vitro* como *in vivo*. Esta molécula puede aceptar un e⁻ para formar su semiquinona, y esta se puede oxidar de nuevo a su forma de quinona cuando el oxígeno se reduce de forma incompleta y durante este proceso el O₂ se reduce y se convierte en un radical anión superóxido (O₂⁻). Estos van a interaccionar con otras moléculas para formar peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilos (figura 5), estas especies reactivas de oxígeno que se caracterizan por causar daños mayores en proteínas, ácidos nucleicos, y algunas otras biomoléculas (Yang 2018).

La 9,10-FQ también causa daño oxidativo celular, llevando a las células A549 a la muerte celular causando de cáncer de pulmón a través de la producción de especies

reactivas de oxígeno (ROS) (Matsunaga 2014) y un aumento de la fragmentación del ADN y la degradación de ARN, lo cual depende de la concentración y el tiempo de exposición. Esto ocurre cuando 9,10-FQ genera radicales reactivos de oxígeno (primero genera $O_2^{\cdot-}$, que produce H_2O_2 liberando hierro de la ferritina, lo que produce una mayor formación de radicales $\cdot OH$), causando la fragmentación del ADN como la oxidación de proteínas, conduciendo así a la muerte celular (figura 6) (Sugimoto 2005). En este estudio se probó la introducción de 1,10 fenantrolina (OP) y probaron que protege las células de los efectos tóxicos de la 9,10-FQ al formar quelatos con el hierro.

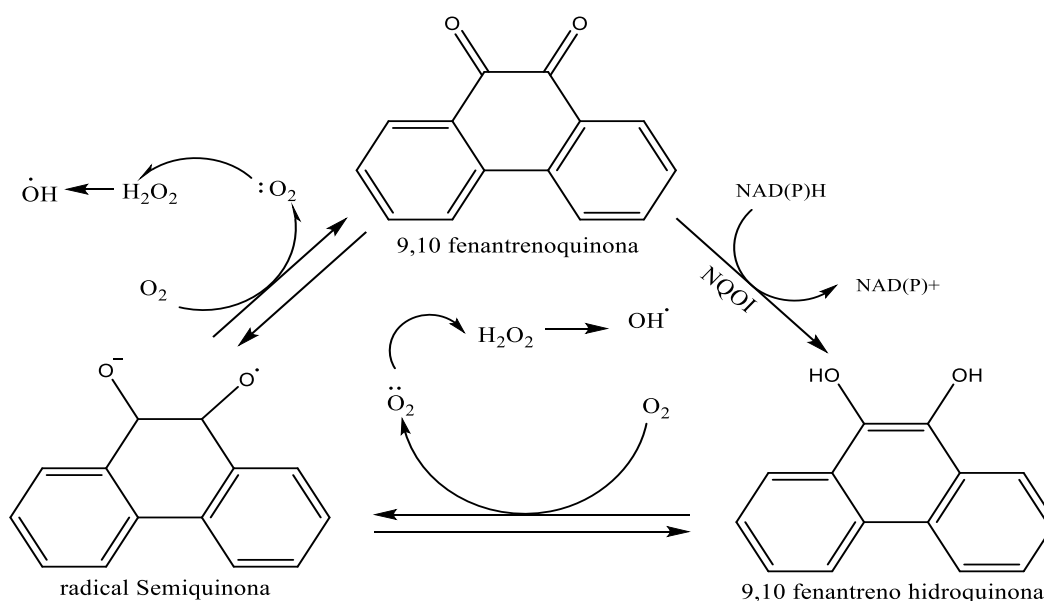


Figura 5. Ciclos redox de 9,10-FQ para la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Yang 2018)

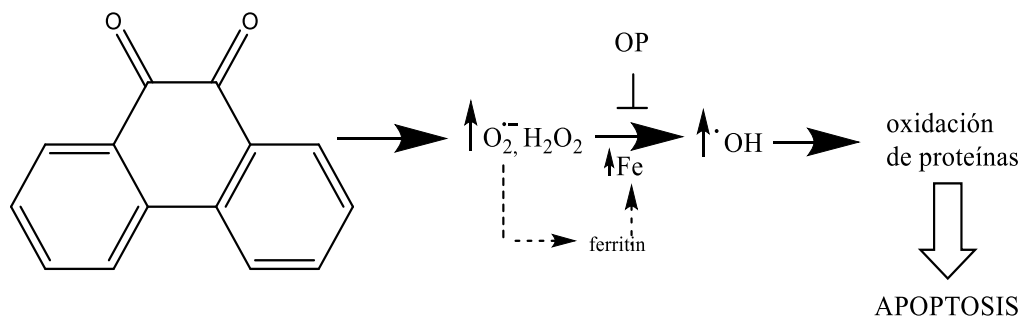


Figura 6. Efectos tóxicos y la citoprotección que ofrece el quelante intracelular de metales OP (Sugimoto 2005)

efectos fisiológicos y/o fisiopatológicos a través de una alteración de los eventos mediados por NO.

En otros estudios con cepas de algas verdes (*Scenedesmus*) se ha demostrado que ante la exposición a CO₂ la 9,10-FQ se evapora en un tiempo muy corto a comparación de las demás quinonas lo que resulta en una toxicidad mayor, también indica que la toxicidad de la 9,10-FQ es cien veces mayor que del hidrocarburo original (fenantreno) debido a la respuesta de crecimiento de *S. armatus* B1-76 cultivado a 0.1% CO₂ (Tukaj 2007).

2.6. Análisis térmico

El análisis térmico es un conjunto de técnicas analíticas que estudian la conducta térmica de los materiales, el material se somete a un programa de temperatura controlado el cual se calienta o se enfría, esto puede provocar que su estructura y su composición química sufran cambios, como una sublimación, solidificación, fusión, cristalización, descomposición u oxidación térmica. Estos cambios se pueden estudiar midiendo la variación de una propiedad física o mecánica de la materia en función de la temperatura, el tiempo y una atmósfera determinada (Alonso 2009).

2.6.1. Análisis termogravimétrico

El análisis termogravimétrico (TGA) se usa para caracterizar las propiedades físicas y químicas de los materiales, en función de la temperatura en una atmósfera controlada de forma precisa. Es una técnica que consiste en monitorizar la masa de la muestra frente al tiempo o la temperatura, mientras la temperatura va aumentando, así permite observar las ganancias o pérdidas de peso que se generan (Carrasco 2013).

2.6.2. Calorimetría diferencial de barrido

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es la técnica de medición para detectar transiciones endotérmicas y exotérmicas, como la determinación de temperaturas de transformación y entalpía de sólidos o líquidos en función de la temperatura. Se toma una muestra de masa conocida y se le somete a calor o frío para analizar los cambios que se producen en su capacidad calorífica a medida que se modifica el flujo de calor. Esto permite detectar transiciones como puntos de fusión, transiciones vítreas y cambios de fase (Skoog 2001) (Alacant s.f.).

2.7. Derivatización

Las dificultades más comunes de una metodología analítica es la complejidad de la muestra, y la incompatibilidad del analito con el equipo analítico, por estas razones usualmente se implementa un proceso previo que consiste en la modificación química de la estructura de un compuesto con el fin de incrementar su volatilidad, estabilidad térmica o alguna otra propiedad que no posee la molécula o la tiene en poca proporción, esto se hace para poder detectarla por algún método particular (Knapp 1979).

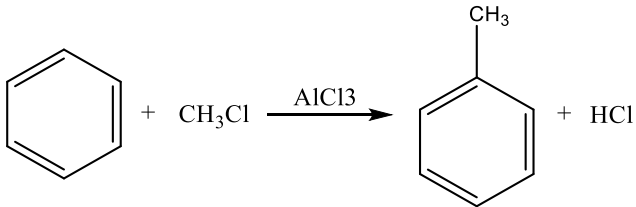
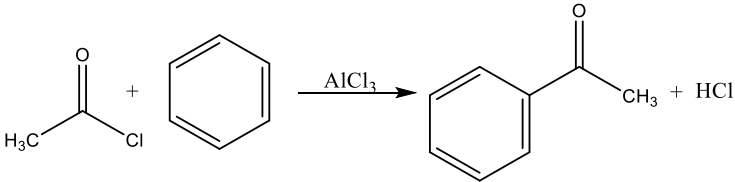
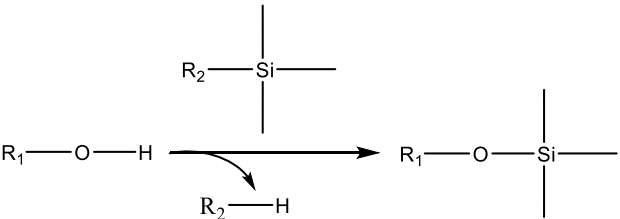
Al momento de elegir el reactivo derivatizante y por tanto las condiciones de reacción se basará principalmente en el grupo funcional del analito y la presencia de otros grupos funcionales o lábiles en la molécula. Por lo general, hay tres tipos de reacciones de derivatización, alquilación, acilación y sililación.

En cromatografía de gases es necesario derivatizar algunos compuestos, principalmente los que tienen grupos funcionales polares (hidrógenos activos) con el fin de mejorar su volatilidad, su estabilidad térmica y en algunos casos la sensibilidad en la detección, algunas veces para proporcionar evidencia adicional de la identidad de un compuesto, además puede ser utilizada para acortar o alargar el tiempo de retención y para permitir la separación de moléculas que tengan enantiomerismo.

Por otro lado, en cromatografía de líquidos se pueden usarse técnicas de derivatización pre y post columna (Rosenfeld 2003). La derivatización post columna, es una cromatografía de reacción, en la cual los compuestos eluidos que se separaron en la columna, se derivatizan antes de entrar al detector (un proceso que lleva a cabo durante el análisis), es decir, durante la transferencia de componentes de la muestra desde la columna al detector. Esta es una técnica de derivatización que se utiliza para mejorar la selectividad y sensibilidad.

En cambio, la derivatización pre-columna ofrece una mayor simplicidad técnica y se utiliza para mejorar la estabilidad, aumentar o disminuir el tiempo de retención, mejorar la resolución y la simetría de pico. Esta técnica se realiza antes de que la muestra entre en la columna o en un medio plano (Acquiaviva 2016).

Tabla 1: Tipos de reacciones de derivatización

Reacción	Descripción
<p>Alquilación</p> 	<p>Reemplazo de un hidrógeno activo en R-COOH, R-OH, R-SH, R-NH2 con un grupo alquilo o anilo.</p>
<p>Acilación</p> 	<p>Reemplazo de hidrógenos activos en ésteres, tioésteres y aminas respectivamente.</p>
<p>Sililación</p> 	<p>Reemplazo de un hidrogeno activo de un grupo funcional polar por un grupo aqulsil no polar.</p>

2.7.1. Alquilación

Esta técnica se usa para modificar los compuestos con hidrógeno activos como ácidos carboxílicos y fenoles, consiste en la sustitución de un hidrógeno activo por un grupo alifático o alifático-aromático (bencilo) (Zenkevich 2009). La aplicación principal de esta técnica es la conversión de ácidos orgánicos en ésteres, que permiten mejores cromatogramas que los ácidos libres. Además la reacción de alquilación puede usarse para preparar éteres, tioéteres y tioésteres, N-alquilaminas y amidas. A medida que disminuye la acidez de hidrógenos activos, ha de aumentarse la fuerza del agente alquilante (Aldrich s.f.).

2.7.2. Acilación

Es la conversión de compuestos que contengan hidrógeno activo como -H, -SH y -NH en ésteres, tioésteres y amidas mediante la acción de un ácido carboxílico o un derivado de un ácido carboxílico, esto reduce la polaridad y adiciona funcionalidades halogenadas (Aldrich s.f.).

En aplicaciones cromatográficas, la reacción de acilación se usa principalmente para convertir las clases anteriores de compuestos en derivados que sean más adecuados para cromatografía o que dan una mayor respuesta en la detección cromatográfica que el compuesto original. Además, los derivados de este proceso resultan útiles en Espectrometría de Masas en las que modifican los perfiles de fragmentación de los compuestos a estudiar (Zenkevich 2009).

2.7.3. Sililación

Es un procedimiento muy empleado en el análisis de cromatografía de gases por su sencillez y rapidez de la reacción, reduce tiempo de retención mientras que la acilación genera lo contrario. Los derivados que se forman en comparación con el compuesto original son más volátiles, menos polares y más estables térmicamente. En esta derivatización el hidrogeno activo es remplazado por un grupo alquilsilil, puede ser el trimetilsilil (TMS) o el t-butildimetilsilil (t-BDMS) (Zenkevich 2009).

2.8. Fundamentos de las técnicas cromatográficas

La cromatografía es el principal método utilizado para la determinación de la identidad de analitos, y cuando se trata de muestras complejas este conjunto de técnicas permite la separación de los componentes, se puede emplear para la identificación cuantitativa como cualitativa, es un método físico de separación, basado en la distribución de los componentes. Un rasgo característico de la cromatografía es la presencia de dos fases inmiscibles; dispuestas de tal manera que mientras una permanece estacionaria dentro del sistema (fase estacionaria), la otra se desplaza a lo largo de él (fase móvil) (Harris 2006).

El tiempo de retención es el único parámetro que se puede utilizar para el análisis cualitativo, ya que este es una propiedad característica para cada componente, bajo condiciones cromatográficas idénticas. La identificación involucra el uso de patrones en las mismas condiciones cromatográficas, sin embargo, comparada con otras técnicas de identificación en este caso suele ser difícil y carente ya que resulta complicado asegurar que un componente este presente en una mezcla, pero si se puede afirmar la ausencia de este (UNAM 2007) sin embargo si se utiliza un sistema de detección adecuado (EM, IR) para determinar los compuestos se podría de una manera muy precisa establecer la identificación de los analitos en la muestra (Skoog 2001).

Por otro lado, el análisis cuantitativo se basa en la comparación del área o altura de pico del componente de interés con la de estándares de concentración conocida del analito, esto quiere decir que se elabora una curva de calibrado a partir de varias disoluciones de patrones de identidad y concentración conocidas. Posteriormente, la comparación del área del pico presentado por el compuesto desconocido respecto a el área del pico del patrón de identidad y concentración conocidas, podemos determinar la identidad y concentración del compuesto en cuestión (Skoog 2001).

2.8.1. Cromatografía de gases

La cromatografía de gases (CG) es una técnica de separación y caracterización de mezclas complejas. El objetivo principal de este tipo de cromatografía es separar cada uno de los componentes de la mezcla mediante adsorción y/o partición de las moléculas, con la finalidad de conocer las proporciones de las especies que componen la mezcla (Noguera 2020) y confirmar la presencia o ausencia de un compuesto en una muestra determinada. Esta se emplea cuando el analito es volátil o semivolátil y térmicamente estable.

En este caso la muestra se volatiliza y se inyecta a la columna cromatográfica, la separación cromatografía en gases se deriva de la distribución de los componentes de una mezcla entre la fase estacionaria y la móvil a lo largo de la columna cromatográfica. Las propiedades químicas particulares de cada uno de los componentes de la mezcla proveen una interacción específica con la fase estacionaria.

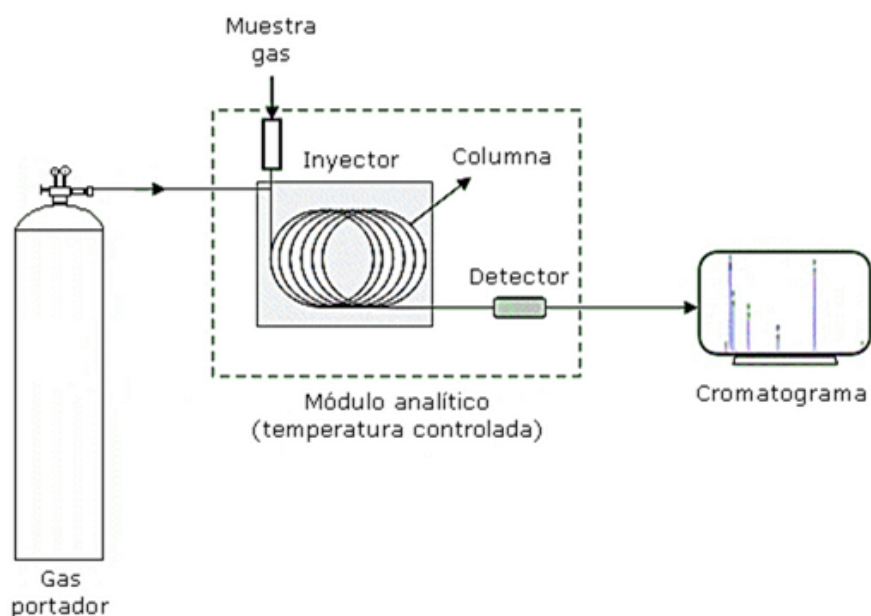


Figura 8. Esquema de un Cromatógrafo de gases (Calzada s.f.)

Los compuestos con mayor afinidad por a la fase estacionaria permanecen por más tiempo en la columna que el resto, la fase móvil es el gas portador y no debe tener interacción con los componentes de la muestra, por eso debe ser un gas inerte, evitando reacciones indeseables con los analitos o con la fase estacionaria. Cuando la separación es exitosa, cada compuesto de la mezcla eluye en diferentes tiempos de retención.

Cabe destacar que su avance constante en el desarrollo de detectores y fases estacionarias nuevas y robustas ha convertido a la CG en una herramienta altamente confiable para el análisis de trazas de rutina (Worsfold 2005).

La cromatografía de gases cuenta con una serie de ventajas con respecto a la cromatografía de líquidos, como la capacidad de disponer de detectores mucho más universales, utiliza métodos más simples, es más rápida y sensible, además la instrumentación requerida es más sencilla y económica que la empleada en HPLC. Sin embargo, en cromatografía de gases, la influencia de la temperatura sobre la distribución del equilibrio es considerable, a diferencia de la cromatografía líquida. Por ello, la cromatografía de gases presenta limitaciones en compuestos poco volátiles, compuestos sensibles al aumento de temperatura y compuestos que se encuentran en forma iónica.

2.8.2. Cromatografía de líquidos

La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) es muy utilizada debido a su sensibilidad, su facilidad de adaptación a las determinaciones cuantitativas y su capacidad para separar especies no volátiles o termolábiles. En este caso la fase móvil es un líquido (disolvente) que circula con un sólido u otro líquido inmisible que le llama fase estacionaria, está constituido por un relleno que capta de forma selectiva los diferentes componentes de la muestra. La resolución de esta separación es función de la interacción entre la fase estacionaria y la fase móvil, que puede ser acentuada a través de la elección de diferentes disolventes y diferentes tipos de relleno (Skoog 2001). HPLC generalmente requiere menos

limpieza de la muestra y los pasos de derivatización generalmente no son necesarios.

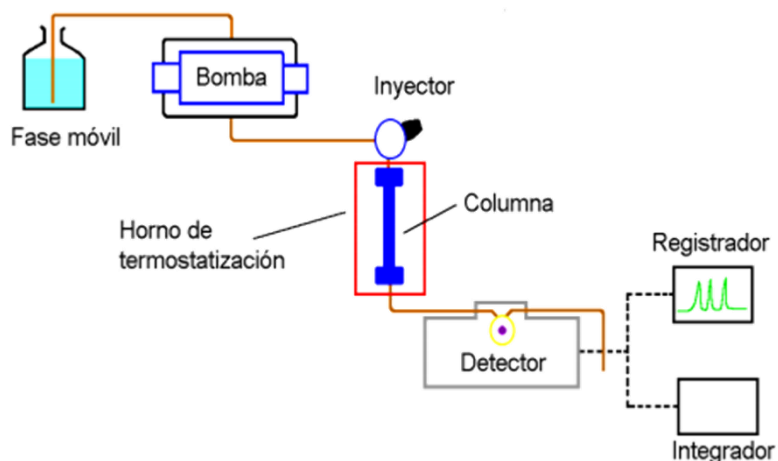


Figura 9. Esquema de un cromatógrafo de líquidos

La introducción de la cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC), utiliza columnas con tamaños de partículas más pequeños mejorando la resolución cromatográfica, ya que la velocidad lineal óptima tiene un rango más amplio, UPLC también ofrece un análisis más rápido sin pérdida de resolución, un pretratamiento de muestra sencillo y rápido, un menor tiempo analítico, y las técnicas de ionización suaves y la simplicidad del método hacen que acoplamiento el CL/EM sea una herramienta muy útil para mediciones cualitativas y cuantitativas de derivados de HAP (Mirivel 2010).

2.8.2.1. Detectores

Un detector es un dispositivo que permite convertir una propiedad física, no medible directamente, en una señal elaborable y ofrece información sobre la naturaleza y magnitud de la propiedad física (Skoog 2001). Es la parte del cromatógrafo que se encarga de determinar cuándo ha salido el analito por el final de la columna, este funciona comparando una propiedad física entre el analito y la sustancia portadora

llevando cada uno de los componentes que previamente se han separado en la columna, esta acción se traduce en una señal tipo eléctrica, que posteriormente se amplificará mediante un registrador gráfico o integrador permitiendo indicar el momento que salen de la columna los componentes (UNAM 2007)

A diferencia de la cromatografía de gases, en cromatografía de líquidos los detectores que se emplean no son tan aplicables universalmente. Los detectores en cromatografía de gases son específicamente diseñados para medir pequeñas concentraciones de analitos en flujos de gas, mientras que en cromatografía de líquidos los detectores son instrumentos analíticos tradicionales adaptados con celdas de flujo para medir concentraciones bajas de solutos en flujos de líquidos (Skoog 2001). Los detectores en cromatografía de líquidos se pueden clasificar en dos grupos: los detectores basados en una propiedad de la disolución que responden a una propiedad de la fase móvil, un ejemplo sería el índice de refracción, por otro lado, los detectores basados en la propiedad del soluto como UV, fluorescencia, intensidad de difusión.

2.8.2.1.1. Índice de refracción

Este tipo de detectores miden una propiedad de la disolución, como es la variación en su índice de refracción a consecuencia de la presencia de un soluto, esto quiere decir que mide la diferencia entre el disolvente y el efluente. Consta de una cubeta con dos compartimientos donde por un compartimiento pasa el disolvente y por otro el efluente de la columna separados por una placa de vidrio que se encuentra en un ángulo dado, el cual produce una desviación de un haz de luz incidente para identificar dos disoluciones diferentes mediante el índice de refracción. El desplazamiento del haz con respecto a la superficie fotosensible del detector provoca una variación de la señal de salida, la cual, una vez amplificada y registrada, proporciona el cromatograma.

Estos detectores tienen la ventaja de que responden a la mayoría de los analitos, lo que quiere decir que son detectores universales, no dependen del caudal, sin

embargo, son altamente sensibles a los cambios de temperatura, pero su límite de detección es aproximadamente 1000 veces peor que el de un detector de ultravioleta y por lo general no se pueden utilizar en la elución con gradiente.

2.8.2.1.2. Espectroscopia Infrarroja

Se emplea en aquellos compuestos que absorben radiación infrarroja cuya longitud de onda es mayor a los 700nm, por lo que se debe tener cuidado con el disolvente que se seleccione ya que una de las mayores limitaciones al uso de los detectores de infrarrojo se debe a la baja transparencia de muchos de los disolventes que se utilizan. Por ejemplo, las bandas anchas de absorción infrarroja del agua y de los alcoholes impiden prácticamente el uso de este detector para muchas aplicaciones (Skoog 2001). La radiación infrarroja es absorbida por las moléculas orgánicas y convertida en energía de vibración molecular.

2.8.2.1.3. Espectroscopía ultravioleta-visible

El Detector UV-Vis es el más común en HPLC, se usa cuando los componentes absorben radiación UV- visible, como compuestos aromáticos, alquenos, moléculas con enlaces C-O, C-N, C-S. Pueden ser de longitud de onda fija o variable (arreglo de diodos).

La función de un detector UV-Vis es convertir una señal luminosa en una señal eléctrica. Idealmente, debe responder en un amplio rango de longitud de onda, responder con alta sensibilidad y con bajo ruido, tener un rango de respuesta lineal, tener una respuesta rápida, permitir la miniaturización y un bajo consumo de muestra (Passos 2019). En este tipo de detectores la línea de base representa la máxima transmisión de luz, y cualquier desviación de ella indicara perdida o absorción de radiación. Cuando se pasa una radiación electromagnética a través de un analito que presenta ciertos grupos funcionales (Skoog 2001), no es destructiva, es estable en el tiempo y se afecta poco por la temperatura, por lo que se pueden coleccionar los componentes por separado.

La técnica está basada en la atenuación de la medición de la radiación electromagnética por una sustancia absorbente. Esta radiación, tiene un rango espectral de aproximadamente 190-800 nm, que también difiere en términos de rangos de energía y tipo de excitación de otras regiones relacionadas. Esta atenuación es el resultado de la reflexión, la dispersión, la absorción o las interferencias (Saraiva 2019).

2.8.2.1.4. Fluorescencia

Este detector solamente puede detectar compuestos que tengan fluorescencia nativa o inducida. La fluorescencia se detecta por medio de un detector fotoeléctrico colocado perpendicularmente respecto al haz de excitación, semejantes a los detectores de absorbancia (UNAM 2007).

La fluorescencia es un proceso de emisión de luz por moléculas que son excitadas con radiación electromagnética (Lakowicz 2013). La molécula excitada pasa del estado fundamental (S_0) a un estado de mayor energía (S_1), cuando regresa a su estado fundamental es cuando emite la energía que absorbió dando el fenómeno de la fluorescencia (figura 10).

Los compuestos que contienen estructuras alifáticas, alicíclicas o estructuras con dobles enlaces conjugados pueden presentar fluorescencia, pero los compuestos que presentan una fluorescencia intensa son los compuestos que contienen grupos funcionales aromáticos. *“La mayoría de los hidrocarburos aromáticos no sustituidos son fluorescentes en disolución, la eficacia cuántica aumenta con el número de anillos y con su grado de conjugación”* (Turro 2009). La sustitución en un anillo aromático causa desplazamientos en la longitud de onda de absorción máxima y los cambios correspondientes en los picos de fluorescencia.

Una ventaja de los métodos de fluorescencia es su alta sensibilidad, que resulta ser más de un orden de magnitud mayor que la de los sistemas de absorbancia. En cromatografía de líquidos se ha aprovechado esta ventaja para la separación y determinación de los componentes fluorescentes de las muestras.

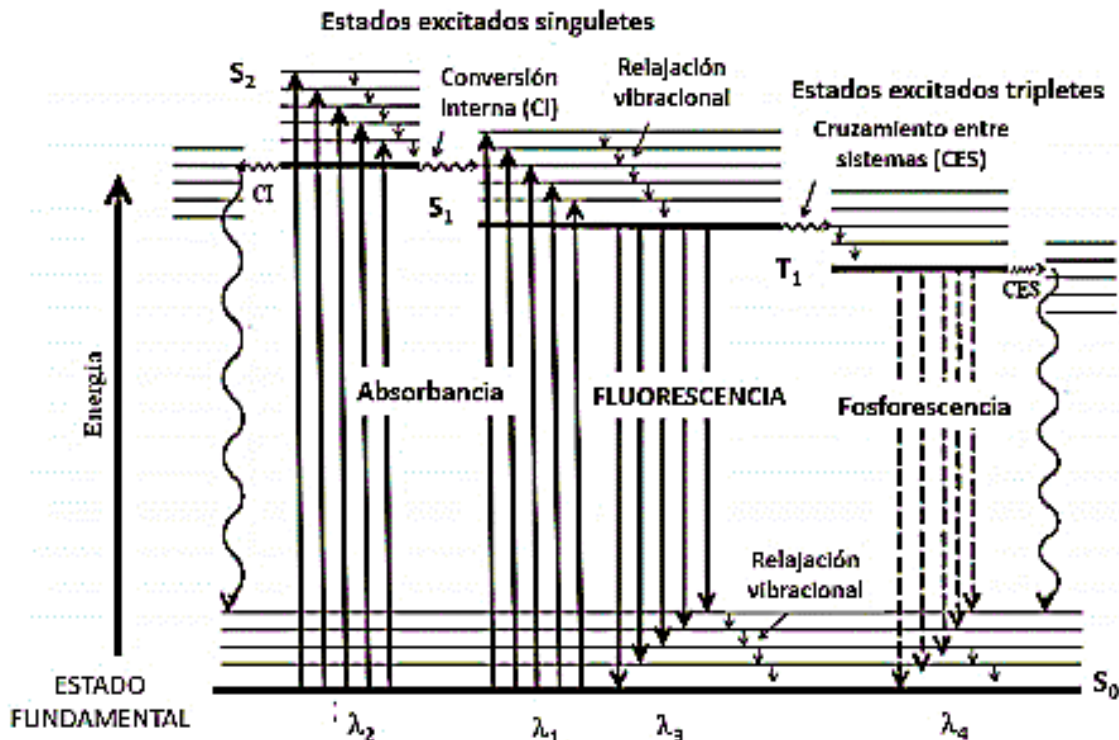


Figura 10. Diagrama de Jablonski

2.9. Espectrometría de masas

La espectrometría de masas (EM) es una de las técnicas más ampliamente utilizadas para la caracterización e identificación de analitos debido a su potencial de análisis rápido, alto rendimiento y precisión en la identificación de una amplia variedad de tipos de muestras. La capacidad de transferir especies de la fase condensada a la fase gaseosa y, en el proceso, ionizarlas es fundamental para su análisis.

Esta técnica no utiliza ningún tipo de radiación por lo que no se considera una técnica espectroscópica, está basada en la obtención de iones a partir de moléculas en fase gaseosa, una vez obtenido los iones se separan de acuerdo con su relación masa/carga (m/z). La figura 11 se muestra un diagrama de bloques de los componentes principales de un espectrómetro de masas en donde el analito se introduce por el sistema de entrada, y pasa primero por la fuente de iones, en donde se ioniza para adquirir cargas positivas o negativas, posterior a esto viaja a través

del analizador de masas separando de acuerdo con su m/z , y finalmente llegando al detector.

Es una herramienta eficaz ya que nos otorga información tanto cualitativa (estructura) como cuantitativa (masa o concentración), sin embargo, la técnica por si sola suele ser escasa para el análisis de mezclas, ya que la interpretación de los espectros obtenidos sería muy complicados o incluso imposible debido al elevado número de iones formados. Por esta razón se han desarrollado métodos en los que la espectrometría de masas se acopla a un sistema de separación, dando lugar a los denominados métodos acoplados, los métodos que más se han utilizado son: cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (CG/EM) poderosa herramienta para el análisis de mezclas complejas de compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles, es una de las técnicas de separación cromatográfica más utilizadas para la determinación, separación, identificación y cuantificación de la presencia de contaminantes orgánicos en el medio ambiente (Gutiérrez 2002).

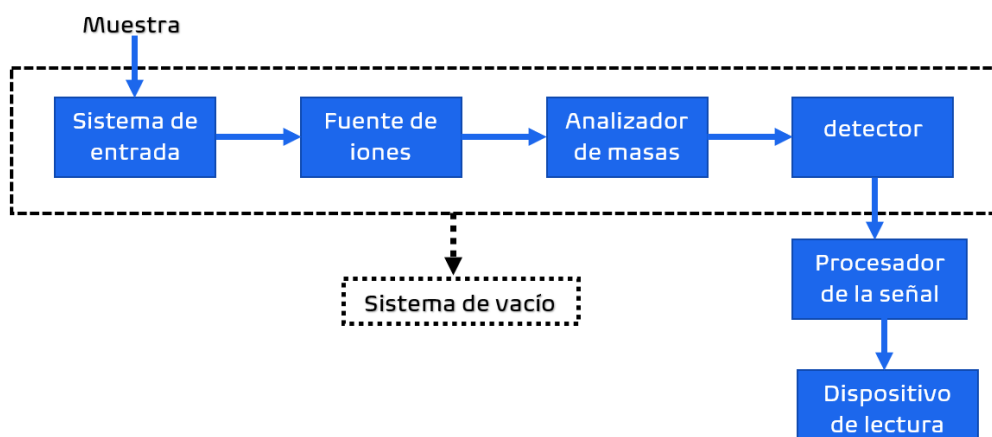


Figura 11. Diagrama de bloques de los componentes de un espectrómetro de masas

CG-EM combina el extraordinario poder de resolución de la cromatografía de gases, que facilita la separación de moléculas relacionadas estructuralmente, con la alta especificidad que ofrece la detección por espectrometría de masas, en donde se observan sus iones fragmentados que nos permiten identificar inequívocamente la molécula. La principal ventaja de los equipos CG/EM radica en el poder identificar y

cuantificar los componentes de una mezcla compleja, en un corto tiempo y con cantidades muy pequeñas de muestra, sin embargo, la degradación térmica de los componentes es una dificultad para este acople.

Por otro lado, la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas (CL-EM) es más conveniente para el análisis de mezclas de compuestos poco volátiles y/o termolábiles, polares (Skoog 2001) (Munson 2006), sin embargo, no es posible utilizar las fuentes de ionización más comúnmente aplicadas en la EM, por lo que es necesario desarrollar formas alternativas de ionización, como la ionización por electrospray (ESI) e ionización química a presión atmosférica (APCI). La mezcla puede ser acuosa o en disolventes orgánicos polares que favorezcan la formación de analitos iónicos o con ayuda de aditivos, tales como buffers.

Los componentes de la muestra que son separados en la CL pasan al espectrómetro de masas a través de una interfaz donde son ionizados, estas pueden ser la ionización química a presión atmosférica (APCI) o electrospray (ESI). Los iones generados son acelerados hacia un analizador y separados en función de su relación (m/z) mediante la aplicación de campos eléctricos, magnéticos o simplemente determinando el tiempo de llegada a un detector. Los iones que llegan al detector producen una señal eléctrica que es procesada, ampliada y enviada a un computador en donde se obtiene el espectro de masas.

El acoplamiento de CL-EM agrega las ventajas que otros detectores carecen como alta selectividad y eficiencia de separación, con las ventajas del espectrómetro de masas, que incluyen mayor selectividad, información estructural y peso molecular.

2.9.1. Fuentes de ionización

La fuente de iones de un espectrómetro de masas convierte los componentes de una muestra en iones positivos o negativos por bombardeo con electrones, iones, moléculas o fotones. La elección de la técnica para transferir a la fase gaseosa y

llegar a ionizar se rige principalmente por las propiedades químicas y físicas de la molécula y en la matriz en la que se encuentra (Siuzdak 2005).

Las fuentes de iones se clasifican según cómo transfieren las moléculas neutras a la fase gaseosa, utilizando estrategias que van desde la evaporación hasta la nebulización y la desorción por láser. Los tipos más comunes de iones precursores que se forman se dan para cada clase de fuente de iones. Los iones precursores, moleculares o pseudomoleculares incluyen: los cationes de radicales de electrones impares, menos estables $M\dot{c}^+$ de un analito M; la especie protonada de electrones más estable, MH^+ , entre otros (Hanley 2013).

2.9.1.1. Impacto electrónico (EI)

Es la ionización más habitual en CG-EM. La ionización de la muestra se produce por el impacto de un haz de electrones a una energía determinada, generalmente 70 eV, generando un ion molecular y otros iones procedentes de la fragmentación de ese ion molecular. Dada la especificidad y robustez de la fragmentación en los espectros registrados, su estudio proporciona información estructural relevante. Además, es una ionización reproducible por lo cual puede haber comparación informática del espectro registrado con una biblioteca de espectros, donde se puede conseguir la identificación de las moléculas (Shrader 2014). Una desventaja es que como es una técnica fuerte puede que se pierda el ion molecular dependiendo de la naturaleza de la molécula que se está analizando, esta técnica tiene que ver con la estabilidad del analito.

2.9.1.2. Ionización química (CI)

Es un tipo de ionización blanda que apenas provoca fragmentación de la molécula y por tanto el espectro de masas consiste principalmente en el ion molecular lo que nos proporciona información sobre el peso molecular exacto de un compuesto determinado (Munson 2006). Además, es muy útil con fines cuantitativos ya que proporciona una gran sensibilidad. Es una técnica especialmente útil cuando no se

observa ningún ion molecular en el espectro de masas EI, y también en el caso de confirmar la relación m/z del ion molecular.

La técnica de ionización química utiliza habitualmente el mismo dispositivo de fuente de iones que en impacto de electrones, excepto CI utiliza una fuente de iones compacta y un gas reactivo generalmente metano, isobutano y amoniaco, a una presión de 1 mm de Hg, este gas se somete primero al impacto de electrones para producir iones de gas reactivo, la colisión de estos iones con el analito generalmente produce iones de analito protonados, esta es la ionización química positiva (PCI), el tipo más común de CI, la ionización química es el método de ionización preferido para fines de cuantificación, ya que sus características de ionización en comparación con el EI son mejores. Produce menos fragmentaciones y por tanto una mejor señal, sin embargo, no tiene una biblioteca como EI, puesto que hay un gas de por medio y se pueden generar distintos fragmentos debido a que hay una reproducibilidad en el análisis. No obstante, el gas ofrece la capacidad de controlar la fragmentación de la muestra mediante la elección de los gases reactivos adecuados. (Ghaderi 1981).

2.9.1.3. Ionización química negativa (NCI)

NCI ha mostrado una selectividad y sensibilidad muy alta para clases particulares de moléculas. Las clases de moléculas que tienen sensibilidades a NCI son moléculas que son agentes oxidantes, agentes alquilantes o ambos. Estas clases de moléculas abarcan gran parte de sustancias tóxicas que aparecen en el ambiente, por esta razón una de las principales aplicaciones ha sido la detección y análisis de sustancias tóxicas. Las inversiones de la reactividad aniónica que pasan de la fase gaseosa a la solución son ahora muy conocidas.

Las técnicas especializadas dentro del área de la EM de iones negativos de alta presión han hecho posible en los últimos años determinar las afinidades electrónicas de un gran número de moléculas (Munson 2006). En contraste con la EM de iones

positivos, la ionización química de iones negativos ha sido, hasta la última década, un método pariente pobre y descuidado.

Para ver una respuesta por esta fuente de ionización, el analito debe ser capaz de originar un ion negativo o sea estabilizar una carga negativa. No todos los compuestos llegan a hacer esto por lo que el uso de ionización química negativa proporciona un cierto grado de selectividad, se puede usar para el análisis de compuestos que contienen grupos ácidos o elementos electronegativos (especialmente halógenos: F, Cl, Br). (Shrader 2014)

2.9.1.4. Ionización por electrospray (ESI)

Es una de las ionizaciones habituales en CL-EM, es la una de las técnicas de ionización más suave. La ionización se produce aplicando una diferencia de potencial a un espray formado con el eluyente de la columna cromatográfica. Se forman iones quasi-moleculares que permiten establecer el peso molecular de la molécula (Hofstadler s.f.) (Hanley 2013).

Los iones que se forman en ESI pueden ser de carga positiva o negativa, generalmente se presentan como: (a) en modo positivo, iones de moléculas protonadas, aductos de sodio, potasio o amonio; (b) en modo negativo, iones moleculares desprotonados o aductos de formiato o acetato.

ESI utiliza energía eléctrica para ayudar a la transferencia de iones de la solución a la fase gaseosa, esta transferencia implica tres pasos: primero la dispersión de una fina pulverización de gotas de carga, seguida de evaporación del disolvente y finalmente expulsión de iones de las gotas altamente cargadas (Ho 2003).

Es ideal para compuestos termolábiles, iónicos, o compuestos que en solución adquieran multicargas (proteínas, péptidos), aunque también es válida para compuestos de baja-media a muy alta polaridad que se puedan ionizar en solución, se llegan a formar iones con múltiples cargas, lo que permite el análisis de compuestos con un peso molecular elevado (J. Rodriguez s.f.). Esta es una de las técnicas con una interfase de mayor sensibilidad y aplicabilidad. La sensibilidad depende de la concentración del analito por ello se puede trabajar con flujos bajos.

2.9.1.5. Ionización Química a Presión Atmosférica (APCI)

Es una de las ionizaciones habituales en CL-EM (se considera semejante a la ionización química en CG), esta técnica se basa en reacciones ion–molécula en fase gaseosa. La ionización requiere la volatilización del analito presente en un spray formado con el eluyente de la columna cromatográfica. Se produce la ionización del disolvente debido a una descarga eléctrica y los iones formados ionizan el analito (por transferencia de un protón) formando (M+H⁺) en modo positivo o (M-H⁻) en modo negativo. Se obtiene un espectro de masas de características similares a los obtenidos con ESI.

Generalmente se aplica a moléculas, no termolábiles, no polares, pero llega hacer válida para compuestos de baja a alta polaridad, y que contengan algún heteroátomo, generalmente moléculas sin grupos funcionales ionizables (J. Rodríguez s.f.). En esta técnica la sensibilidad depende de la cantidad de analítico, por esa razón no se deben manejar flujos muy bajos.

2.9.2. Analizadores de masa

Posterior a la fuente de iones, se tiene una mezcla de diversos iones, este componente toma los iones y los va a separar de acuerdo con su relación m/z para poder detectarlos de manera individual, para este proceso existen varios métodos.

2.9.2.1. Sector magnético

Los analizadores de sector magnético es un modelo clásico que posee varias ventajas como alta reproducibilidad, alto desempeño en un análisis cuantitativo, alta resolución y sensibilidad. También tienen limitaciones ya que no puede adaptarse a todos los métodos de ionización y el costo es mayor (Abián 2008). Este tipo de analizador es usado principalmente para compuestos orgánicos.

En este caso los iones que llegan de la fuente de iones son acelerados a una gran velocidad estos pasan por un sector magnético en el cual se aplica un campo magnético en una dirección perpendicular al movimiento de los iones, cuando esto pasa los iones se van a mover de manera circular manteniendo su velocidad.

Los analizadores de masas del sector magnético se basan en el hecho de que los campos magnéticos pueden dispersar iones en trayectorias de acuerdo con sus relaciones m/z de una manera análoga a cómo un prisma de vidrio dispersa la luz en sus diversas longitudes de onda o colores

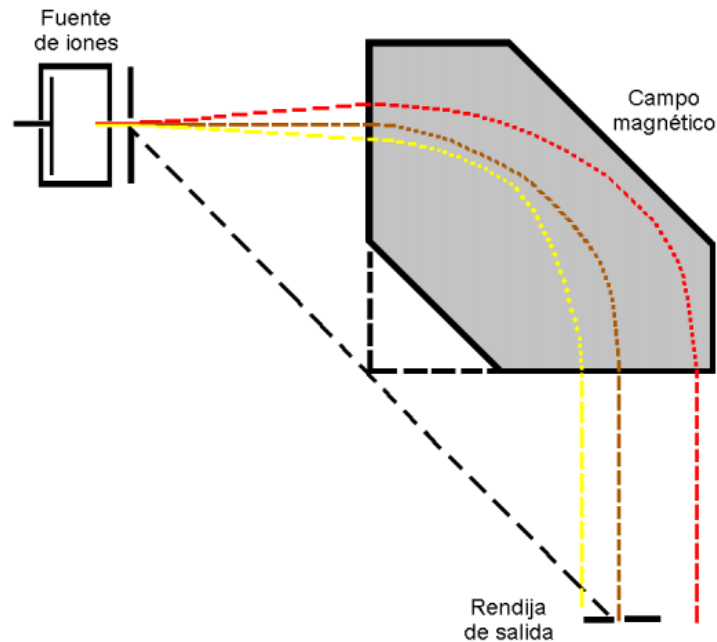


Figura 12. Analizador sector magnético

2.9.2.2. Cuadrupolo

El analizador cuadrupolar está formado por cuatro barras metálicas en forma de cilindros, que se encuentran de forma paralela entre sí y dispuestas con gran precisión sobre una circunferencia de tal forma que el haz de iones procedente de la fuente incide sobre el centro de las 4 barras para que las atraviesen de forma longitudinal para incidir en el detector. A estas barras se les aplica un potencial combinado de corriente continua y de radiofrecuencia que crean en su interior un campo denominado cuadrupolar (Harvey 2002). Estos iones, que entran en el analizador a una energía de unos pocos electronvoltios, son sometidos al efecto del campo cuadrupolar que los hace oscilar y los desvía en función de su valor m/z de

forma que para una combinación de potenciales sólo los iones en un estrecho rango de valores m/z llega a incidir en el detector.

Los analizadores de cuadrupolo actúan como filtros de iones y los espectros de masas en estos sistemas se obtienen mediante un barrido del potencial aplicado a las barras. En consecuencia, en cada instante sólo una pequeña fracción del total de iones es monitorizada mientras que el resto se desecha (Skoog 2001).

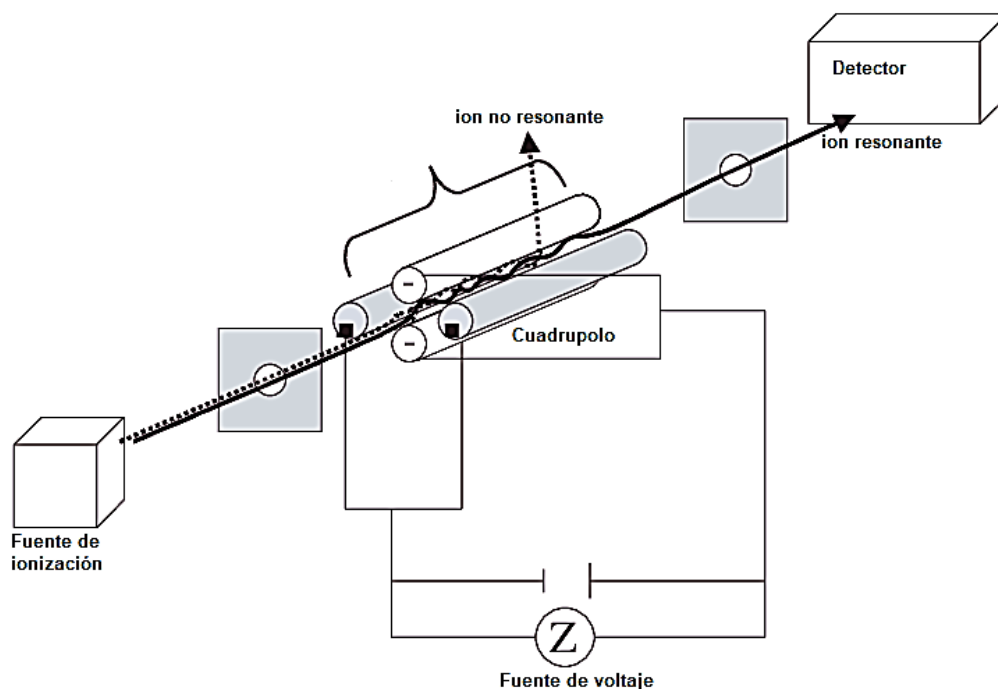


Figura 13. Esquema de funcionamiento de un cuadrupolo

2.9.2.3. Analizador de tiempo de vuelo (TOF)

En este analizador los iones son separados en función del tiempo que tardan en atravesar un tubo de vuelo de longitud conocida, el cual depende de la relación m/z . Dado que todos los iones empiezan su viaje al mismo tiempo, o al menos en un intervalo de tiempo lo suficientemente corto, los iones más ligeros llegarán al detector antes que los más pesados (Abián 2008).

Se basa en que los iones acelerados por un campo eléctrico adquieren distintas velocidades según el valor de su relación m/z y por tanto tardan distinto tiempo en recorrer una determinada distancia. Considerando constantes la carga y la energía cinética de los iones formados en la fuente, la medida del tiempo de vuelo permite determinar de forma muy precisa la masa de cada uno de estos iones (Harvey 2002). A diferencia de los sistemas de cuadrupolo, el analizador TOF separa y detecta en una escala de tiempo (tiempo de vuelo) el paquete completo de iones procedente de la fuente.

Estos analizadores tienen varias ventajas como la robustez, simplicidad, fácil acceso a las fuentes de iones, barato, con un ciclo de barrido rápido y con un rango de masas en teoría ilimitado, sin embargo, una sensibilidad y una resolución limitadas.

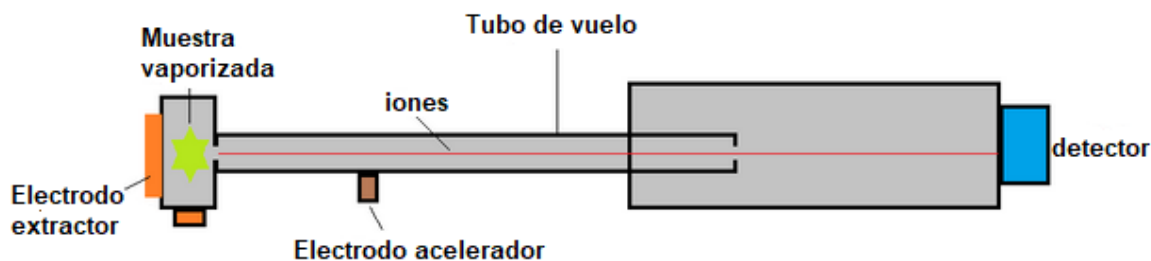


Figura 14. Esquema de un analizador TOF

2.10. Espectrometría de masas en tándem

El término “tándem” indica el uso de una segunda etapa de análisis de masas (Camilo 2004). Consiste en una configuración de dos analizadores M_1 y M_3 encargados de separar los distintos iones que pasan por ellos en función de su relación m/z , separados por una cámara de colisiones en donde se llevará a cabo la fragmentación, de los iones provenientes de M_1 , dando lugar a la obtención de iones específicos en una mezcla compleja para obtener información estructural sobre un ion específico (figura 15), el gas de colisión suministrado a la celda generalmente es He, Ar o N_2 (Stashenko 2010). La ventaja de utilizar masas tándem

es que puedes variar el modo de adquisición de los analizadores y obtener más información.

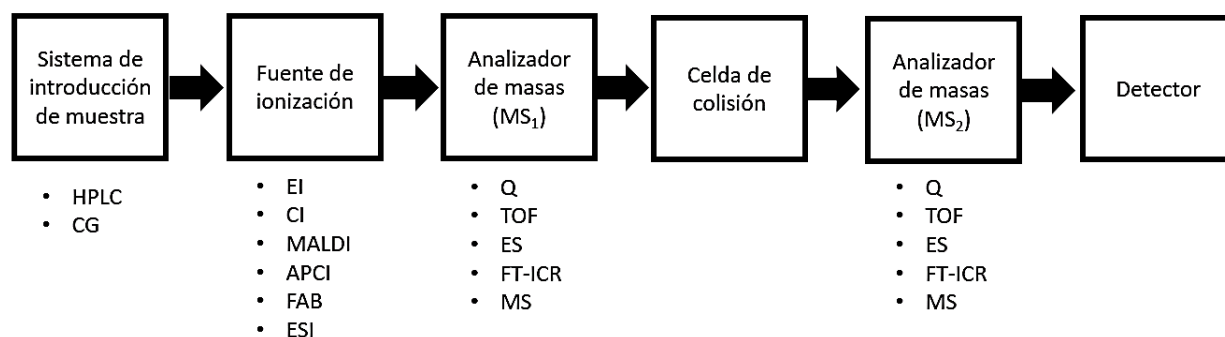


Figura 15. Esquema general de un sistema EM/EM (Fernández-Lainez 2009)

Los experimentos que se pueden realizar son:

Escaneo de ion-precursor, este permite localizar a todos iones precursores o padre que pueden generar un ion-producto. En este caso, el primer analizador (M_1) opera en el modo *SCAN* en donde se hace el barrido completo con una masa mayor a la del ion producto, saliendo de este analizador pasan por la cámara de colisión en donde se fragmentan y pasan al segundo analizador M_2 que se encuentra en modo *SIM*, donde solo pasan los iones producto con la masa seleccionada.

Escaneo de ion-producto, en este caso en primer analizador (M_1) opera en modo *SIM* en donde se selecciona el ion precursor de interés y solo deja el paso de este, posteriormente pasa a la celda de colisión en donde se fragmentan y llegan al siguiente analizador (M_2) que opera en modo *SCAN* dejando pasar todos los iones producto de este ion (Camilo 2004).

Estos 2 experimentos se hacen para seleccionar los iones más estables para posteriormente realizar el experimento de monitoreo de reacciones múltiples (MRM) que consiste en los dos analizadores de masas se coloquen en un modo de adquisición en *SIM*, con este modo se detectan de forma específica cada uno de los

compuestos que nos interesan eligiendo correctamente el ion en M1 y M2, como el segundo analizador solo permite el paso de los iones seleccionados (más abundantes) que se identifican previamente con ayuda de los 2 experimentos anteriores, hace que se logre identificar incluso las moléculas más difíciles de analizar (Stashenko 2010).

La espectrometría de masas en tándem tiene la característica de producir patrones de fragmentación selectiva, que contiene información estructural valiosa, para cada analito, asimismo, las pérdidas de masa específicas (transiciones) pueden utilizarse para la calificación y cuantificación que conducen a una mayor selectividad, usando correctamente sus ventajas, se puede diseñar un detector de masas específico, altamente selectivo y sensible (Fernández-Lainez 2009).

Además, las pérdidas de masa específicas se pueden utilizar para la identificación y cuantificación que conducen a un aumento de la selectividad, con esto podemos tener seguridad que el ion que estamos viendo es de la molécula de interés y no proviene de otra parte u otro compuesto, por lo tanto, el análisis se vuelve significativamente más selectivo, y permite corroborar la presencia del compuesto de interés en mezclas complejas.

La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem es un método analítico que es utilizado para detectar y cuantificar analitos a niveles ambientales traza, asimismo, sirve para la detección de medicamentos y pesticidas. Este acople ofrece varias ventajas relacionadas con su alta sensibilidad y eficiencia, además que dispone de métodos multi-analitos, sin embargo, este acople tiene inconvenientes debido a que el resultado del análisis está influenciado por la matriz lo cual genera una incertidumbre de medición.

2.10.1. Triple cuadrupolo

En un sistema típico de cuadrupolos en tándem, hay tres cuadrupolos configurados de manera lineal, a menudo llamados "triple-quadrupole". El ion analito de interés

(ion precursor) se selecciona en masa por el primer cuadrupolo (Q1) y se deja colisionar con un gas de colisión (generalmente argón) en una segunda celda de colisión de cuadrupolo (q2), donde los iones precursores se activan por colisión y sufren una mayor fragmentación. Este proceso se conoce como disociación inducida por colisión (CID). Los iones hijos resultantes están relacionados con la estructura molecular de los iones y pueden ser monitoreados por un tercer analizador de masas cuadrupolo (Q3) que proporciona información estructural de los iones moleculares (Ho 2003).

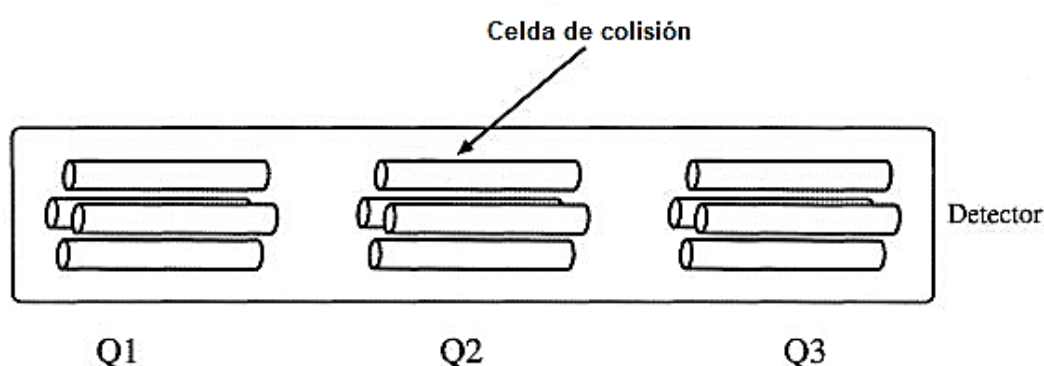


Figura 16. Diagrama de un sistema de triple cuadrupolo

2.10.2. QTOF

En el caso del QTOF trabaja con analizadores distintos, un cuadrupolo y un TOF, por lo que constituye un instrumento híbrido. Este diseño es similar al de un triple cuadrupolo, solo que el último cuadrupolo se sustituye por un TOF. De esta manera, una vez fragmentado el ion precursor en la celda de colisión, todos los iones producto son determinados mediante el TOF. La posibilidad de obtener el espectro de iones producto con masa exacta aumenta la eficacia de los datos (Harvey 2002).

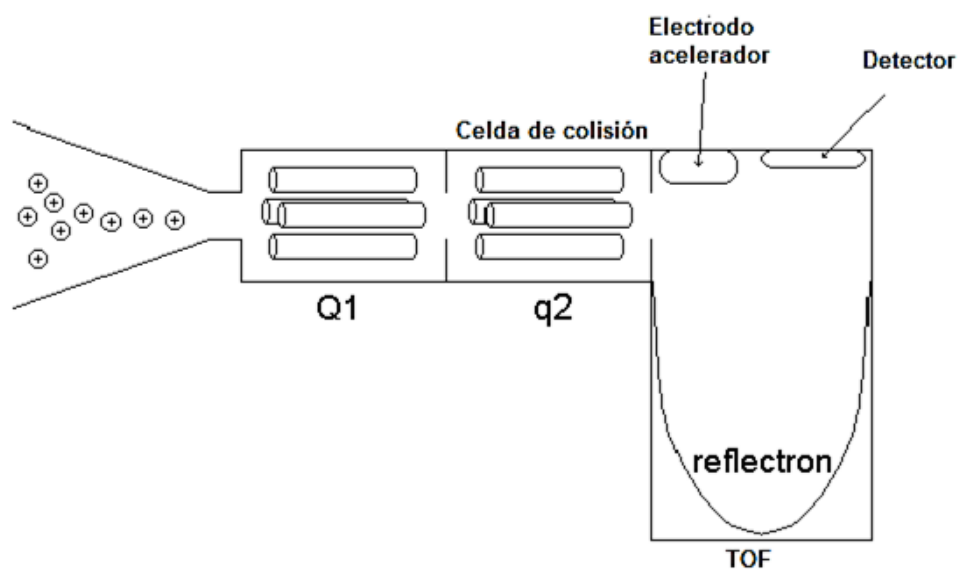


Figura 17. Esquema de un sistema QTOF

La ventaja de los instrumentos QTOF es su elevada sensibilidad de modo de barrido de iones), su velocidad de barrido, su resolución y la posibilidad de obtener medidas con una masa exacta de los iones detectados. Estas características que lo hacen ideal para el análisis cualitativo, tanto para la búsqueda de moléculas desconocidas, así como para la elucidación estructural. Sin embargo, su aplicación en el campo cuantitativo es limitado debido a su bajo rango lineal (apenas dos órdenes de magnitud) y su menor sensibilidad con respecto a instrumentos cuadrupolares monitorizando un ion (Abián 2008).

3. METODOLOGÍA

3.1. INVESTIGACIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1.1. Diseño y estrategia de búsqueda

Se ha realizado una búsqueda sistemática de documentos, artículos y estudios científicos en las principales bases de datos bibliográficos disponibles en internet como PubMed/MEDLINE, redalyc, SCOPUS, ScienceDirect, google scholar, Springer Link y manualmente a través de Internet en revistas y organismos públicos como la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA). También se realizó búsqueda bibliográfica de las técnicas analíticas en libros, enciclopedias, artículos e incluso en sitios de venta de los equipos analíticos.

Principalmente se centró la búsqueda en artículos que fueran investigaciones ambientales y que tuvieran que ver con el análisis de la 9,10-Fenantrenoquinona por técnicas cromatográficas. La búsqueda se hizo tanto en español como en inglés, las principales palabras para la búsqueda fueron: Anlysis of/ determinación Phenanthrenequinone; Phenanthraquinone; 9,10-Phenanthraquinone; 9,10-Phenanthrenequinone; Phenanthroquinone; 9,10-Phenanthroquinone AND gas chromatography, AND liquid chromatography.

3.1.2. Criterios de inclusión y exclusión

En la búsqueda literaria, revisiones sistemáticas y estudios científicos se incluyeron todo tipo de documentos que tuvieran metodologías, resultados y recomendaciones sobre las técnicas analíticas para la determinación de la quinona, las restricciones respecto al tiempo fueron 10 años, sin embargo, se incluyeron artículos con un mayor rango de tiempo debido a la escasa información.

El principal criterio de exclusión de artículos fue que no incluyeran información sobre técnicas analíticas para el análisis de la quinona principalmente técnicas cromatográficas.

3.1.3. Extracción de datos

Tras la búsqueda se localizaron 20 artículos que son relevantes para el objetivo de esta investigación. (excluyendo la sección del marco teórico)

Para la elección de artículos se revisaron los resúmenes, en caso de ser necesario se examinaron los artículos completos con el fin de decidir si la información que contenían estaba o no relacionada con este trabajo.

3.1.4. Análisis de datos

La información analizada se estructuró en 4 apartados principales: análisis térmico, derivatización, análisis por CG y análisis por CL, y 2 apartados complementarios: fuentes de ionización y derivatización. De las revisiones se extrajo información sobre los autores, año de la revista en la que esta publicado, año de publicación, país donde se realizó el estudio, tipo de estudio, resultados, conclusiones y recomendaciones.

3.2. SECCIÓN EXPERIMENTAL

3.2.1. Acondicionamiento de material

El material de vidrio se lavó previamente con jabón neutro y abundante agua, se realizó un enjuague con agua desionizada y secó a temperatura ambiente, una vez seco se limpió con acetona y se horneó durante 24 horas a 180°C, posteriormente el material se envolvió con papel aluminio (previamente horneado) y se almacenó en un recipiente limpio. Los viales e insertos utilizados fueron lavados exhaustivamente, algunos de ellos fueron nuevos y también fueron horneados previamente. El material volumétrico siguió el mismo procedimiento de limpieza con excepción del horneado. La preparación de disoluciones se realizó en la campana para evitar la contaminación de los estándares.

3.2.2. Preparación de muestras de trabajo

Se preparó un estándar de con una masa aproximada de 0.00010 g, ya que la balanza analítica utilizada mide hasta 5 cifras después del punto decimal, se decidió así para encontrarse 10 veces arriba del error y no tener una concentración mayor, para tratar de que los análisis sigan siendo lo más parecido a la concentración traza en la que se encuentra la molécula en el ambiente, se aforó en un matraz de 1 mL con tolueno, llegando a una concentración de 100,000 ng/mL (solución stock), se colocó en un matraz ámbar y se agitó en un vortex posterior a esto se realizaron 2 disoluciones, para la disolución 1 se tomaron 100 μ L de la solución stock con una micro jeringa y aforando en un matraz de 1 mL, obteniendo una concentración de 10,000 ng/mL, posteriormente de la disolución 1 se tomaron 100 μ L y se aforó a 1 mL obteniendo una concentración de 1,000 ng/mL, todas las disoluciones se realizaron en la campana de extracción para evitar contaminación e interferencias y se colocaron en viales ámbar (figura 18), los viales se almacenaron a 4°C hasta su análisis y antes de llevarlos al análisis cromatográfico fueron previamente sonicados para la disolución fuera homogénea.

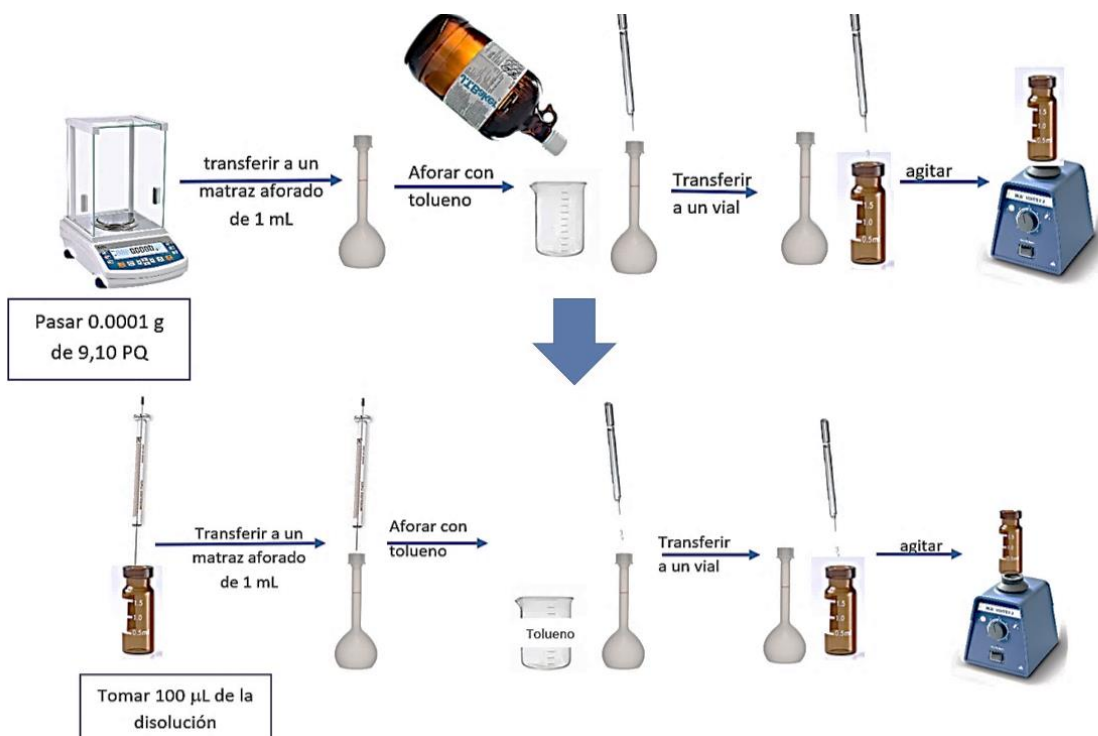


Figura 18. Esquema de la preparación de las disoluciones de trabajo

3.2.3. Análisis instrumental

3.2.3.1. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

El análisis de los estándares se realizó en 2 equipos diferentes, para los análisis preliminares se realizó mediante un sistema de cromatografía de Gases (CG) 7890B (Agilent Technologies) acoplado a un espectrómetro de Masas Triple Cuádruplo (QQQ) 7000D (Agilent Technologies), usando solo el sistema de masas simple, con un método de ionización de impacto iónico de 70 eV en modo SCAN, Columna HP5Ms de 30 m de longitud, 0.250 mm de diámetro interno y 0.25 μm de grosor de película interna. (figura 19a). También se utilizó un sistema de cromatografía de gases (agilent Technology) 6890 acoplado a un detector de masas 5973 N, en un modo de ionización por impacto electrónico a 70 eV, (figura 19b)

En ambos casos se inyectó 1 μL en modo splitless, con una modalidad de escaneo completo (SCAN). La rampa de temperatura inicio en 40°C- 0 Minutos, aumento 20°C/min hasta 110°C manteniéndose 0 min, después aumento 10°C/min-300°C por 3 min, finalmente aumento 20°C/min hasta llegar a 310°C-0 min.



Figura 19. a) sistema de cromatografía de gases (cg) 7890b (Agilent technologies) acoplado a un espectrómetro de masas triple cuádruplo (QQQ) 7000d (Agilent technologies); b) sistema de cromatografía de gases (Agilent technology) 6890 acoplado a un detector de masas 5973 N, en un modo de ionización por impacto electrónico

3.2.3.2. Análisis directo

Se utilizó un espectrómetro de masas de alta resolución JMS-700 JEOL (figura 20), en un modo de ionización positiva, introducción directa, energía de ionización de 200 eV, el gas utilizado fue metano, y la temperatura de inyección fue de 270°C. °C.



Figura 20. Espectrómetro de Masas de Alta Resolución JMS-700 JEOL (SECTOR MAGNETICO)

3.2.4. Optimización de condiciones

3.2.4.1. Ionización química (CI)

Se realizaron experimentos en ionización química de un estándar con una concentración conocida para la determinación de la molécula.

3.2.4.2. Blanco

Se realizó la inyección de un blanco (disolvente) antes del análisis de la 9,10-Fenantrenoquinona para asegurarnos que no se encontraran señales e interferencias lo cual indica que hubo una preparación óptima del material, y el disolvente no tiene impurezas y para evaluar la línea base sin muestra.

3.2.4.3. Pruebas de inyección

Se inyectó un estándar de concentración conocida de la 9,10-Fenantrenoquinona a diferentes temperaturas de inyección hasta tener la temperatura optima de inyección 9,10-Fenantrenoquinona presente sus iones que la identifican (208,180,151,152 m/z), para esta sección se utilizó una rampa de temperatura determinada (Temperatura inicial 40°C – 0 min, 20°C/min-110°C-0 min, 10°C/min-300°C – 3 min, 20°C/min- 310 °C/min).

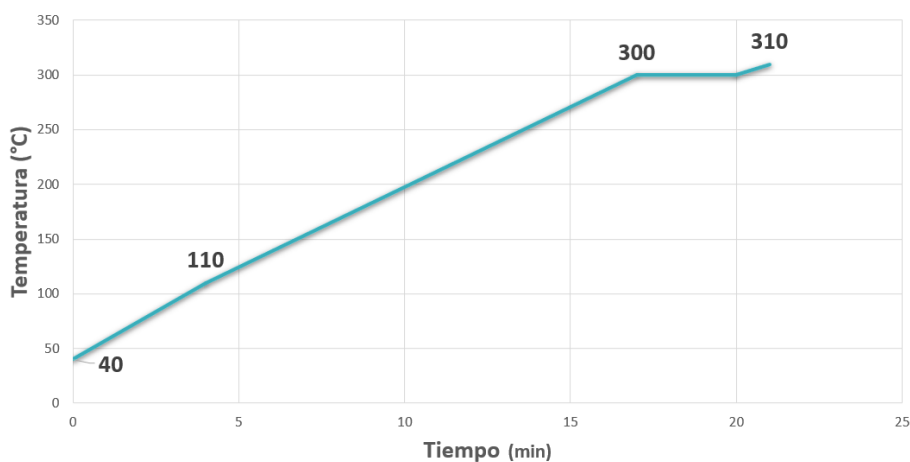


Figura 21. Rampa de temperatura para las pruebas de inyección

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS DE INVESTIGACIÓN BIBLIOGRÁFICA Y TRABAJO EXPERIMENTAL

4.1. Estabilidad y análisis térmico

En estudios térmicos se han reportado que las *orto*-quinonas son menos estables que las *para*-quinonas, esta menor estabilidad se puede explicar basándose en las interacciones intermoleculares de los grupos carbonilo adyacentes esto quiere decir que los grupos carbonilos se encuentran más cerca y como consecuencia se incrementa su repulsión favoreciendo su degradación en procesos térmicos (Sousa 2012) (Geissman 1973). La 9,10-Fenantrenoquinona es una quinona que tiene sus grupos carbonilo en posición *orto*, por lo que sus grupos carbonilos experimentan una más fuerte repulsión que sus homologas las *para*-quinonas, estos grupos concentran una alta densidad electrónica derivada del átomo de oxígeno, esto podría explicar su degradación y las dificultades durante su análisis por cromatografía de gases. En un estudio térmico mediante el análisis termogravimétrico - acoplado a calorimetría diferencial de barrido (TGA-DSC) se encontró que esta quinona es estable por debajo 200°C, (figura 22) después de esto hay una pérdida de masa total hasta llegar a los 250°C, en la curva de DSC el primer pico que se observa a 208.5°C se atribuye a un proceso de fusión, en 260°C se observa una superposición de picos a lo que asocian a que están ocurriendo 2 eventos simultáneos que se puede deber a una evaporación junto a una descomposición térmica, con este experimento se encontró que su presión de vapor es 2.33×10^{-6} mmHg (Sousa 2012). Estos resultados indican que es térmicamente estable en 215-250°C, por lo que es razonable sugerir su determinación por cromatografía de gases configurando el inyector dentro de ese rango de temperatura.

En base a los resultados del análisis termogravimétrico (Sousa 2012) realizó experimentos en Headspace en CG-EM para evaluar la estabilidad de la quinona en soluciones de acetonitrilo en condiciones cromatográficas, se realizó una serie de inyecciones de un estándar de la 9,10-FQ a temperaturas cercanas a los eventos

térmicos identificados previamente, como se muestra la figura 23 no hay repetitividad en inyecciones sucesivas lo que sugiere que está ocurriendo una degradación térmica como se mostró en el análisis termogravimétrico.

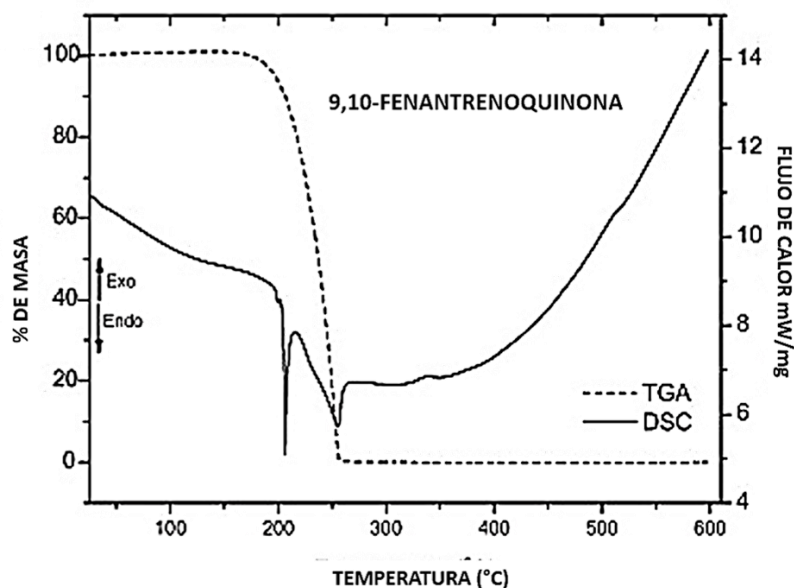


Figura 22. Curvas simultáneas de TGA-DSC de la 9,10 fenantrenoquinona (Sousa 2012)

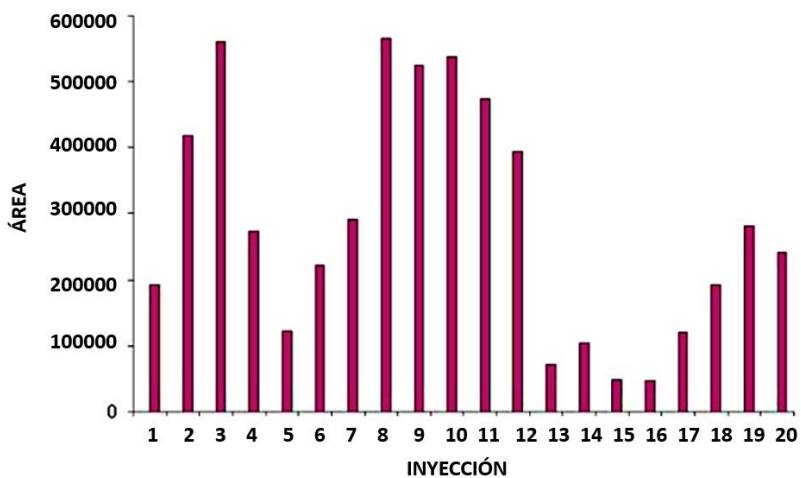


Figura 23. Inyecciones sucesivas de soluciones de quinonas (Sousa 2012)

4.2. Derivatización de la 9,10-Fenantrenoquinona

Pocos estudios de aerosoles atmosféricos se centran en quinonas debido a las dificultades y retos del análisis. Los desarrollos de métodos analíticos recientes incorporan la derivatización química para que contribuya a mejorar la detección de las quinonas a las metodologías de cromatografía de gases-espectrometría de masas y cromatografía líquida de alto rendimiento-espectrometría de masas (Jakober 2007), como resultado de su degradación térmica, dado a que las quinonas derivatizadas son más estables térmicamente que las originales.

La complejidad química, sus diversas propiedades y concentraciones de 9,10-FQ ha involucrado el desarrollo e implementación de diversos métodos analíticos, para evitar su degradación y disminuir las interferencias, la técnica utilizada para su análisis ha sido la cromatografía, pero debido a su baja presión de vapor y su descomposición térmica como se muestra en la sección anterior, se ha tenido que recurrir a la derivatización para mejorar la volatilidad o alguna otra propiedad antes del análisis por cromatografía y sus detectores, es por esta razón que no se ha logrado obtener un análisis concreto que ayude a monitorear la quinona de manera regular, ya que existen diversos métodos con distintos resultados, los cuales han llegado a ser eficientes ya que la quinona derivatizada se ha llegado a determinar (Cho 2004) (Chung 2006).

Un método de derivatización frecuentemente empleado es el de Cho et al., 2004, quienes describen el análisis CG-EM de derivados de quinona referente a la acetilación, las quinonas son modificadas mediante una mezcla Zinc y anhídrido acético, como resultado se obtienen sus derivados de diacetilo (Figura 24). En este caso los carbonilos son sustituidos por AcO, esta modificación provoca que en la molécula disminuya la repulsión y la degradación, por lo que será térmicamente más estable favoreciendo el análisis por CG. Esta derivatización se mejoró significativamente por Chung et al., 2006 significativamente en los límites de detección, donde su repetitividad y reproducibilidad tuvieron variaciones entre 2 y 22%, la ampliación de esta metodología para medir 12 quinonas demostró que no todas las quinonas podrían convertirse en sus derivados de diacetilo.

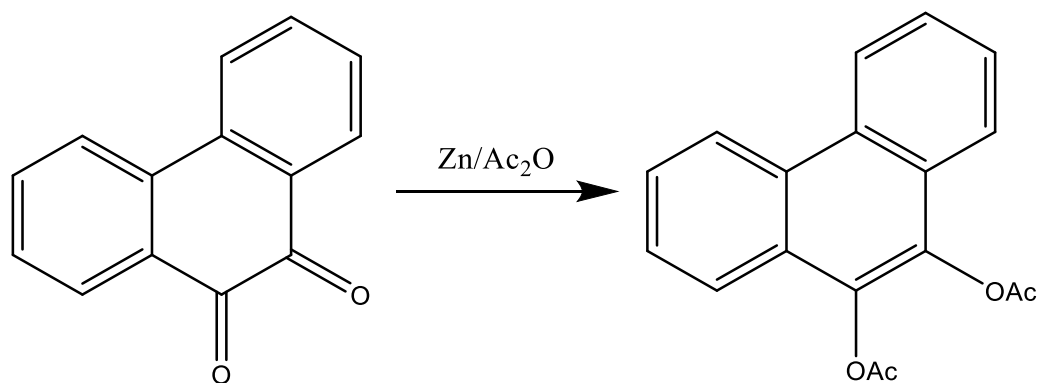


Figura 24. Derivatización 9,10-Fenantrenoquinona (Cho 2004)

Saborit et al. 2013 utilizó una versión modificada de la metodología de Cho et., al 2004 y Chung et al., 2006 para incluir quinonas no reportadas y combinar la extracción y el análisis para analizar HAP y quinonas del mismo sustrato, este implica dos adiciones del reactivo de acetilación y el catalizador, mientras que Chung et al., 2006 solo repitió la adición del catalizador, pero no el agente de acetilación. Sin embargo, la adición de dos porciones de zinc implica que la apertura del sistema reaccione antes de que se complete el proceso, lo que puede generar pérdidas por volatilización

Se ha implementado también un método que se basan en la reducción de las quinonas mediante gránulos zinc (como agente reductor) y ditioneitol (DTT), generando derivados de diol, posteriormente se convirtieron en sus derivados sililados introduciendo dos grupos de trimetilsililo (TMS) (figura 25) (Toriba 2016). Comparada con la quinona inicial, los grupos silil que se forman son más volátiles, menos polares y más estables térmicamente.

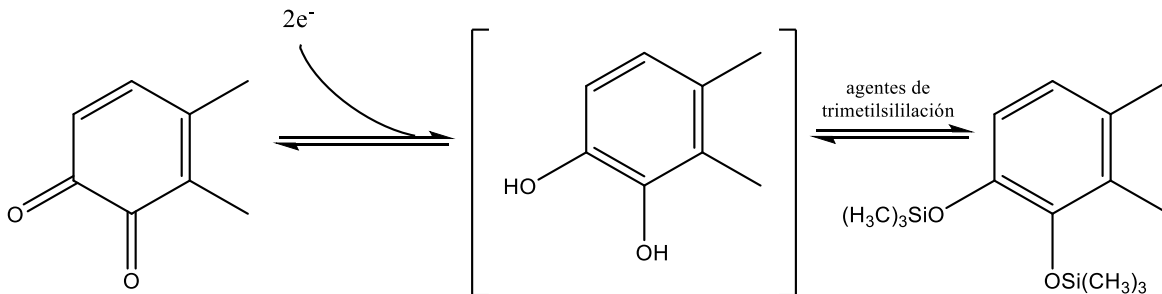


Figura 25. Reacción de derivatización reductiva one-pot con trimetilsilil sobre HAPQ's (Toriba 2016)

Jakober et al., 2007 midió las emisiones de 9 quinonas de vehículos de motor de gasolina y diésel, el estudio describe un procedimiento de derivatización complicado ya que debido a los grupos funcionales polares presentes en las quinonas, se emplearon múltiples reactivos de derivatización para facilitar el análisis químico. La derivatización de carbonilo para generar oximas se realizó usando clorhidrato de O-(2,3,4,5,6 pentafluorobencil) hidroxilamina (PFBHA). La generación de derivados con PFBHA, mejoró la detección y la sensibilidad y elimina algunos problemas encontrados en la reacción de acetilación, debido a que no hay calentamiento o apertura del sistema después de la adición del reactivo. Por otro lado, el tiempo de reacción de 24 horas es excesivamente largo en comparación con otros métodos.

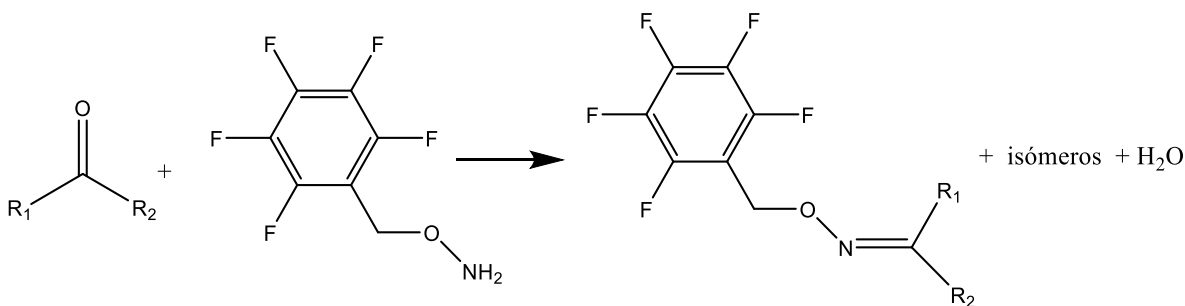


Figura 26. Reacción química de carbonilos con PFBHA para formar sus correspondientes isómeros de oxima (Jakober 2005)

En otros estudios han analizado la 9,10-Fenantrenoquinona mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia para el análisis de varios compuestos en matrices complejas que son relativamente poco volátiles y/o sensibles a la temperatura.

Se han implementado diversas técnicas de derivatización para hacer que la molécula resultante presente diferentes propiedades para poder analizarlas con distintos detectores, una derivatización implementada es con benzaldehído como reactivo de derivatización en presencia de acetato de amonio para dar 2-fenil-1H-fenantro [9,10-d] imidazol fluorescente y poderla analizar mediante HPCL acoplado a fluorescencia (figura 27) (Kishikawa 2004) (Tian 2013), ya que 9,10-FQ muestra una fluorescencia débil.

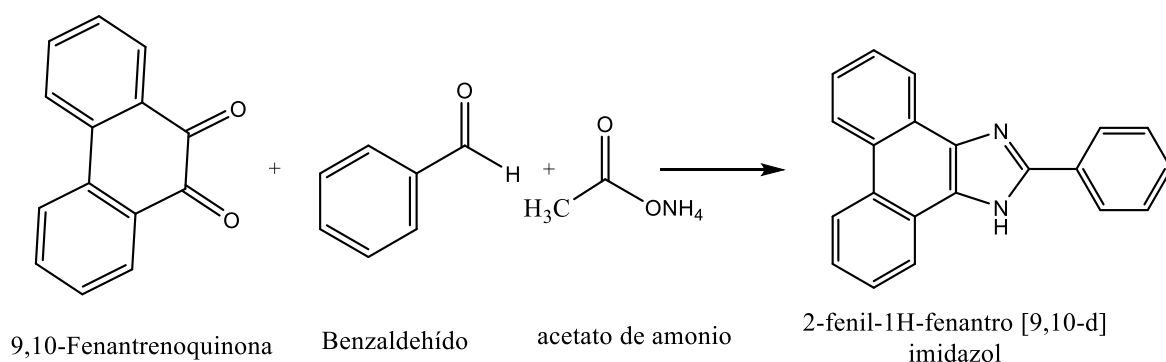


Figura 27. Esquema de reacción para la derivatización por fluorescencia de fq con benzaldehído y acetato de amonio (Kishikawa 2004) (Kishikawa 2006)

Por otro lado Kishikawa et al., 2011, realizó una evaluación de 21 tipos de aldehídos aromáticos en presencia de acetato de amonio para valorar la capacidad como reactivo de derivatización de fluorescencia para la 9,10-FQ, se observó que el 4-carbometoxibenzaldehído es un reactivo de derivatización adecuado debido a que muestra una intensidad de fluorescencia 1,9 veces más fuerte en comparación con el benzaldehído y el máximo de longitud de onda de emisión se observó en la región de longitud de onda más larga entre los aldehídos aromáticos que se evaluaron

(fluorescencia se fijó en 465 nm con 370 nm de longitud de onda de excitación), el producto fluorescente es 2- (4-carbometoxi) fenil-1Hfenantro [9,10-d] imidazol proporciona una buena sensibilidad.

Aunque el método de (Kishikawa 2004) (Kishikawa 2011) permite la determinación sensible de la quinona en partículas en suspensión en el aire, implican el procedimiento de derivatización pre- columna lo cual fue moderadamente laborioso y lento antes de la inyección al sistema HPLC.

Teniendo en cuenta la simplicidad y rapidez del método, un procedimiento de derivatización posterior a la columna es más favorable para el análisis de rutina de muestras ambientales, Kishikawa et al., 2010 descubrió que la 9,10-FQ reaccionaba rápidamente con 2-aminotiofenol (2-ATHP) para formar un derivado altamente fluorescente que emite fluorescencia verde a 510 nm (figura 28), favoreciendo un procedimiento de derivatización pos-columna y detección de fluorescencia.

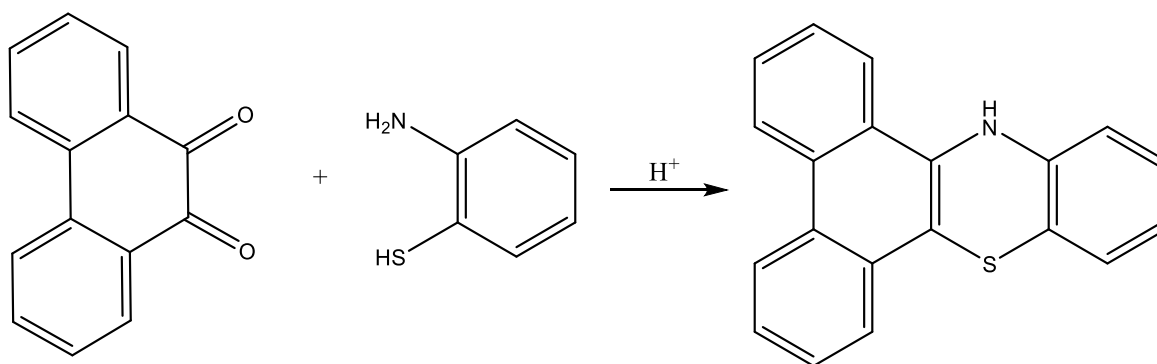


Figura 28. Estructura sugerida del derivado fluorescente obtenido por la reacción de PQ con 2-ATHP (Kishikawa 2010)

4.3. Fuentes de ionización

4.3.1. Para CG-EM

La ionización por impacto electrónico es la técnica más frecuentemente reportada en la literatura para la determinación de la 9,10-FQ por CG-EM ya que posee una buena reproducibilidad y una base de espectros de masas bastante amplia para corroborar la estructura de la molécula, en la figura 29 se puede observar un espectro extraído de la NIST de un estándar de la 9,10-Fenantrenoquinona, en donde se puede observar los iones propuestos más estables de la molécula con su respectiva m/z . La figura 30 muestra los fragmentos propuestos con sus respectivas pérdidas, sin embargo, debido a las propiedades químicas de la molécula es posible que no sea la interfaz más adecuada, ya que esta es ideal para compuestos muy volátiles y la 9,10-FQ es clasificada dentro de las moléculas de mediana volatilidad a no volátil y es térmicamente estable en un solo rango específico de temperatura como se puede observar en la sección anterior.

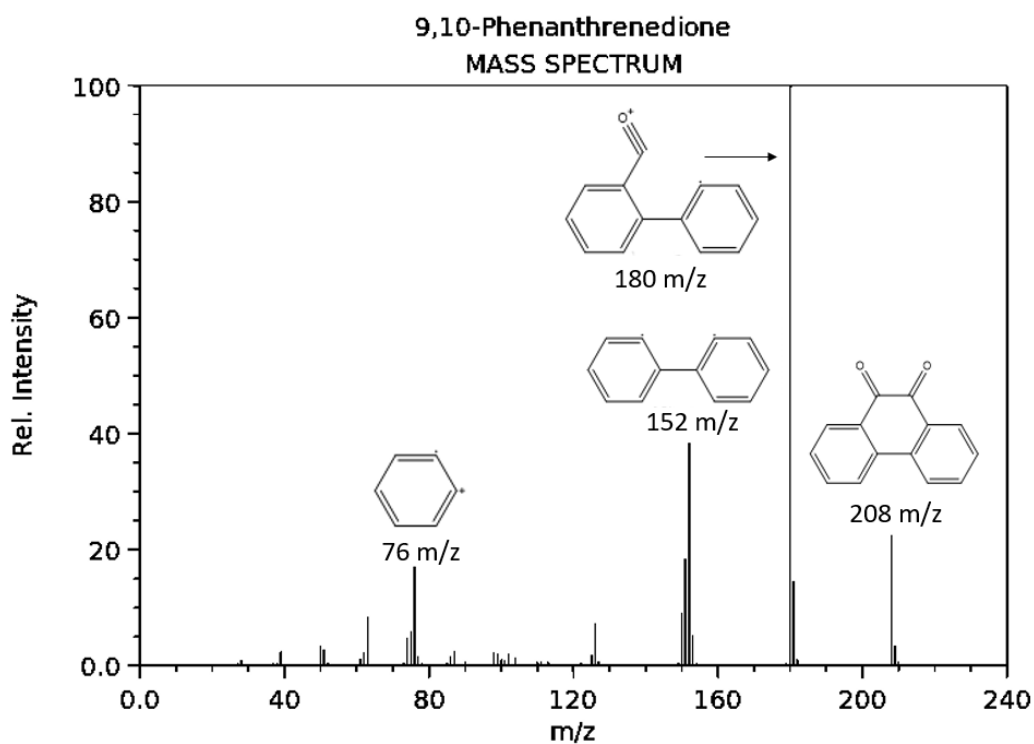


Figura 29. Espectro de masas de 9,10 PQ; con una técnica de impacto electrónico 70eV

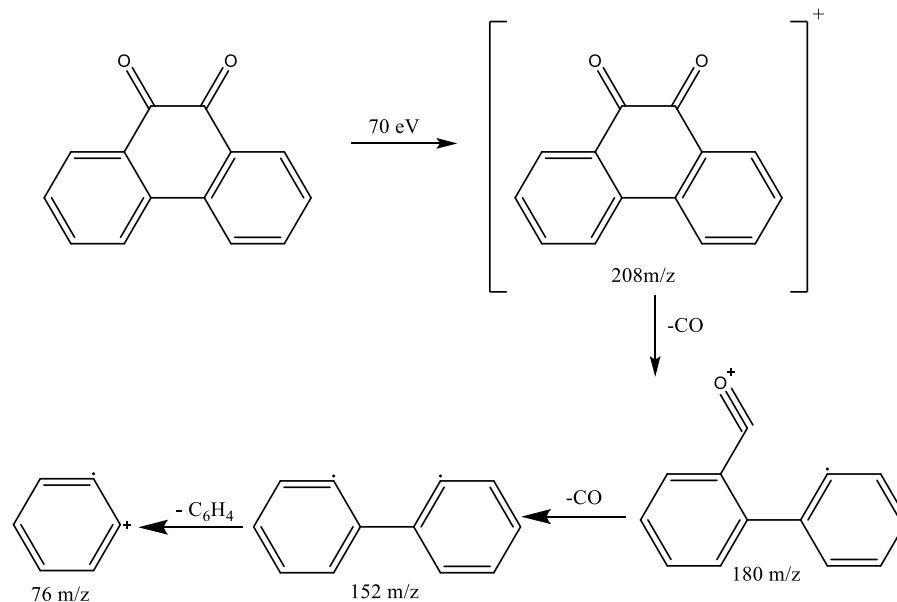


Figura 30. Fragmentos propuestos del análisis de 9,10-FQ

Una alternativa al impacto electrónico es la ionización química, en este sentido (Jakober 2007) utilizo modos de ionización de electrones y ionización química de metano. Las pruebas preliminares en este trabajo confirmaron la estructura de la quinona con un estándar, sin embargo, la abundancia de las señales fue bastante baja. En el espectro que se muestra en la Figura 31 muestra el ion cuasi molecular 209 m/z correspondiente al $PM+1$ ($M+1$) y el ion más estable que identifica a la molécula, lo que nos sugiere la revisión bibliográfica 180 m/z , y el ion que se encontró en mayor abundancia con una m/z 83 posiblemente es perteneciente al disolvente utilizado.

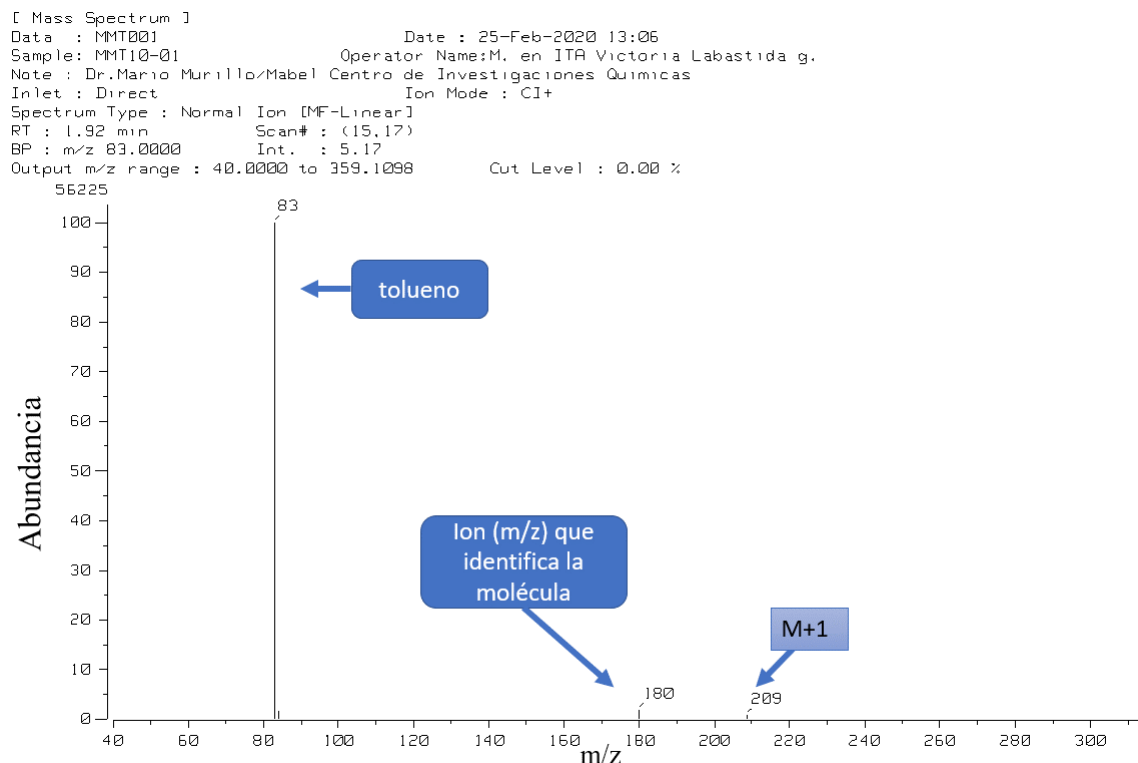


Figura 31. Cromatograma en un modo de ionización química (+)

4.3.2. Para CL-EM

La metodología más reportada para el análisis de esta quinona es mediante el uso de cromatografía de líquidos acoplada a masas con interfaz de ionización química a presión atmosférica (APCI), ya que generalmente se aplica a moléculas, no termolábiles, no polares (J. Rodríguez s.f.). En diversos estudios se ha utilizado CL-EM/EM equipado con APCI, algunos han optado por operar en un modo de iones negativos (Delhomme 2008; Wnorowski 2017; Mirivel 2010) y otros estudios han operado en un modo de iones positivos (Lintelmann 2005; Delhomme 2008; Asahi 2014), esto es debido a que APCI es más efectiva que el modo ESI para la ionización de quinonas que provienen de HAP (Delhomme 2008).

No obstante, que ESI es la interfaz más empleada para los análisis por CL-EM, en este caso no es así ya que es utilizada para compuestos termolábiles, iónicos, o compuestos que en disolución adquieran multicargas como proteínas o péptidos.

4.4. Determinación por Cromatografía de gases

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) ha sido una de las técnicas más utilizadas en la determinación de sustancias orgánicas en matrices complejas. Sin embargo, la mayoría de los estudios que utilizan cromatografía de gases para la determinación de quinonas sugieren el uso de derivatización para evitar la descomposición por calentamiento

El análisis de la 9,10-FQ es frecuentemente realizado por cromatografía de gases aplicando una derivatización, sin embargo, la información de la determinación directa por esta técnica es contradictoria ya que la principal limitación está relacionada con la descomposición térmica. Como se observó en la sección 4.1 la 9,10-FQ tiene una baja estabilidad térmica, sin embargo, es detectada por CG-EM cuando la temperatura de la columna está a 231°C, revelando así la determinación directa de esta quinona (Jakober 2007).

En este estudio se realizaron análisis preliminares sin derivatización en el equipo de CG-EM de triple cuadrupolo en modo simple. Los cromatogramas obtenidos no muestran señales lo cual puede indicar una degradación de la quinona (Figura 32). En el espectro extraído mostrado en la figura 33 se exhibe un ion de 91 m/z que posiblemente asociado al disolvente seleccionado (tolueno), con base a su fragmentación y sus respectivas pérdidas mostradas en la figura 34.

Teniendo en cuenta que no se encuentra ningún ión con m/z correspondiente a la 9,10-FQ e incluso se pueden observar iones con m/z mayores a la del PM de la quinona, se sugiere que quinona aparentemente se está degradando, aunque no se observan señales de los fragmentos producidos por la degradación o existe alguna contaminación.

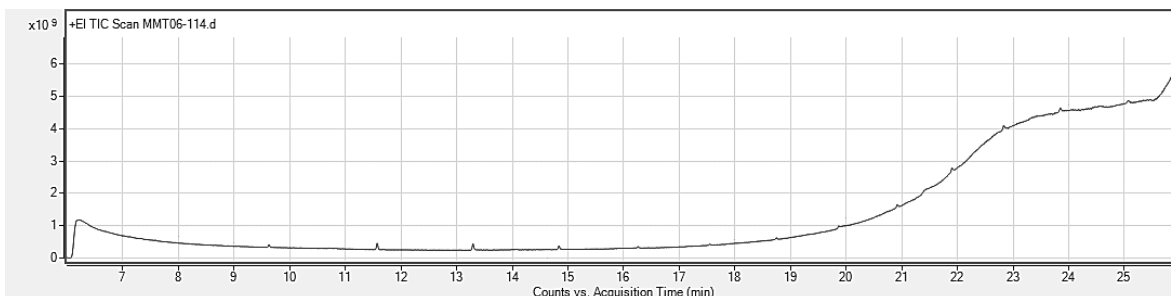


Figura 32. Cromatograma del estándar de la 9,10-FQ obtenido con una temperatura de inyección de 210°C

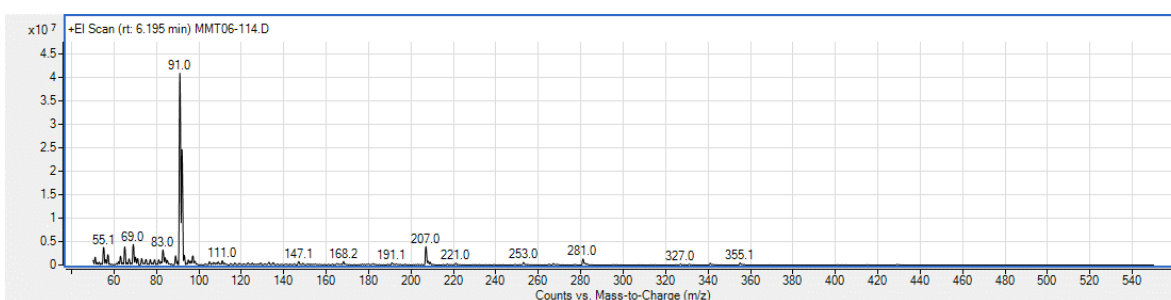


Figura 33. Espectro de masas extraído del cromatograma con un Temperatura de inyección de 210°C a un Tiempo de retención de 6.195 min

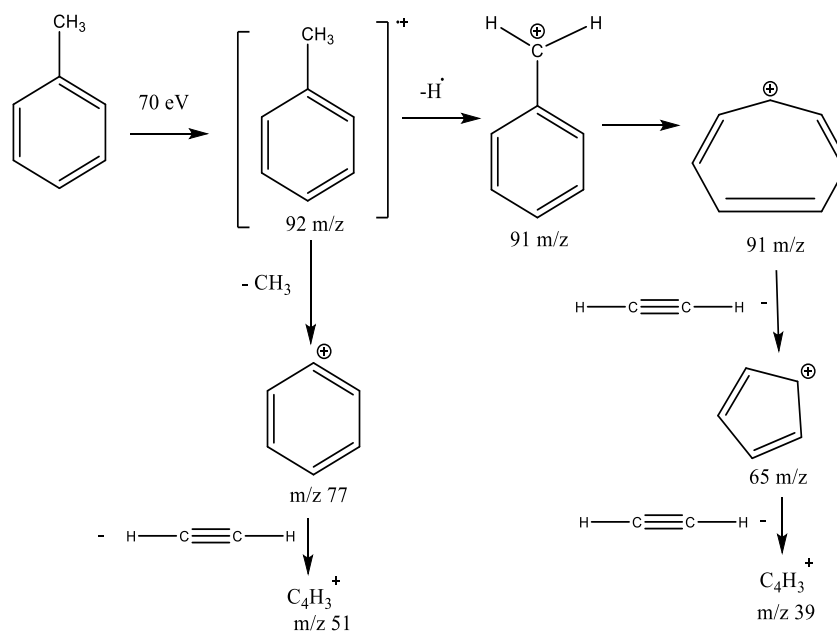


Figura 34. Fragmentación del tolueno (Ege 2000)

Se realizaron análisis en un rango menor de temperatura de inyección (150°C-200°C) en el equipo de CG-EM en donde se inyectó un blanco del disolvente (figura 35), en el cual se puede observar que se llevó a cabo una preparación óptima del material, posteriormente se inyectó el estándar de la quinona (figura 36) en el cual se observa una señal muy abundante en el tiempo de retención de 19 min aproximadamente, lo cual se especuló que se trataba del compuesto de interés.

La extracción del espectro de masas verifica la presencia del ion de 180 m/z que identifica a la molécula en base a la revisión bibliográfica, sin embargo, al mismo tiempo se identifican iones con una m/z más grande al PM de la molécula de interés. Esta diversidad sugiere una superposición de interferencia; el contraste del espectro experimental contra el espectro de la biblioteca de NIST muestra la presencia de moléculas diferentes, lo que sugiere el arrastre de un compuesto presente en la columna, esto sucede con todas las inyecciones que se realizaron en este rango de temperatura (ANEXO D). Estos hallazgos explican una aparentemente degradación o que una posible interferencia este disminuyendo su señal, ya que el estándar inyectado es el mismo de la sección de ionización química, lo cual nos permite confirmar que la 9,10-FQ se encuentra en el estándar.

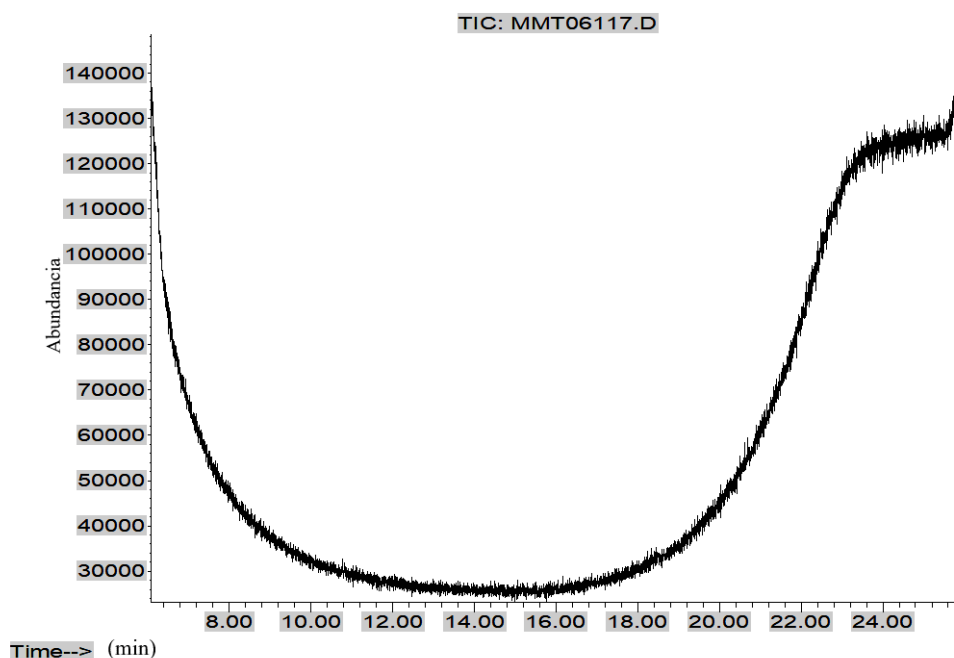


Figura 35. Blanco de tolueno inyectado a una temperatura de 170°C

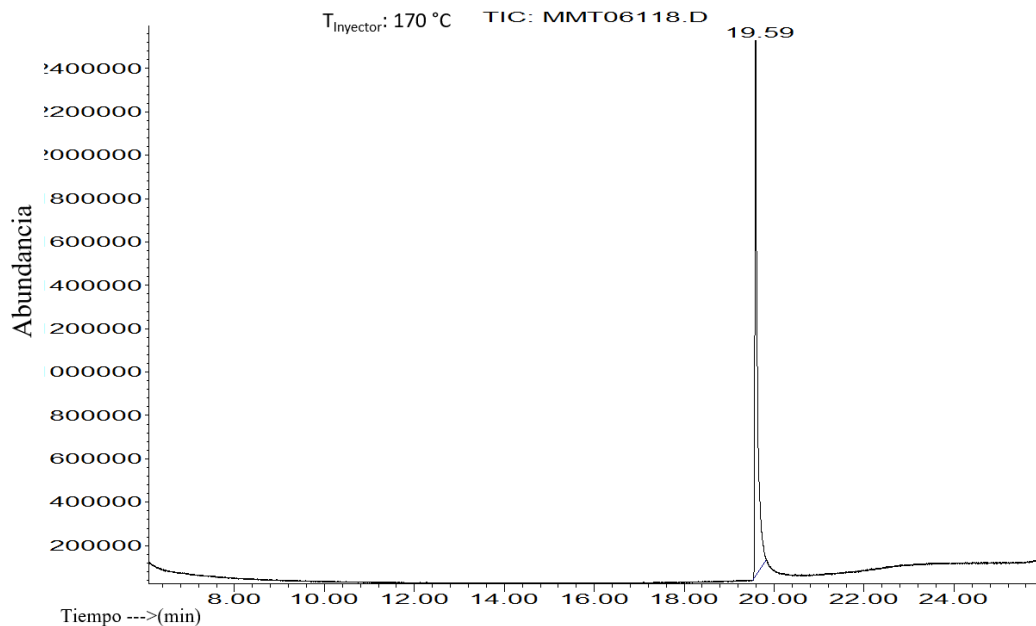


Figura 37. Cromatograma del estándar de 9,10-FQ obtenido con una temperatura de inyección de 170°C

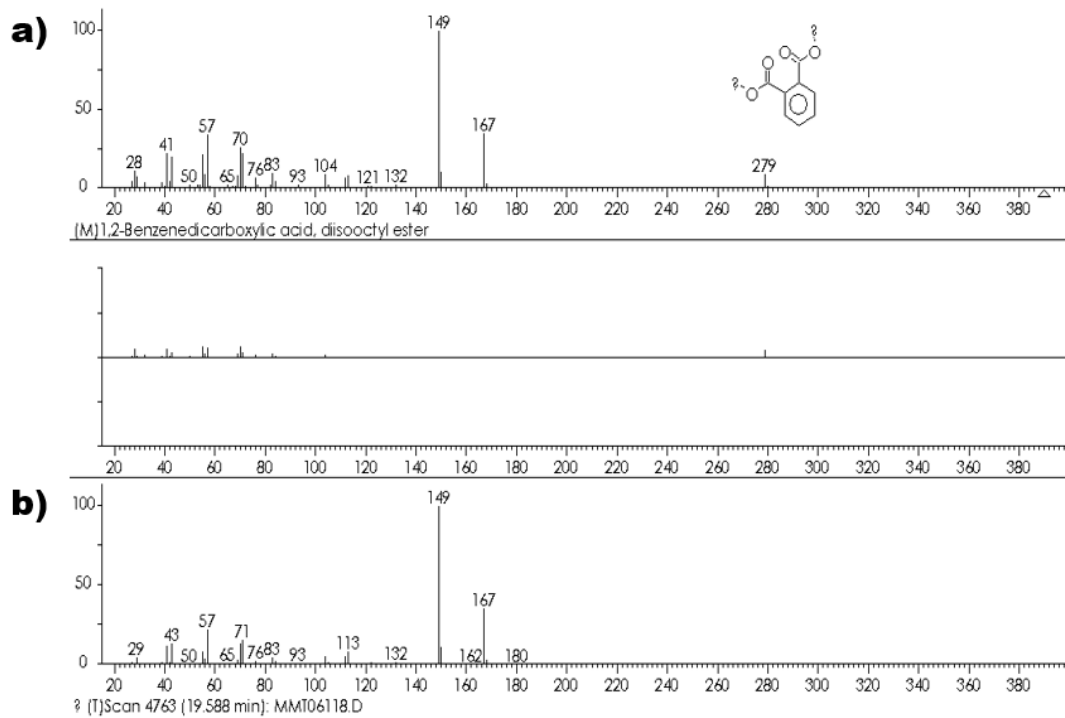


Figura 36. Comparación del a) espectro de masas de la biblioteca NIST y b) espectro del estándar de 9,10-FQ obtenido

Como ya se discutió previamente y en base a los resultados preliminares obtenidos del análisis de esta molécula podemos observar que su determinación por CG se dificulta principalmente por su inestabilidad térmica. Se realiza a continuación comparaciones entre estudios que utilizan inyección directa y una derivatización previa con el propósito de evaluar la factibilidad de su aplicación.

El método desarrollado por (Cho 2004) es uno de los más reportados por diversos estudios, el cual consiste en la estimación cuantitativa de quinonas en CG-EM, utilizando estándares internos deuterados y monitoreo de iones seleccionados (SIM), en donde la 9,10-FQ y otras quinonas se convirtieron en sus derivados de diacetilo (Sección 4.2) después de la extracción de la muestra y posteriormente se analizaron por CG-EM.

En la tabla 2 se observa el tiempo de retención y los iones monitoreados de la 9,10-FQ, mientras que en la tabla 3 se comparan los límites de detección (LOD) para las pruebas de la quinona no derivatizada y derivatizada, los límites de detección fueron más altos para el procedimiento no derivatizado, la diferencia de sensibilidad entre la quinona derivatizada y no derivada se puede ver comparando la abundancia de cada pico ya que se inyectaron cantidades iguales en todos los casos (3.3 ng). En la Figura 38 se observa la abundancia del estándar de la 9,10-Fenantraquinona sin derivatizar en donde se utilizó Ion 180.10 para monitorearla mientras que en la Figura 39 se observa su derivado acetilado, en donde se utilizó el ion 210.10 monitorearla. La tabla 4 muestra los resultados de la aplicación del procedimiento finalizado al DEP, en el cual la 9,10-FQ se encuentra cuantificable, estos valores representan la media obtenida de cuatro ponderaciones separadas, cada una determinada con una sola inyección. Cabe resaltar que los tiempos de retención y las proporciones de masas controladas se compararon con estándares y confirmaron la identidad de la quinona en las muestras, estos resultados muestran que el método de CHO permite la cuantificación de quinonas.

Tabla 2: Condiciones de monitorización de iones seleccionados para la 9,10-FQ

Tiempo de retención (min)	m/z utilizada para la cuantificación	Iones monitoreados m / z, (fragmentos de masa)
36.11	210.1	210.1 (M-2CH ₂ CO ⁺) 252.0 (M-CH ₂ CO ⁺) 294.0 (M ⁺)

Tabla 3: Comparación de los límites de detección de la 9,10-FQ derivatizada y no derivatizada

LOD (ng)	
No derivatizada	Derivatizada
3.8	0.2

Tabla 4 : Concentración de 9,10-FQ quinona (µg/g) en DEP

MW	n	Promedio	SD	RSD%
20.822	4	24.19	24.19	8

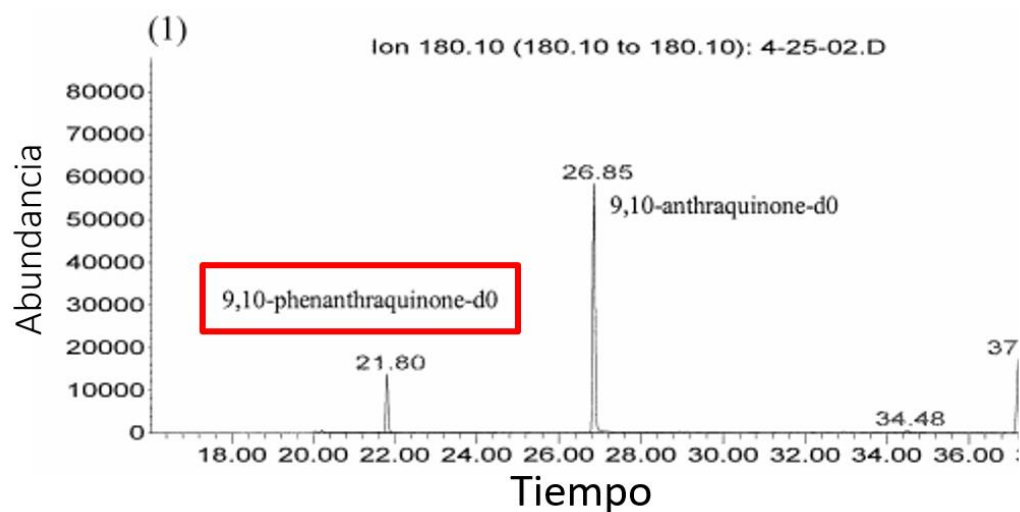


Figura 38. 9,10-FQ sin derivatizar

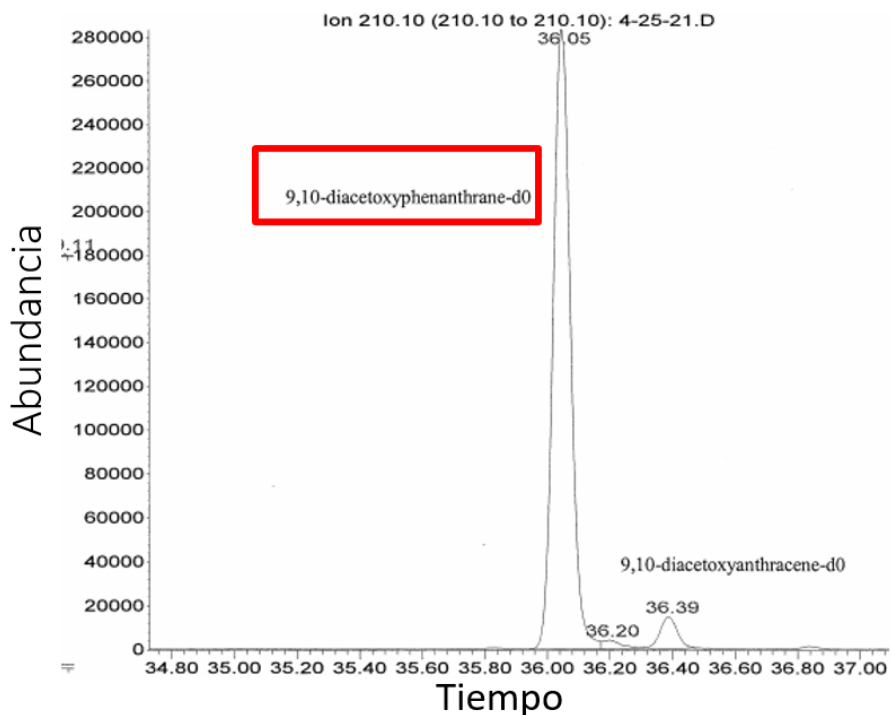


Figura 39. 9,10-FQ derivatizada

Chung et al., 2006 utilizó el método de Cho et al., 2004 en su estudio atmosférico convirtiendo la quinona en su derivado diacetilado para analizarla mediante CG-EM, ellos confirmaron que el método mejoró significativamente la sensibilidad del análisis y mejoró los límites de detección para la 9,10-FQ y esta se convirtió completamente en su derivado de diacetilo durante el análisis mientras que otras quinonas solo se reaccionaron parcialmente, y la derivatización no mejoró los límites de detección.

(A. E. Fernandez 2008) y (A. E. Fernandez 2008) realizaron un estudio atmosférico en el cual utilizó el método de CG/EM descrito como un método eficiente por (Cho et al., 2004), el cual describe como un método eficiente y (A. E. Fernandez 2008) encuentra que el 90% de la 9,10-FQ en el sitio del receptor se formó fotoquímicamente durante el transporte atmosférico. Y encuentran que 9,10-FQ, se encuentra solo en la fase de partículas.

Saborit et al., 2013 en su análisis de concentración atmosférica de quinonas y HAP usa la metodología desarrollada por Cho et al 2004 con modificaciones la cual fue validada por un análisis de polvo urbano (SRM 1649a y SRM 1649b) que resultó en una excelente concordancia con las concentraciones certificadas de HAP y quinonas.

Este estudio compara las concentraciones obtenidas de 9,10-FQ con la literatura (tabla 5), destacando que las concentraciones de la quinona medidas en ambos SRM son similares, lo que demuestra la exactitud y precisión de esta metodología, lo que significa que los resultados reportados demuestran la aplicabilidad de la metodología.

Tabla 5: Concentraciones experimentales de 9,10-FQ

	SRM 1649a			SRM 1649b
	(Saborit 2013)	(Cho 2004)	(Mirivel 2010)	(Saborit 2013)
Numero de replicas	n=4	n=12	n=3	n=4
Instrumento analítico	CG-EI-EM	CG-EI-EM	UPLC-APCI-TOF	CG-EI-EM
Concentraciones experimentales (mg/kg) y desviación estándar	1.22 (0.06)	1.18 (0.13)	1.133 (0.152)	1.51 (0.12)

Además, la desviación estándar reportada para las quinonas en este estudio no solo muestra que la masa de SRM analizada es homogénea, sino que también resalta que este método que se empleó es adecuado para la determinación de una gran lista de quinonas de la misma matriz analítica. Destacando que las mediciones obtenidas de fase de partícula y vapor en este estudio de 9,10-FQ superan a los demás datos publicados.

Asimismo, Saborit et al., 2013 hizo un análisis de las propiedades fisicoquímicas de HAP y quinonas en donde mostró que la tendencia entre la presión de vapor y el

peso molecular es similar para los HAP y las especies de quinonas. En cambio, la correlación entre $\log K_{ow}$ y el peso molecular mostró un patrón diferente para HAP y quinonas, esto quiere decir que en cuanto más pesado es el compuesto, mayor es el $\log K_{ow}$; en donde los HAP muestran un $\log K_{ow}$ más grande que las quinonas para pesos moleculares similares. Esto coincide en que las quinonas son más polares que sus precursores los HAP debido al enlace C=O.

Gimate et al., 2014 en un estudio atmosférico se analizaron quinonas y HAP's en la Zona Metropolitana de Guadalajara se cuantificó la quinona, en este estudio se realizó su extracción y posteriormente se analizó mediante CG-EM. Los espectros de masas se obtuvieron por impacto electrónico (70eV) y analizador de masas cuadrupolar. Se utilizó el modo de exploración (40-500 uma) para obtener el tiempo de retención y seleccionar el m/z que era característico de la molécula. Las concentraciones ambientales en las muestras se corrigieron con blancos, en donde la 9,10-FQ tuvo una concentración ambiental de 2.66 ng/m³ que es el 12.8% del total extraído.

Santos et al 2017 desarrolló un método de microextracción de una sola gota con cromatografía de gases acoplada a masas (SDME/CG-EM) para quinonas, pero este método es para muestras de agua, sin embargo, mostró buena sensibilidad, linealidad, precisión y exactitud para la determinación de quinonas, lo cual se puede ver como una alternativa para el análisis de 9,10-FQ en el aire. En la tabla 6 se pueden observar los iones que se eligieron, el primer ion se utilizó para la cuantificación y el segundo para la confirmación.

Tabla 6: Condiciones de monitorización para la cuantificación de 9,10-FQ

Ion de cuantificación (m/z)	Ion de confirmación (m/z)	Tiempo de retención (min)
180	208	15.72

Para validar el método tuvieron en cuenta el rango lineal, coeficiente de determinación (r^2), LOD, LOQ, precisión, pruebas de recuperación (como aproximación a la precisión) y prueba con muestras reales, la validación se realizó siguiendo los criterios sugeridos por la IUPAC. En la tabla 7 se pueden observar las cifras obtenidas que se utilizaron para la validación del método propuesto para la 9,10-FQ.

Tabla 7: Cifras para la validación del método propuesto

Coeficiente de correlación (r^2)	Rango lineal	LOD ($\mu\text{g/L}$)	LOQ ($\mu\text{g/L}$)	Precisión (RSD)		Factor de enriquecimiento
				Intraday (%)	Interday (%)	
0.9969	50-200	9.27	50.0	4.78	16.2	109

La exactitud del método analítico presentado fue determinada por experimentos de adición/recuperación y cómo podemos observar en la tabla 8 los valores de recuperación relativa variaron 98- 101% para la 9,10-FQ, para el análisis de trazas, los valores de recuperación aceptables son generalmente del 80 al 120%. Sin embargo, dependiendo de la complejidad analítica y de la muestra, este valor puede oscilar entre el 50 y el 120%, con una precisión de hasta $\pm 15\%$, lo que quiere decir que los resultados de este método son satisfactorios.

Tabla 8: Recuperación de 9,10-FQ en muestras de agua

Recuperación (%)		
Concentración agregada		
50 $\mu\text{g/L}$	110 $\mu\text{g/L}$	200 $\mu\text{g/L}$
98	108	101

Las quinonas derivatizadas en estudios ambientales han llegado a tener un límite de detección más bajo que las no derivatizadas. Esto es debido a que las quinonas derivatizadas son térmicamente más estables que las quinonas originales por su estructura y esto permite que se logre analizar sin que se degrade al momento del análisis (Sousa 2012).

La derivatización en los últimos años se ha implementado y se ha ido mejorando, teniendo cada vez mejores resultados, sin embargo, para varias quinonas aún no se ha obtenido una gran eficiencia. Esto quiere decir que se han llegado a degradar en el proceso o no se llegan a transformar por completo, por lo que Sousa et al. 2015 sugiere un análisis directo.

Sousa et al., 2015 en su estudio analiza las quinonas en forma no derivatizada y derivatizadas acetiladas con el fin de evaluar la viabilidad de su determinación directa mediante CG-EM, ellos optimizaron las condiciones y como resultado obtuvieron tiempos de ejecución más cortos que los informados por Chung, Cho y Delgado-Saborit. En la tabla 9 se muestran las condiciones que se obtuvieron y los iones monitoreados de la solución estándar de la 9,10-FQ, se puede observar que la quinona derivatizada tiene mejores límites de detección y de cuantificación, aunque con un tiempo de retención mayor, mientras que la quinona no derivatizada tiene un tiempo de retención menor, pero límites de detección y cuantificación 10 y 20 veces más grandes respectivamente. En la figura 40 se puede observar los cromatogramas de varias quinonas derivatizadas con una concentración de 19 ng/L y las quinonas no derivatizadas con una concentración de 18 ng/L.

Tabla 9: Resultados obtenidos con soluciones estándar de la 9,10-FQ y sus derivados

9,10-FQ	Tr/min	segmento		iones monitoreados		r ²	CV%	LOD ng/m ³	LOQ ng/m ³
		n	Δt/min	q	Q				
No derivatizada	33.616	3	25-51	208	208	1.000	1.63	0.30	0.53
derivatizada	42.36	3	25-32	210,252,294	210	0.9922	7.37	0.20	0.35

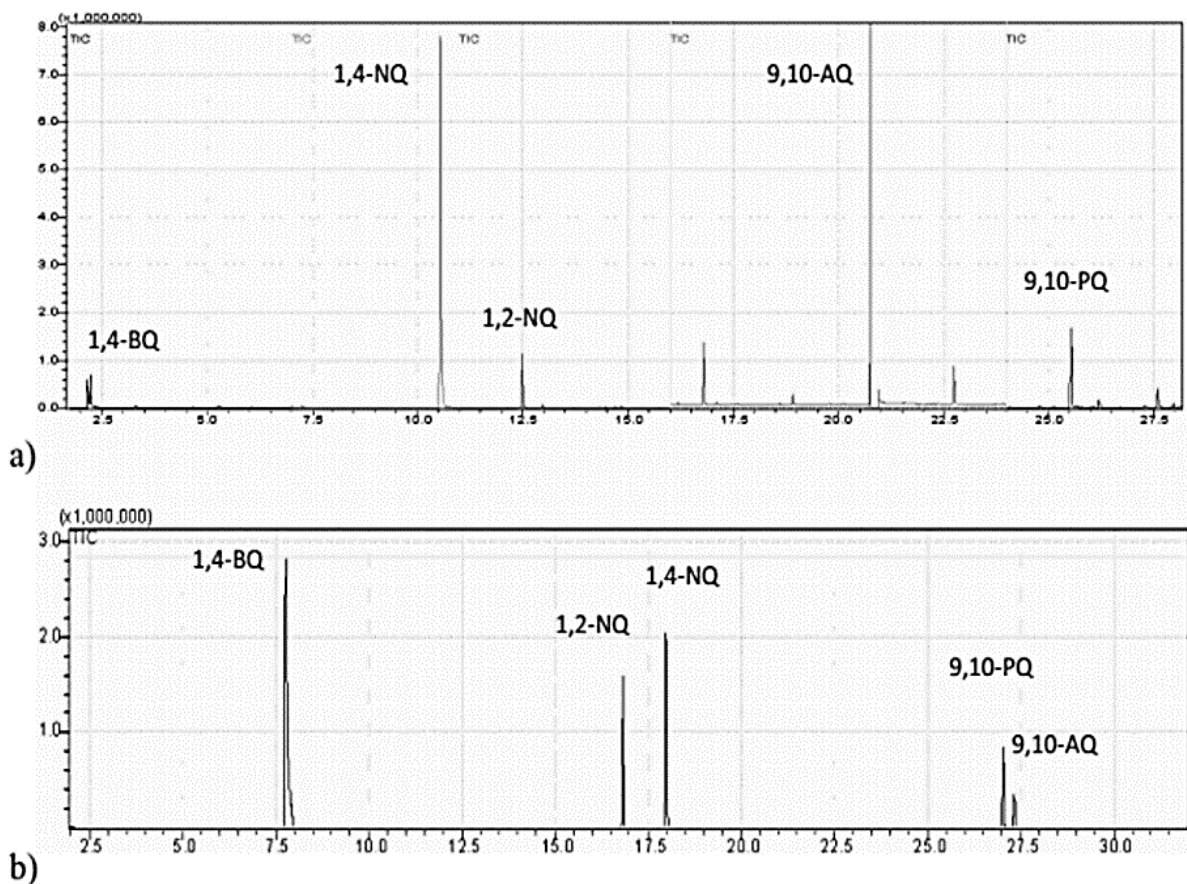


Figura 40. Cromatogramas de una mezcla de quinonas: a) forma no derivatizada (18 mg/L) y b) forma derivatizada acetilada (19 mg /L).

Posteriormente se aplicaron ambos métodos a 86 muestras reales de material particulado atmosférico recogidas del interior de la terminal de autobuses más grande de Salvador, Bahía, Brasil, y encontraron que la concentración más alta de quinona en PM_{2.5} es de la 9,10-FQ la cual fue de 7.39 ng/m³ (tabla 10).

Este estudio muestra que los métodos CG-EM revisados en este caso para la determinación de 9,10-FQ que están asociados con partículas atmosféricas mostraron niveles bajos de LOD y LOQ, por lo que es viable identificar y cuantificar en forma derivatizada y no derivatizada. La correlación demostrada por estos métodos permite confiar en el análisis de quinonas en forma directa no derivatizada ya que reduce el manejo de la muestra, un tiempo de retención menor, lo que

favorece, por el bajo costo y el tiempo del equipo sería y así se cuidaría la columna. Además, encontraron que la concentración más alta de quinona en PM_{2.5} es de la 9,10-FQ, que fue de 7.39 ng/m³.

Tabla 10: Resultados del análisis 9,10-FQ de las muestras ambientales en la forma derivatizada acetilada y no derivatizada

No derivatizada ng/m ³	Derivatizada ng/m ³	
Sousa 2015	Sousa 2015	literatura
< LOD — 5.32	< LOD — 7.39	0–2.2 (Cho 2004) (Saborit 2013) (A. E. Fernandez 2008)

4.5. CG-EM/EM

Una alternativa para mejorar la confiabilidad del análisis, sin una reacción previa, es inyectar directamente la molécula en el cromatógrafo de gases a temperaturas menores para así aprovechar la sensibilidad y selectividad que ofrecen los acoples de cromatografía de gases a espectrometría de masas tandem. De esa manera los análisis serían mucho más rápidos, selectivos, el límite de detección podría ser más bajo, y se mejoraría la precisión y exactitud del análisis. Así se podría facilitar su determinación y conocer su concentración ambiental, y podría ser útil para el diseño de medidas de control y poder monitorearla.

Toriba et al., 2016 realizó un estudio de varias quinonas derivatizadas (derivatización mostrada en el punto 4.1.2) incluyendo la 9,10-FQ en donde el método analítico desarrollado fue altamente sensible y selectivo para la determinación de varias quinonas, e incluso la sensibilidad fue mayor que el análisis directo con el mismo método de CG-EM/EM, esto es debido al acople de esta técnica, ya que solo permite el paso de los iones seleccionados. Los iones más significativos en los espectros del primer analizador fueron los iones moleculares [M]⁺; los cuales se utilizaron como iones precursores para escanear los iones del producto en M₂, los iones producto que se observaron especialmente fueron [M-88]

+ (M-(CH₃)₄-Si) que se pueden observar en la figura 41 que muestra el espectro de masas de la 9,10-FQ derivatizada por este metodo.

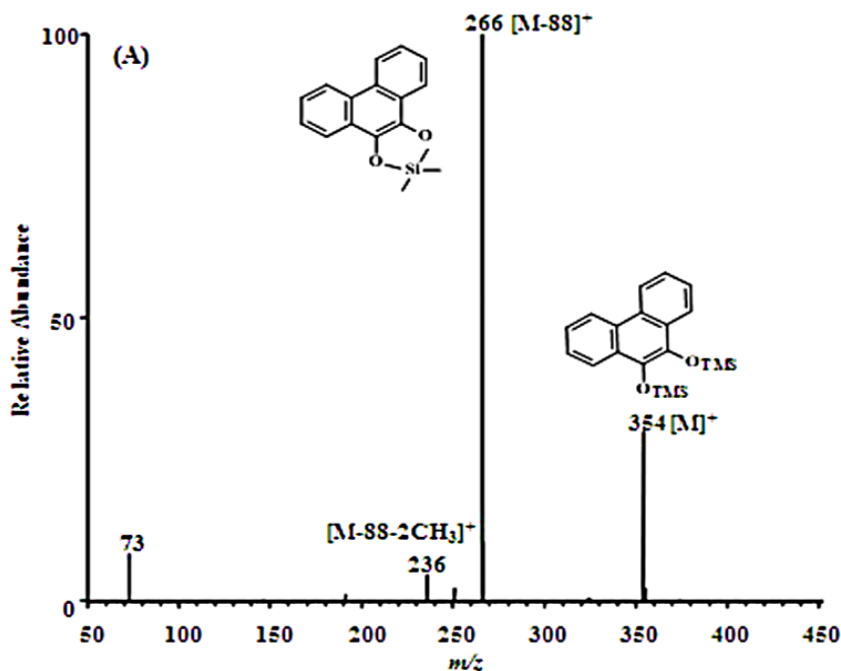


Figura 41. Espectros EM/EM de iones [M]⁺ de 9,10-FQ derivatizada

4.6. Determinación por Cromatografía de líquidos

Una alternativa que podría ser muy útil para la determinación de la 9,10-FQ en muestras de aire ambiente es la cromatografía de líquidos ya que las sustancias térmicamente lábiles o los compuestos de baja volatilidad pueden detectarse fácilmente y sin las limitaciones que ocurren en la CG-EM, además de que ofrece una amplia variedad de fases estacionarias cuyas selectividades permiten la resolución de mezclas de alta complejidad.

HPLC es una de las técnicas más utilizadas para el análisis de quinonas en muestras biológicas y ambientales acoplada a diversas técnicas de detección que incluyen ultravioleta (UV), fluorescencia (FL), quimioluminiscencia (CL), detección electroquímica (ECD) y la espectrometría de masas (EM). Sin embargo, la mayoría

de las técnicas de detección de HPLC carecen de sensibilidad y selectividad comparada con EM, la técnica más viable es la de FL ya que de las anteriores ya señaladas es la que puede llegar a ofrecernos un poco de sensibilidad y selectividad, pero para esta técnica se requiere una derivatización (Kishikawa 2013).

La separación de quinonas por HPLC se lleva a cabo habitualmente en fase inversa, utilizando una fase estacionaria apolar unida químicamente, por ejemplo, C₁₈. (Sousa 2016) sin embargo, aún no existen columnas específicas para el análisis de quinonas, pero se pueden utilizar las columnas cromatográficas específicas para el análisis de HAP.

Este método puede ofrecer buena selectividad y sensibilidad como fue reportado por Kishikawa et al, 2004. Ellos utilizaron un método HPLC altamente sensible y selectivo acoplado a fluorescencia para la determinación de 9,10-FQ con derivatización (reacción descrita en la sección 4.2), el derivado generado exhibe una fluorescencia fuerte y, por tanto, la reacción anterior se aplicó a la derivatización fluorescente de FQ antes de la columna (derivatización pre- columna) seguida de HPLC de fase inversa, en la figura 42a se muestra el blanco del reactivo y la figura 42b el estándar de la quinona derivatizada en donde solo se observa un pico en un tiempo de retención de 19 minutos con una intensidad bastante alta.

Adicionalmente lo aplicaron a muestras de partículas suspendidas en el aire después de optimizar las condiciones de reacción, el método propuesto se aplicó con éxito a la determinación de 9,10-FQ, en la figura 42 se puede observar la comparación de los cromatogramas de las muestras obtenidas, en la figura 42c fueron enriquecidas con el estándar de 9,10-FQ en donde se detecta un pico correspondiente al derivado de FQ muy abundante sin ningún pico de interferencia, en cambio en la figura 42d solo corresponde a el extracto obtenido sin ningún estándar, como se puede observar prácticamente es el mismo pico, solo que como el b esta enriquecido con estándar tiene una mayor abundancia. (Kishikawa 2004), esto se confirma con la comparación de picos del estándar con la muestra y se confirma que efectivamente es la molécula derivatizada de 9,10- FQ.

La separación por HPLC del derivado fluorescente de FQ se realizó en 20 min. Se logró una determinación altamente sensible y selectiva de FQ con el límite de detección de 5 fmol (S/N = 3). Mediante el método propuesto, la FQ en las partículas en suspensión se determinó con éxito en el rango de 0,26 a 0,30 ng / m³ (n = 3), lo cual demuestra que este método logra determinar la quinona en muestras ambientales.

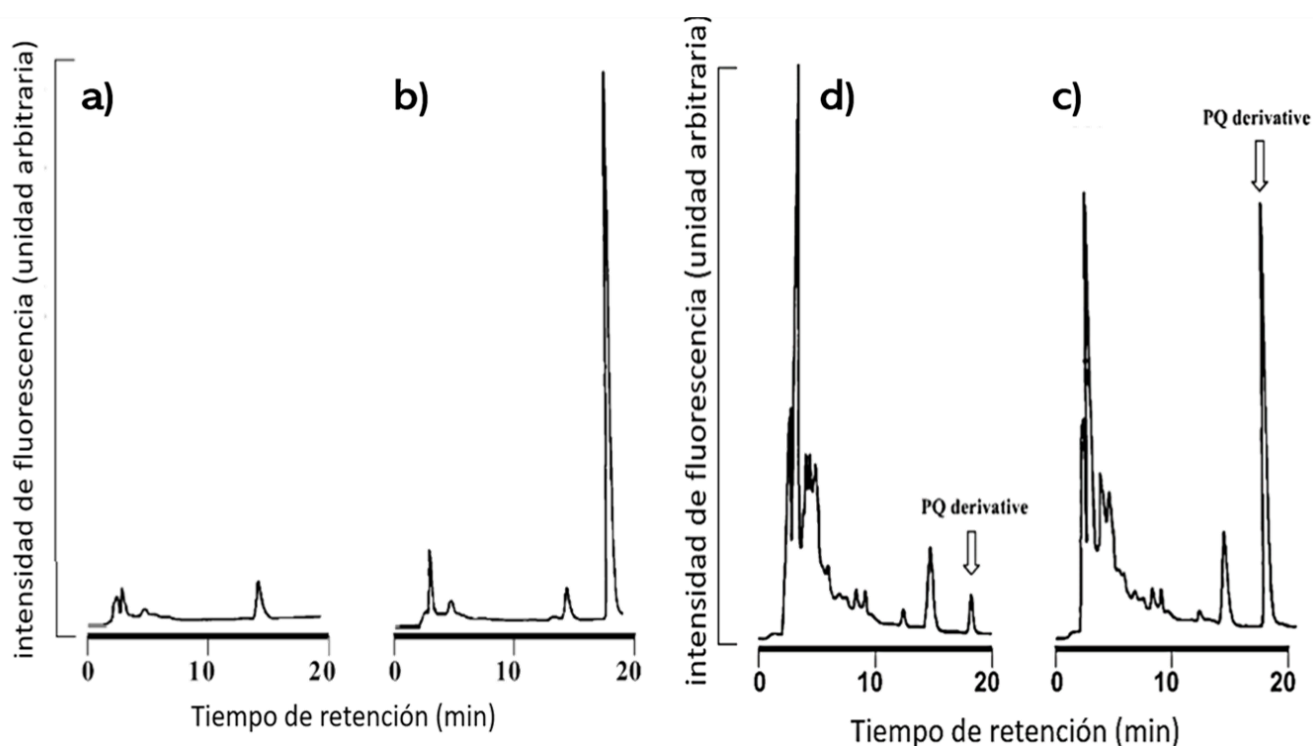


Figura 42. Cromatogramas a) blanco del reactivo, b) solución estándar de 9,10 FQ derivatizada, c) en el extracto de partículas de aire, d) partículas en el aire enriquecida con estándar.

Kishikawa et al., 2006 determinó la concentración de 9,10-FQ en partículas transportadas por el aire recolectadas en un sitio urbano en la ciudad de Nagasaki, Japón, e investigamos la variación estacional y semanal de los niveles de esta quinona mediante el método de (Kishikawa 2004), este método se aplicó con éxito

a la determinación de 9,10-FQ en partículas en suspensión, la recuperación de la quinona a partir de partículas suspendidas en el aire > 92% y el rendimiento de reacción de 9,10-FQ al derivado fluorescente un 80%. En la figura 43 se muestra un cromatograma de HPLC de la quinona extraído de partículas en suspensión en el aire, en el cual se observa un pico delgado correspondiente al derivado de la quinona que era claramente identificable y comparable con (Kishikawa 2004), además encontraron que las concentraciones de 9,10-FQ en invierno fueron más altas que en verano y en su estudio de variación semanal, las concentraciones de 9,10-FQ fueron más altas durante los días de semana y más bajas los fines de semana, debido a que se correlaciona con el fenantreno.

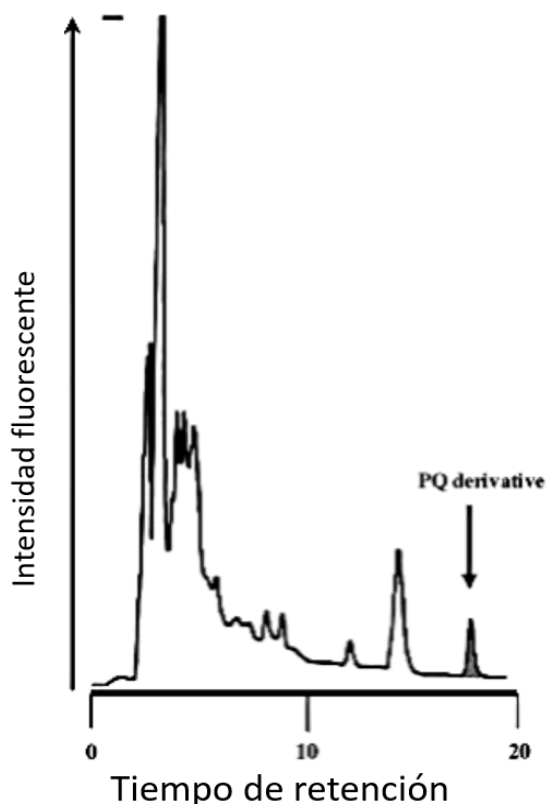


Figura 43. Cromatograma de 9,10-FQ derivatizada en el extracto de partículas en suspensión (Kishikawa 2004)

Adicionalmente compararon resultados y encontraron que el nivel de 9,10-FQ en la ciudad de Nagasaki era del mismo orden de magnitud que el identificado en sitios urbanos en Los Ángeles, (0.130–0.730 ng m³ que determino (Cho 2004)), mientras que el nivel de 9,10-FQ en la ciudad de Nagasaki era mucho más alto que el de un sitio rural en Los Ángeles (0.006– 0.018 ng m³, (Cho 2004)).

Usando la derivatización pre-columna HPLC con detección de fluorescencia (Kishikawa 2011) sustituyo el benzaldehído por 4-carbometoxibenzaldehído, como resultado la sensibilidad fue 4 veces mayor que método anterior con benzaldehído. En la figura 44a se muestra el cromatograma HPLC del blanco del reactivo, en la figura 44b el cromatograma de la solución estándar de la 9,10-FQ obtenida después de la derivatización con 4-carbometoxibenzaldehído, el cual se detectó en un tiempo de retención de 8.5 minutos además no se observan interferencias derivadas del reactivo de derivatización. La curva de calibración que se obtuvo con el estándar 9,10-FQ mostró una buena relación lineal ($r = 0,999$) entre las concentraciones y las alturas de los picos en el rango de 0,005 a 10 pmol / inyección, y el límite de detección para con una relación señal/ruido (S/N) de 3 fue de 1,2 fmol / inyección.

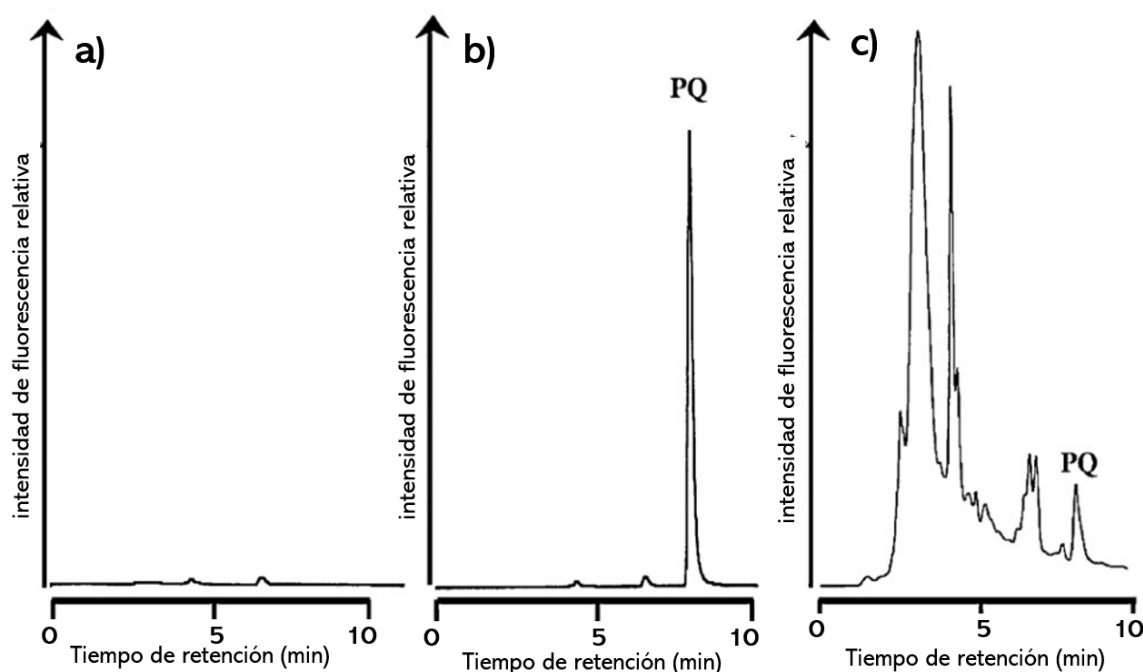


Figura 44. Cromatogramas de a) blanco de reactivo, b) solución estándar de 10 pmol / inyección de 9,10-FQ derivatizada y c) 9,10-FQ derivatizada en el extracto de partículas en suspensión en el aire. (Kishikawa 2011)

Posteriormente a la optimización del método se aplicó a extractos de partículas en suspensión en el aire, en la figura 44c se muestra el cromatograma obtenido de la muestra, y se observa que la 9,10-FQ se puede detectar sin ninguna interferencia.

Estos métodos aun que son sensibles para la 9,10-FQ en partículas en suspensión en el aire, la derivatización pre-columna requiere mayor tiempo y es más laborioso, por esa razón (Kishikawa 2010) implementó un método para la determinación de 9,10-FQ simple y rápido por HPLC con una derivatización post-columna (sección 4.2) y detección de fluorescencia, permite la inyección directa de la solución de muestra con un tiempo de análisis menor, se detectó el estándar de la quinona mediante el método de derivatización post-columna en un tiempo de retención de 24 minutos (figura 45a) y el límite de detección fue de 67 fmol /inyección (S/N=3). Posteriormente el método se aplicó a la determinación de 9,10-FQ en partículas en suspensión, en la figura 45b se puede observar el pico del derivado de la quinona en el minuto 24, mientras que en la figura 45c en ausencia 2-ATHP no se detecta, la concentración promedio (media \pm SD, n =11) de 9,10-FQ encontrada en las partículas en el aire recolectadas en la ciudad de Nagasaki fue de 0.28 ± 0.09 ng/m³. Además, se encontró que las concentraciones de derivatización obtenidas por este método estaba correlacionado con las determinadas por el método de derivatización pre-columna (Kishikawa 2004). La sensibilidad del método se comparó y fue 14 veces mayor que la CHO 2014 en su método por CG-ES y muy parecida a la del método de Delhomme 2008 por de HPLC-EM/EM con ionización negativa, pero la sensibilidad del método propuesto fue 10 veces menor que el método de derivatización pre-columna (Kishikawa 2004).

Mirivel et al., 2010 ha desarrollado una herramienta promisorio mediante extracción líquida presurizada con cromatografía de líquidos de ultra rendimiento acoplada a espectrometría de masas con una interfaz de ionización química a presión atmosférica y un analizador TOF (UPLC-APCITOF-EM) en muestras de partículas de aerosoles ambientales dado que el acople TOF-EM puede obtener una mayor confianza en la caracterización de compuestos en matrices complejas, como partículas atmosféricas, con una buena sensibilidad de detección. En la figura 46

podemos observar el cromatograma iónico CL-TOF-EM de una solución estándar de 9,10-FQ en modo de iones negativos en donde la quinona se encuentra en el minuto 19 y en la tabla 10 se encuentra la concentración en SRM 1648, SRM 2584, NIES No. 8 y una muestra de hollín, estos resultados son superiores a los obtenidos a los de (Delhomme 2008).

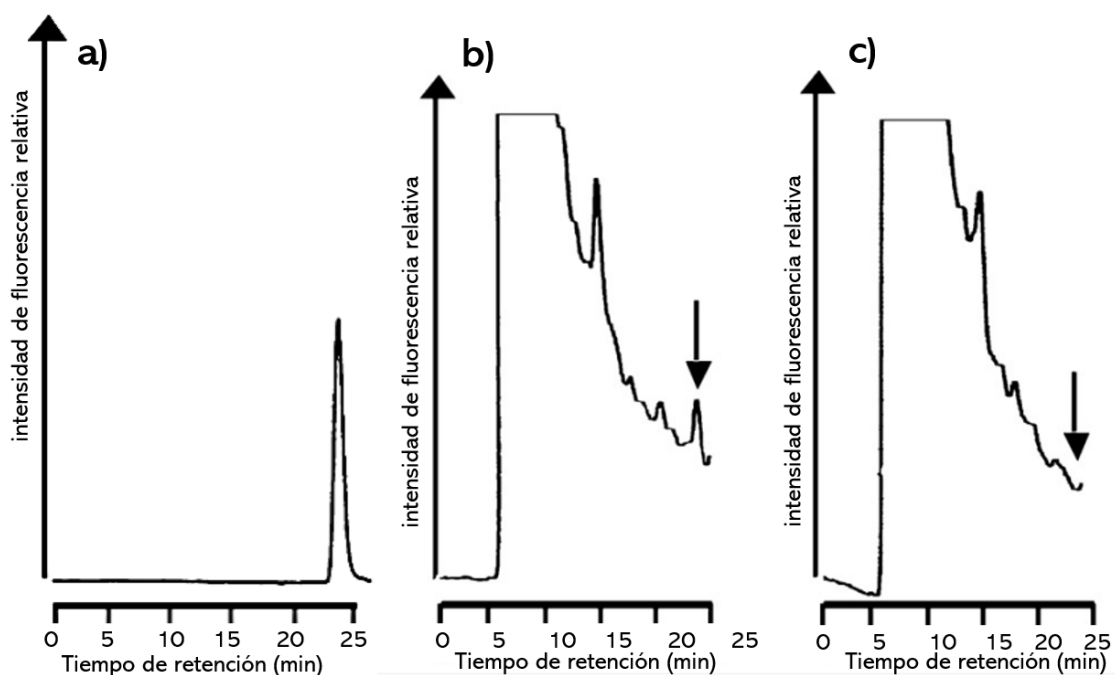


Figura 45. Cromatogramas de la 9,10-FQ a) estándar derivatizada, b) derivatizada en el extracto de partículas en suspensión y b) sin reacción de derivatización posterior a la columna (Kishikawa 2010)

Tabla 11: Concentración (ng/g1) de 9,10-FQ

SRM 1648a	SRM 2584	NIES No. 8	Combustión de hollín de queroseno
520 (30)	<92	11,368 (1,023)	<1,585

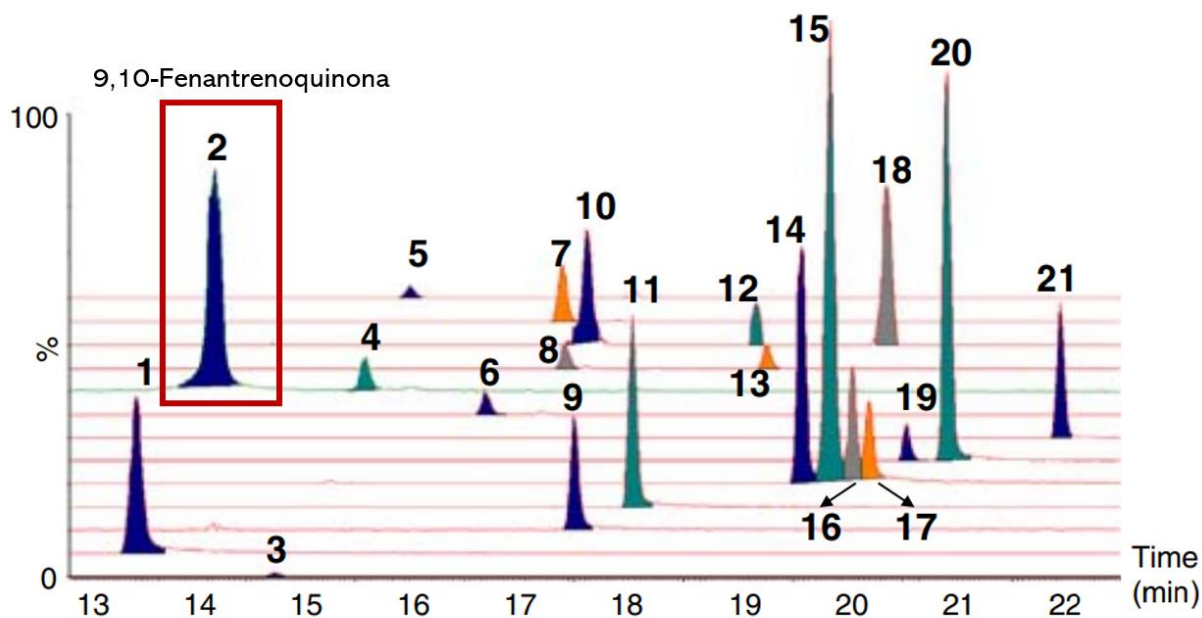


Figura 46. Cromatogramas iónicos CL-ToFMS de una solución estándar de NPAH y OPAH con APCI en modo de iones negativos (Mirivel 2010)

Taguchi et al., 2008 en su estudio celular determinó la 9,10-FQ y su metabolito mediante un equipo de HPLC acoplado a UV-Vis, también acoplado a un espectrómetro de masas con una fuente de bombardeo atómico rápido (FAB) logro determinar la quinona en la figura 47 se puede observar el cromatograma de la quinona en el cual es eluida a un tiempo de retención de 6.9 minutos , sin embargo, como es un método que se aplica en enzimas se tendría que probar para verificar que sea factible para muestras ambientales.

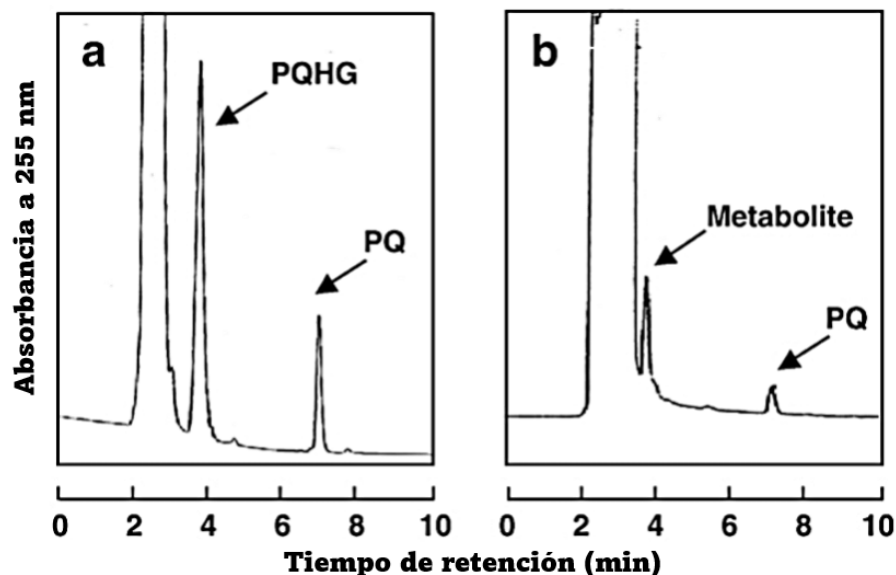


Figura 47. Cromatograma de 9,10-FQ y su metabolito

4.7. CL-EM/EM

Una alternativa para el análisis de la quinona sería CL-EM/EM, ya que este acople nos ofrece mayor sensibilidad y eficiencia a comparación de CL-EM, lo cual ayudaría a determinar la quinona con mayor selectividad.

Lintelmann et al., 2005 en su estudio mediante CL-EM/EM de muestras de aerosol llevo a cabo la detección de quinonas y HAP, debido a las características no polares de la quinona, se aplicó ionización APCI con tampón de acetato de amonio, realizaron un barrido de una solución estándar por Q₁ el cual proporcionó el ion pseudomolecular dominante [M+H]⁺, el cual se eligió como ion precursor para sufrir fragmentación, el cual proporcionó fragmentos debido a la eliminación de CO, estos se muestran en la tabla 12.

Tabla 12: Iones utilizados para la detección de 9,10-FQ en EM/EM con modo APCI positivo

Ion precursor (M+1) (m/z)	Ion producto principal (m/z)	Pérdida de masa (Da)	Pérdida de masa (Da)	Energía de colisión (eV)
209	181	28	153	25

Este método es una herramienta muy sensible y selectiva para el análisis de quinonas, debido al modo de detección MRM y al uso de la interfaz APCI. Después de una mayor optimización y validación, este método se puede llegar a utilizar de una manera rutinaria.

Delhomme et al., 2008 por otro lado también desarrolló un método analítico mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (CL-EM-EM) en donde se probó la ionización química a presión atmosférica (APCI) en modo de iones positivo y negativo y ESI en modo de iones positivo y negativo, así como la detección de fluorescencia, en muestras de aerosol a muestras de partículas de aire, para optimizar el método se prepararon estándares y realizaron un barrido de soluciones estándar por Q₁ (primera ionización) que produjo el ion pseudomolecular [M]⁺, este ion pseudomolecular se eligió para llevar a cabo la fragmentación. Se observó el fragmento debido a la eliminación doble de CO [M-28-28]⁺; los parámetros de monitorización para la detección se muestran en la tabla 13.

Tabla 13: Parámetros para monitorización para la detección en EM-EM con interfaz APCI

Ion precursor (m/z)	Fragmento seleccionado	Pérdida de masa (Da)	Otros iones de producto (m/z)	Energía de colisión (V)
208	152	56	208.180	30

Ellos encontraron que la APCI negativo tiene mejores resultados (tabla 14) este método CL-EM/EM no necesitó derivatización y resolvió otras limitaciones de las técnicas de fluorescencia de CG-EM y HPLC.

Para probar el método recolectaron muestras de partículas finas (PM2.5), y la 9,10-FQ estuvo presente en todas las muestras en donde fue la quinona más predominante (1,90 ng/m³).

Tabla 14: Límite de detección y límite de cuantificación para el método CL-APCI-EM-EM con ionización negativa o positiva de la 9,10-FQ

Tiempo de retención (min)	Límite de detección (µg/L)		Límite de cuantificación (µg/L)		R ²
	APCI (-)	APCI (+)	APCI (-)	APCI (+)	
14.13	1.15	6.60	3.83	22.0	0.9995

En otro estudio atmosférico de la industria de las arenas petrolíferas (Wnorowski 2017) en Canadá se recolectaron muestras de partículas ultrafinas (PUF), en donde se cuantificó la fase gaseosa y la fase partícula se analizaron mediante un cromatógrafo de líquidos de alto a un MSD ThermoFisher TSQ Quantum Discovery Max TripleQuad para la separación y detección de los analitos, los datos se adquirieron bajo APCI en modo negativo, las quinonas se determinaron a partir de las fracciones M₃OH en modo EM/EM en donde los criterios de confirmación del compuesto por EM/EM se basaron en la identificación de los iones de origen y de dos productos, el fragmento de transición con mayor intensidad se usó como cuantificador y el segundo fragmento se usó como calificador. Los datos analíticos de la 9,10-FQ se muestran en la tabla 15, en donde cabe resaltar que antes de la extracción y la determinación analítica los filtros se enriquecieron con 100µL de estándares de recuperación (10 ng/µL), se puede observar que la 9,10-FQ se cuantificó en los 3 filtros que se midieron en diferentes momentos del día, lo cual nos indica que CL-EM/EM es una alternativa muy prometedora para regular la quinona.

Tabla 15: 9,10-FQ A: medida durante 24 horas, B: medida durante en día, C: medida durante la noche

	Fase gaseosa (ng/m ³)					Fase de partículas (ng/m ³)					$\frac{GAS}{PARTICULAS}$
	Min.	Max.	Media	Mediana	Total	Min.	Max.	Media	Mediana	Total	
A	0.009	0.091	0.049	0.048	0.196	0.023	0.033	0.028	0.028	0.056	3.5
B	0.007	0.068	0.021	0.010	0.107	0.008	0.032	0.020	0.016	0.099	1.1
c	0.0056	0.333	0.195	0.195	0.389	0.011	0.078	0.040	0.027	0.201	1.9

Por otro lado, Asahi et al., 2014 realizó un estudio en orina el cual fue analizado por CL-EM/EM, en donde se llevó a cabo una elución en gradiente usando acetato de amonio 5 mM en agua (eluyente A) y metanol (eluyente B), acoplado a un espectrómetro de masas de tiple cuadrupolo que se operó en modo de monitorización selectiva de reacciones (SRM), y los iones precursores (Q1) y producto (Q3) monitoreados fueron m/z 209 \rightarrow 181 para 9,10-FQ y para el estándar 9,10-FQ-d8 m/z 217 \rightarrow 189.

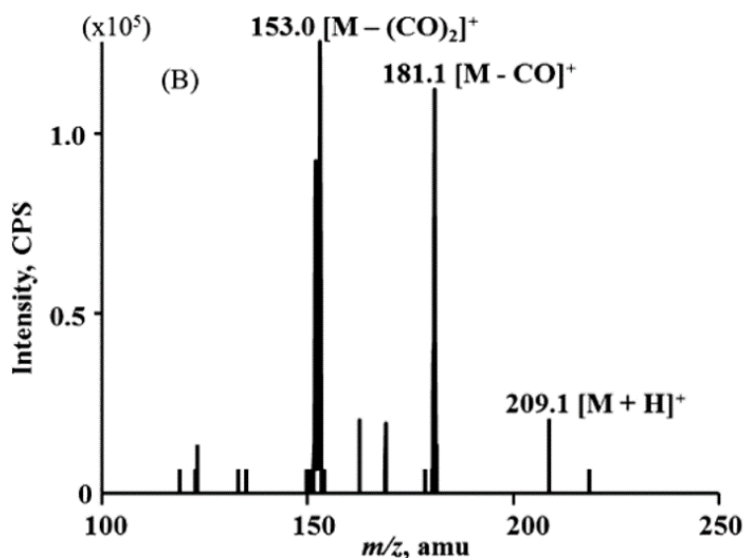


Figura 48. Espectros EM/EM del ion [M+H]⁺ del estándar 9,10-FQ obtenido de los estándares corresponden a 50 pmol /inyección

En la figura 48 se muestran los resultados obtenidos del análisis de la quinona, el fragmento de m/z 209.1 corresponde al ion molecular protonado $[M+H]^+$, este ion se fragmentó a m/z 181.1 $[M-CO]^+$ y m/z 153.0 $[M-CO_2]^+$ como iones producto (Asahi 2014), con este método logra analizar y cuantificar la quinona, sin embargo, este método fue aplicado para muestras de orina pero debido a sus buenos resultados podría ser una alternativa para muestras ambientales, por lo cual se tendría que probar este método para verificar los límites de cuantificación y detección para este tipo de muestras y verificar si es viable, ya que el tratamiento de la muestra es diferente.

5. PROPUESTA DE PROTOCOLO DE ANÁLISIS

A partir de la revisión bibliográfica sobre las técnicas cromatográficas se propone realizar la preparación del estándar de 9,10-Fenantrenoquinona como se describe en la sección de metodología, para realizar un análisis sin derivatización. Ya que en base a los resultados de Sousa et al. 2015 el análisis directo es una buena alternativa, para esto la disolución estándar se llevará al cromatógrafo de gases de triple cuadrupolo para probar su separación con los experimentos de ion precursor y ion producto, utilizando distintas rampas de temperatura en el horno del cromatógrafo de gases y con la fuente de ionización de EI y CI se probarán distintas energías de colisión, hasta obtener las condiciones óptimas de separación posteriormente se realizará la comparación de los resultados.

Una vez optimizada la separación se configura el espectrómetro de masas para los experimentos de MRM, donde a partir del espectro de masas simple, seleccionará el fragmento más abundante y se probará su fragmentación a distintas energías de colisión y velocidad de barrido con la finalidad de obtener las máximas abundancias y el espectro de masas único que favorezca su identificación inequívoca en una disolución orgánica.

6. CONCLUSIONES

En la búsqueda literaria ambiental indica que las quinonas son uno de los compuestos menos estudiados. Esto se debe principalmente a los desafíos en los métodos analíticos, la falta de requisitos regulatorios y como consecuencia falta de estudios sistemáticos. Por lo tanto, hay escasez de información sobre la presencia, el destino y el efecto de las quinonas en el aire ambiental. Para obtener datos confiables sobre la composición y las concentraciones de quinonas se requieren métodos versátiles para el procesamiento eficaz de las muestras y para el análisis.

El proceso de derivatización es una buena opción, la mayoría de los métodos la incluyen, pero se corre el riesgo de perder la molécula de interés como es el caso de algunas otras quinonas o que se modifiquen medianamente y el método no sea tan exitoso. Por otro lado, se ha logrado determinar la 9,10-FQ directamente por CG-EM, pero los autores concluyen que hace falta determinar un método para su análisis (Sousa 2015), todos los métodos propuestos tanto en gases como líquidos tienen sus limitaciones, pero aun así la molécula se ha determinado, sin embargo, sigue la discrepancia por cual método sea el más adecuado.

El análisis mediante CG-EM/EM y HPLC-EM/EM con quinonas derivatizadas puede llegar a ser una buena opción para el desarrollo de un método estándar (Toriba 2016) (Delhomme 2008) (Lintelmann 2005), ya que es un análisis más selectivo y sus resultados han sido exitosos, por otra parte en base a los experimentos realizados una buena opción para analizar la 9,10-FQ sería un análisis por ionización química, sin derivatización ya que es una técnica más suave y nos permitiría su determinación identificando su ion molecular, sin embargo hay que tomar en cuenta que debió a su baja reproducibilidad podría presentar variaciones el método que se desarrollaría.

Una recomendación para analizarla sería realizar experimentos sin lana de vidrio en el *liner* ya que este se encarga de retener moléculas orgánicas de baja concentración que puedan interferir con los análisis y la molécula de interés está en una concentración traza por lo que esto pudiera estar sucediendo.

7. PERSPECTIVAS

Aplicar la técnica adecuada a estándares de la 9,10-Fenantrenoquinona para el desarrollo de un método analítico para su determinación, optimizando parámetros cromatográficos.

Emplear el método a muestras reales, para su evaluación del desempeño y la confiabilidad del método analítico optimizado, así como su validación para posteriormente realizar una aplicación rutinaria para poder monitorearla y establecer parámetros de regulación.

Bibliografía

- Abián, Joaquín. «Introducción a la Espectrometría de Masas para la caracterización de péptidos y proteínas en Proteómica.» *Proteómica*, 2008: 16-32.
- Acquiaviva, Agustín. «Desarrollo y optimización de metodologías separativas de análisis de citrulina y aminoácidos metabólicamente relacionados.» *SEDICI*, Junio 2016.
- Alacant, Universitat d'. Editado por Servicios Tecnicos de investigacion. s.f.
<https://sstti.ua.es/es/instrumentacion-cientifica/unidad-de-analisis-termico/calorimetria-diferencial-de-barrido.html> (último acceso: 24 de Noviembre de 2020).
- Aldrich, Sigma. *Sigma Aldrich Co.* s.f. <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/analytical-reagents/derivatization-reagents/alkylation.html> (último acceso: 15 de 03 de 2021).
- Allen, Jonathan O. «Measurement of Oxygenated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Associated with a Size-Segregated Urban Aerosol.» *ENVIRONMENTAL SCIENCE & TECHNOLOGY* 31, nº 7 (1997): 2064-2070.
- Alonso, Isabel Sierra. *Análisis Instrumental*. netbiblo, 2009.
- Asahi, Miki. «Identification and Quantification of in Vivo Metabolites of 9,10-Phenanthrenequinone in Human Urine Associated with Producing Reactive Oxygen Species.» *Chemical Research in Toxicology*, December 2014: 76-85.
- Calzada, Susana Ávila. *e-media Revista española*. s.f. <https://www.e-medida.es/numero-10/cromatografia-de-gases-aplicada-a-la-industria-del-gas-natural/> (último acceso: 03 de 06 de 2021).
- Camilo, Ayala Bretón. «SECUENCIACIÓN DE PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS.» *INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM*, Junio 2004: 1-69.
- Cannon, Mariah. «PHENANTHRENE DERIVATIVES FOR SYNTHESIS AND APPLICATIONS IN MEDICINAL CHEMISTRY: A REVIEW.» *WORLD JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACEUTICAL SCIENCES*, 2019.
- Carrasco, Isabel Lasanta. «Estudio de adiciones de bismuto en aleaciones de ZIC-ALUMINIO.» 2013.
- Cedron, Loreto Alvarez. «High-performance liquid chromatographic validated assay of doxorubicin in rat plasma and tissues.» *Journal of chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications*, December 1998: 271-278.
- Charlson, Robert. «Climate Forcing by Anthropogenic Aerosols.» *Science*, 1992: 423-429.
- Chemical Book*. s.f.
https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_cb6272601.htm.

- ChemSpider. *ChemSpider*. s.f. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.6505.html> (último acceso: 12 de 08 de 2020).
- Chesis, L. Paul, David E. Levin, Matyn T. Smith, Lars Ernester, and Bruce N. Ames. «Mutagenicity of quinones: Pathways of metabolic activation and detoxification.» *Proc. Nati. Acad. Sci.*, 1984: 1696-1700.
- Cho, Arthur K. «Determination of Four Quinones in Diesel Exhaust Particles, SRM 1649a, and Atmospheric PM2.5 Special Issue of Aerosol Science and Technology on Findings from the Fine Particulate Matter Supersites Program.» *Aerosol Science and Technology*, agosto 2004: 37-41.
- Chung, Mun-Young. «Aerosol-borne quinones and reactive oxygen species generation by particulate matter extracts.» *Environmental Science & Technology* 40, nº 16 (2006): 4880-4886.
- civil, proteccion. 03 de 06 de 2020.
http://www.proteccioncivil.org/catalogo/carpeta02/carpeta22/gprarm/109_116.pdf.
- Delhomme, Olivier. «Determination of oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric aerosol samples by liquid chromatography–tandem mass spectrometry.» *Talanta*, 2008: 703-710.
- Ege, Seyhan. *Organic Chemistry, Structure and Reactivity*. España: Reverté, S.A, 2000.
- EPA, EE.UU.,. *Determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) en aire ambiente mediante cromatografía de gases / espectrometría de masas (GC / MD), método de compendio TO-13A*. 1999. <http://www.epa.gov/ttn/amtic/files/ambient/airtox/to-13arr.pdf> (último acceso: 21 de 10 de 2020).
- Eric Clar, Regina Schoental. *Polycyclic Hydrocarbons* . Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH, 1964.
- Fernandez, Arantza Eiguren. «Atmospheric formation of 9,10-phenanthraquinone in the Los Angeles air basin.» *ATMOSPHERIC ENVIROMENT*, 2008: 2312-2319.
- Fernandez, Arantzazu Eiguren. «Atmospheric Distribution of Gas- and Particle-Phase Quinones in Southern California.» *Aerosol Science and Technology*, 2008: 854- 861.
- Fernández-Lainez, Cynthia. «Espectrometría de masas en tándem: una nueva herramienta para el.» *Acta Pediátrica de México* 30 (5 2009): 258-263 .
- FJ, Green. «El manual Sigma-Aldrich de manchas, tintes e indicadores.» *Aldrich Chem*, 1990: 555.
- Geissman, T.A. *PRINCIPLES OF ORGANIC CHEMISTRY*. San Francisco: Reverté, s.a, 1973.
- Ghaderi, Sahba. «Chemical Ionization in Fourier Transform Mass Spectrometry .» *Anal. Chem.*, 1981: 428-437.
- Gimate, Adriana Barradas. «Occurrence and Potential Sources of Quinones associated with PM2.5 in Guadalajara, Mexico.» *Atmosphere*, 19 2017.

- Griesbaum, Karl. «Hydrocarbons.» *ULLMANN's Encyclopedia of industrial chemistry* 18 (06 2000): 133-189.
- Griesbeck, A.G. *Quinones and heteroatom analogues*. Stuttgart, 2006.
- Gutiérrez, Maria del Carmen. «LA CROMATOGRAFÍA DE GASES Y LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS: IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS CAUSANTES DE MAL OLOR.» *BOLETÍN INTEXTER (U.P.C.)*, 2002: 35-41.
- Gutsche, Carl David. *Fundamentos de química orgánica*. Reverté, S.A., 1979.
- Hanley, Chhavi Bhardwaj and Luke. «Ion sources for mass spectrometric identification and imaging of molecular species.» *ROYAL OF CHEMISTRY*, September 2013.
- Hansch, C., Leo, A., D. Hoekman. «Explorando QSAR - Constantes hidrofóbicas, electrónicas y estéricas.» *American Chemical Society*, 1995: 118.
- Harris, Daniel C. *Análisis Químico Cuantitativo*. Reverté, 2006.
- Harvey, David. *Química Analítica Moderna*. España: Mcgraw Hill Interamericana De Espana, 2002.
- Hawthorne, Jo. «Reactions of 2,2'-Biphenyldicarboxaldehyde.» *J. Org. Chem.*, 1963: 2831-2835.
- Helmig, Detlev. «OH radical-initiated gas-phase reaction products of phenanthrene .» *The Science of the Total Environment*, 1994: 11-21.
- Hernández, Imilla Casado. «Cytotoxicity in vitro and potential of quinoid compounds as antitumor agents.» *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 2016: 1-17.
- Ho, CS. «Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications.» *Clin Biochem*, Feb 2003: 3-12.
- Hofstadler, Steven A. «Electrospray Mass Spectrometry.» *Journal of Chemical Education* , s.f.: 82-88.
- Honda, Akiko. «Synergic effects of 9,10-phenanthrenequinone and cadmium on pro-inflammatory responses in airway epithelial cells.» *Environmental Toxicology and Pharmacology* 52 (2017): 276-279.
- Howard, P., y W Meylan. «Handbook of the Physical Properties of Organic Chemicals.» En *Handbook of the Physical Properties of Organic Chemicals*, de P. Howard y W Meylan, editado por Editores Lewis. 1997.
- Huang, Xuan Zhou Jiyang Pei Guangming. «Reactive paper spray mass spectrometry for in situ identification of quinones.» *Rapic Communications in Mass spectrometry* 19 (december 2014): 100-106.
- J.Barber. «Review Photosystem two.» *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 10 1998: 269-277.

- Jakober, Chris A. «LC-MS Analysis of Carbonyl Compounds and Their Occurrence in Diesel Emissions.» *Analytical Chemistry* 78, nº 14 (2006): 5086-5093.
- Jakober, Chris A. «Oxygenated organics in fine particle emissions from gasoline and diesel vehicles for source apportionment. Final report prepared for the California Air Resources Board.» Report to the California Air Resources Board, Department of Environmental Toxicology , University of California, Davis , California, 2005.
- Jakober, Chris A. «Quinone Emissions from Gasoline and Diesel Motor Vehicles.» *ENVIRONMENTAL SCIENCE & TECHNOLOGY* 41, nº 13 (2007): 4548-4554.
- John Durant, ARTHUR L. LAFLEUR, ELAINE F. PLUMMER, KOLI TAGHIZADEH, WILLIAM F. BUSBY JR., WILLIAM G. THILLY. «Human Lymphoblast Mutagens in Urban Airborne Particles.» *Environ. Sci. Technol.* 32, 1998: 1894-1906.
- Jont Barbas, Michael Sigman, Reza Dabestani. «Photochemical Oxidation of.» *Environ. Sci. Technol.*, 1996: 1776-1780.
- Judy L. Bolton, Michael A. Trush, Trevor M. Penning, Glenn Dryhursty Terrence J. Monks. «Role of Quinones in Toxicology..» *Chemical Research in Toxicology*, 02 2000: 135-160.
- Kanaly, Robert A. «9,10-Phenanthrene-1,10-dione biodegradation by a soil bacterium and identification of transformation products by LC/ESI-MS/MS.» *Chemosphere*, 2013: 1442-1449.
- Keyte, RM Harrison , G. Lammel. «Reactividad química y potencial de transporte de largo alcance de los hidrocarburos aromáticos policíclicos: una revisión.» *Chem Soc. Rev.*, 2013: 93333 - 93391.
- Kishikawa, Naoya. «4-Carbomethoxybenzaldehyde as a highly sensitive pre-column fluorescence derivatization reagent for 9,10-phenanthrenequinone.» *Talanta*, 2011: 809-812.
- Kishikawa, Naoya. «Analytical techniques for the determination of biologically active quinones in biological and environmental samples.» *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2013.
- Kishikawa, Naoya. «Concentration and trend of 9,10-phenanthrenequinone in airborne particulates collected in Nagasaki city, Japan.» *Chemosphere*, 2006: 834–838.
- Kishikawa, Naoya. «Determination of 9, 10-phenanthrenequinone in airborne particulates by high-performance liquid chromatography with post-column fluorescence derivatization using 2-aminothiophenol.» *Talanta*, 2010: 1852–1855.
- Kishikawa, Naoya. «Highly sensitive and selective determination of 9,10-phenanthrenequinone.» *Journal of Chromatography*, 20 2004: 83-88.
- Knapp, Daniel R. *Handbook of Analytical Derivatization Reactions*. John Wiley & Sons, 1979.
- Kumagai, Yoshito. «Inhibition of Nitric Oxide Formation by Neuronal Nitric Oxide Synthase by Quinones: Nitric Oxide Synthase as a Quinone Reductase.» *Chem. Res. Toxicol.* (American Chemical Society), 1998: 608-613.

- Kumagai, Yoshito. «Oxidation of Proximal Protein Sulfhydryls by Phenanthraquinone, a Component of Diesel Exhaust Particles.» *Chem. Res. Toxicol.*, 2002: 483-489.
- Lakowicz, Joseph R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer Science & Business Media, 2013.
- Lintelmann, Jutta. «Determination of selected polycyclic aromatic hydrocarbons and oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons in aerosol samples by high-performance liquid chromatography and liquid chromatography–tandem mass spectrometry.» *Anal Bioanal Chem*, 2005: 508-519.
- López, Julio. «Sistemas quinoides en química y farmacología.» *Medicina. Chem. Res.*, 2015: 3599 - 3620.
- Matsunaga, Toshiyuki. «Exposure to 9,10-phenanthrenequinone accelerates malignant progression of lung cancer cells through up-regulation of aldo-keto reductase 1B10.» *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2014: 1-10.
- Meylan, W.M., Howard, P.H. «Bond contribution method for estimating Henry's law constants.» *Environ. Toxicol. Chem.*, 1991: 1283-1293.
- Mirivel, Giovanni. «Simultaneous determination by ultra-performance liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization time-of-flight mass spectrometry of nitrated and oxygenated PAHs found in air and soot particles.» *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010: 243–256.
- Mitra, S. *Sample preparation Techniques on Analytical Chemistry*. New Jersey: by Somenth Mitra, 2003.
- Monks, TJ, y DC Jones. «The Metabolism and Toxicity of Quinones, Quinonimines, Quinone Methides, and Quinone-Thioethers.» *Current Drug Metabolism* 3 (2002): 425-438.
- Munson, Burnaby. «Chemical Ionization Mass Spectrometry: Theory and Applications.» *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 2006: 1-22.
- Newman, David J. «Productos naturales como fuente de nuevas drogas duras los 30 años de 1981 a 2010.» *Journal of Natural Products*, February 2012: 311-335.
- NIST. «National Institute of standards and technology.» 2018.
<https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C84117&Units=SI> (último acceso: 20 de 06 de 2020).
- Noguera, Bulmaro. *IQR*. 20 de Noviembre de 2020.
<https://www.ingenieriaquimicareviews.com/2020/11/cromatografia-de-gases.html> (último acceso: 2021 de 05 de 18).
- O'Neil, Maryadele J. *El índice de Merck : una enciclopedia de productos químicos, drogas y productos biológicos*. Nueva Jersey: Merck and Co., Inc, 2006.

- Passos, Marieta L. C. «Detection in UV-visible spectrophotometry: Detectors, detection systems, and detection strategies.» *Measurement* 135 (2019): 896-904.
- Peters, Zachary J. «Effect of copper on the cytotoxicity of phenanthrene and 9,10-phenanthrenequinone to the human placental cell line, JEG-3.» *Reproductive Toxicology*, February 2007: 513-520.
- Rodriguez, Chester. «9,10-Phenanthrenequinone induces DNA deletions and forward 9,10-Phenanthrenequinone induces DNA deletions and forward 9,10-Phenanthrenequinone induces DNA deletions and forward.» *Toxicology in Vitro*, 2008: 296–300.
- Rodriguez, Chester E. «An examination of quinone toxicity using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* model system.» *Toxicology*, 2004: 185–196.
- Rodriguez, José. «Agilent Technologies.» s.f.
https://www.um.es/documents/1765772/1843567/sic_seminario_em_usuarios_2010.pdf/a7b695e4-2594-4f32-8150-fe8ffbe98ee1 (último acceso: 18 de 05 de 2021).
- Rosenfeld, Jack M. «Derivatization in the current practice of analytical chemistry.» *Analytical Chemistry* 22, nº 11 (2003).
- Saborit, Juana Maria Delgado. «Analysis of atmospheric concentrations of quinones and polycyclic aromatic hydrocarbons in vapour and particulate phases.» *Atmospheric Environment*, 2013: 974-982.
- Santos, Leila O. «Simultaneous determination of PAHS, nitro-PAHS and quinones in surface and groundwater samples using SDME/GC-MS.» *Microchemical Journal*, 2017: 431-440.
- Saraiva, Passos. «Detection in UV-visible spectrophotometry: Detectors, detection systems, and detection strategies.» *Measurement*, March 2019: 896-904.
- Shimada, Hideaki. «9,10-Phenanthrenequinone, a Component of Diesel Exhaust Particles, Inhibits the Reduction of 4-Benzoylpyridine and All-trans-retinal and Mediates Superoxide Formation through Its Redox Cycling in Pig Heart.» *Chem. Res. Toxicol.*, 2004: 1145-1150.
- Shrader, Stephen. *INTRODUCTORY MASS SPECTROMETRY*. Taylor & Francis Group, 2014.
- Siuzdak, Gary. «An Introduction to Mass Spectrometry Ionization: An Excerpt from The Expanding Role of Mass Spectrometry in Biotechnology.» En *The Scripps Research Institute, Center for Mass Spectrometry*, de Gary Siuzdak. San Diego: MCC Press, 2005.
- Skoog, Douglas A. *Principios de análisis instrumental*. Madrid, España: Mc Graw Hill, 2001.
- Sousa, Eliane Teixeira. «Direct determination of quinones in fine atmospheric particulate matter by GC–MS.» *Microchemical Journal*, January 2015: 26-31.
- Sousa, Eliane Teixeira. «Evaluation of thermal stability of quinones by thermal analysis techniques.» *Thermochimica Acta*, october 2012: 1-5.

- Sousa, Eliane Teixeira. «Fontes, formação, reatividade e determinação de quinonas na atmosfera.» Mayo 2016.
- Stashenko, Elena E. «CG-MS: Más de un Analizador de Masas, ¿Para qué?» *Instituto Internacional de Cromatografía*, 2010: 25-48.
- Sugimoto, Kumaga. «9,10-Phenanthraquinone in diesel exhaust particles downregulates Cu,Zn-SOD and HO-1 in human pulmonary epithelial cells: Intracellular iron scavenger 1,10-phenanthroline affords protection against apoptosis.» *Free Radical Biology & Medicine*, 2005: 388 – 395.
- Taguchi, Keiko. «An approach to evaluate two-electron reduction of 9,10-phenanthraquinone and redox activity of the hydroquinone associated with oxidative stress.» *Free Radical Biology & Medicine* 43 (2007): 789-799.
- Taguchi, Keiko. «Redox cycling of 9,10-phenanthraquinone to cause oxidative stress is terminated through its monoglucuronide conjugation in human pulmonary epithelial A549 cells.» *Free Radical Biology & Medicine*, 2008: 1645-1655.
- Tian, Mi. «Study on the synthesis and structure–effect.» *biological and chemical luminescence*, octubre 2013.
- Toriba, Akira. «Simultaneous determination of polycyclic aromatic hydrocarbon quinones by gas chromatography-tandem mass spectrometry, following a one-pot reductive trimethylsilyl derivatization.» *Journal of Chromatography A*, agosto 2016: 89-100.
- Tukaj, Zbigniew. «Toxic effects of anthraquinone and phenanthrenequinone upon *Scenedesmus* strains (green algae) at low and elevated concentration of CO₂.» *Chemosphere*, July 2007: 480–487.
- Turro, Nicholas J. *Principles of Molecular Photochemistry: An Introduction*. Sausalito, Calif.: University Science Books, 2009.
- UNAM. *Técnicas Cromatográficas*. diciembre de 2007.
http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/M.Cromatograficos_6700.pdf (último acceso: 24 de 10 de 2021).
- Wang, Lin. «Formation of 9,10-phenanthrenequinone by atmospheric gas-phase reactions of phenanthrene.» *Atmospheric Environment*, 2007: 2025–2035.
- Wnorowski, Andrzej. «Profiling quinones in ambient air samples collected from the Athabasca region (Canada).» *Chemosphere*, 2017: 55-56.
- Worsfold, Paul. «Gas Chromatography | Environmental Applications.» *Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition)*, 2005: 129*139.
- Yang, Manli. «Cytotoxicity of Air Pollutant 9,10-Phenanthrenequinone: Role of Reactive Oxygen Species and Redox Signaling.» *BioMed Research International*, junio 2018: 1-15.

Yoshito, Kumagai. «Oxidation of Proximal Protein Sulfhydryls by Phenanthraquinone, a Component of Diesel Exhaust Particles.» *Chem. Res. Toxicol.*, 2002: 483-489.

Zenkevich, Igor G. *ENCYCLOPEDIA OF CHROMATOGRAPHY*. JACK CAZES, 2009.

ANEXOS

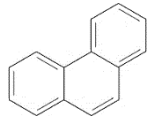
ANEXO A: Propiedades químicas de 9,10-Fenantrenoquinona y su precursor

- 9,10-Fenantrenoquinona

CAS	PM (g/mol)	Pf (°C)	Pe (°C)	Pv (mmHg)	Solubilidad en H ₂ O	Log K _{ow} (20°C)	Constante de Henry (atm·m ³ /mol)
84-11-7	208.21	206-207	360	2.33x10 ⁻⁶ 8.52x10 ⁻⁷	0.4 mg / mL	2.52	2.70x10 ⁻⁹ 1.07x10 ⁻⁸

Otros nombres: Phenanthrenequinone; Phenanthraquinone; Phenanthrene, 9,10-dihydro-9,10-dioxo-; 9,10-Phenanthraquinone; 9,10-Phenanthrenequinone; Phenanthroquinone; 9,10-Phenanthroquinone

- Fenantreno

ESTRUCTURA	CAS	PM (g/mol)	Pf (°C)	Pe (°C)	Pv (Pa a 25°C)	Solubilidad en H ₂ O μg/L	Log K _{ow} (20°C)	Constante de Henry (kPa)
	85-01-8	208.21	100.5	342	1.6x10 ⁻²	1.29x10 ³	4.6	3.98x10 ⁻³

CAS: Chemical Abstract Service

PM: peso molecular

Pf: punto fusión

Pe: punto de ebullición

Pv: Presión de vapor

Log K_{ow}:

ANEXO B: Cálculos parte experimental

- **Concentración en nanogramos solución stock (experimentos preliminares)**

$$(0.00012g) \left(\frac{1 \times 10^9}{1g} \right) = 120000 \text{ ng}$$

$$\text{Concentracion} = \frac{120000 \text{ ng}}{1 \text{ mL}} = 120000 \text{ ng/mL}$$

- La solución stock se diluye 10 veces

$$\frac{120000 \text{ ng/mL}}{10} = 12000 \frac{\text{ng}}{\text{mL}} \text{ disolución 1}$$

$C_1V_1 = C_2V_2$ por lo que de la disolución stock se tomaran: $V_1 = \frac{(12000 \text{ ng/mL})(1000 \mu\text{L})}{120000 \text{ ng/mL}} = 100 \mu\text{L}$ para llegar a la concentración de la disolución 1: 12000 ng/mL

La disolución 1 se diluye 10 veces

$$\frac{12000 \text{ ng/mL}}{10} = 1200 \frac{\text{ng}}{\text{mL}} \text{ disolución 2}$$

$C_1V_1 = C_2V_1$ por lo que de la disolución stock se tomaran: $V_1 = \frac{(1200 \text{ ng/mL})(1000 \mu\text{L})}{12000 \text{ ng/mL}} = 100 \mu\text{L}$ para llegar a la concentración de la disolución 2: 1200 ng/mL

- **Concentración en nanogramos solución stock (experimentos con rango de temperatura)**

$$(0.00010g) \left(\frac{1 \times 10^9}{1g} \right) = 100000 \text{ ng}$$

$$\text{Concentracion} = \frac{100000 \text{ ng}}{1 \text{ mL}} = 100000 \text{ ng/mL}$$

- La solución stock se diluye 10 veces

$$\frac{100000 \text{ ng/mL}}{10} = 10000 \frac{\text{ng}}{\text{mL}} \text{ disolución 1}$$

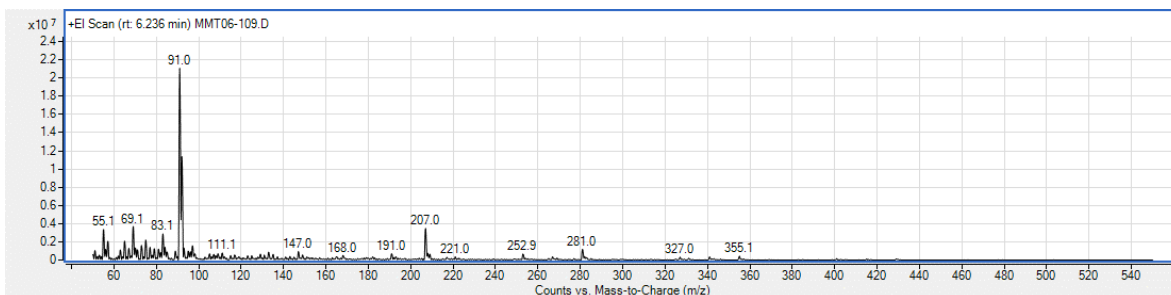
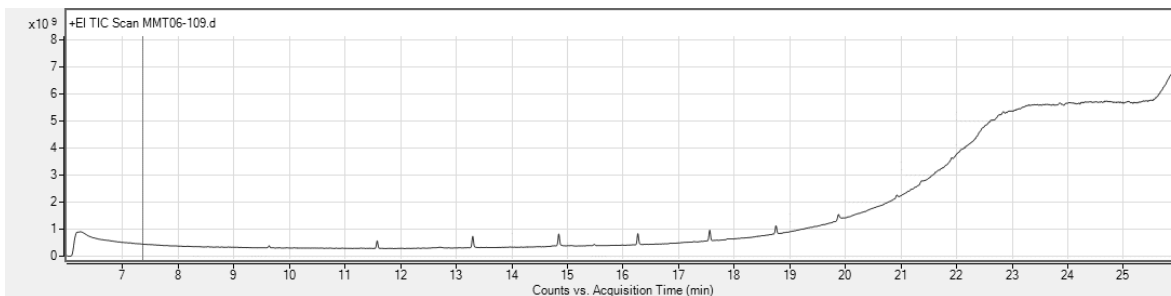
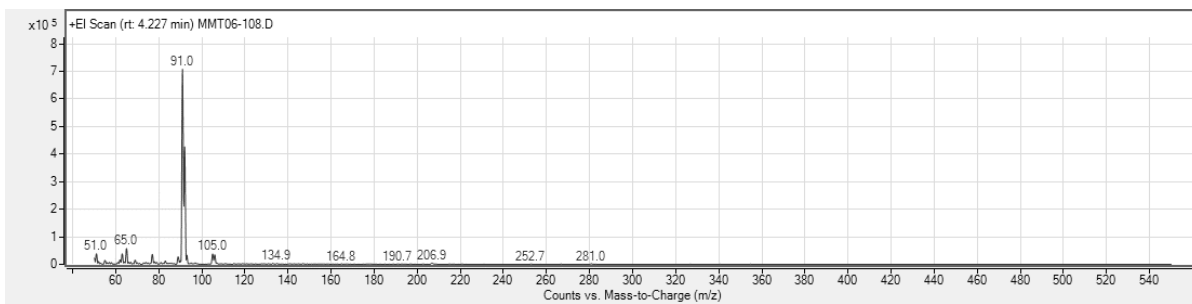
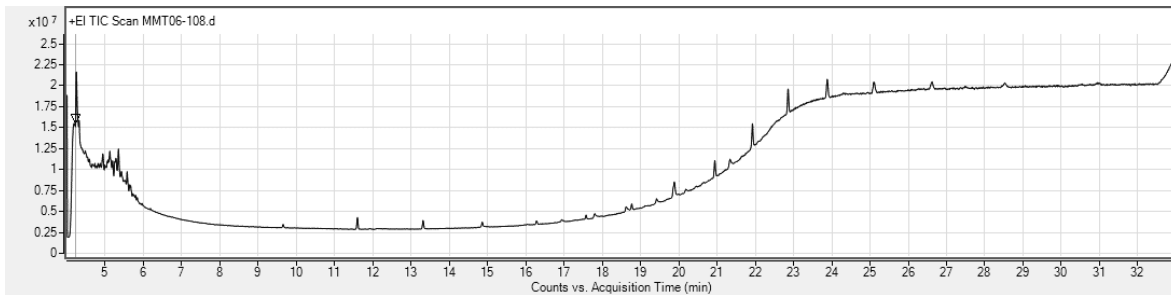
$C_1V_1 = C_2V_1$ por lo que de la disolución stock se tomaran: $V_1 = \frac{(10000 \text{ ng/mL})(1000 \mu\text{L})}{100000 \text{ ng/mL}} = 100 \mu\text{L}$ para llegar a la concentración de la disolución 1: 10000 ng/mL

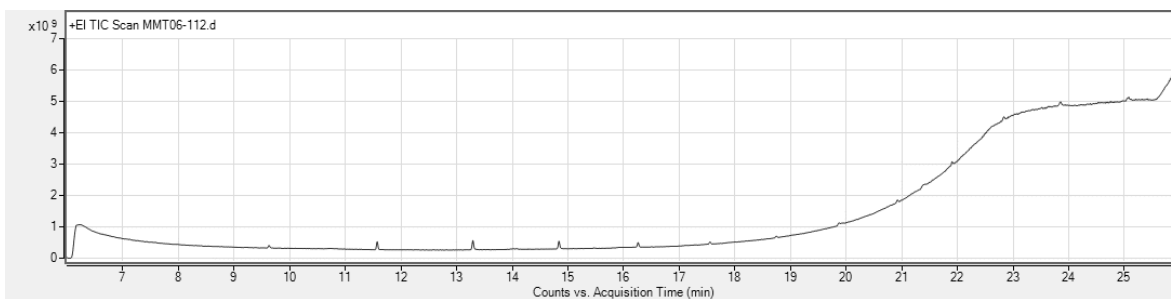
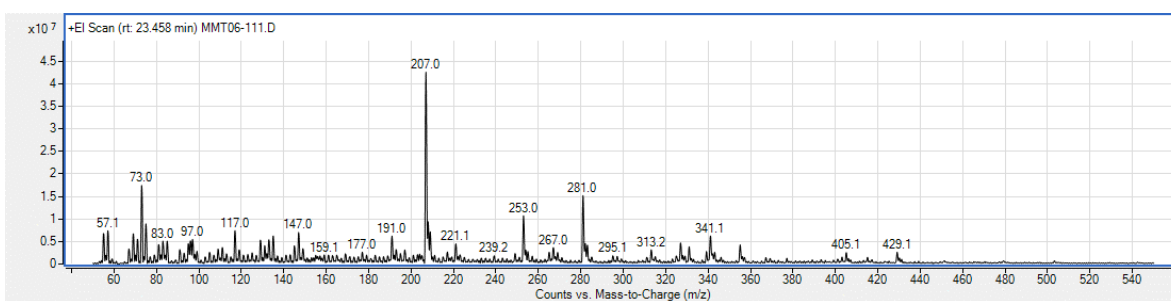
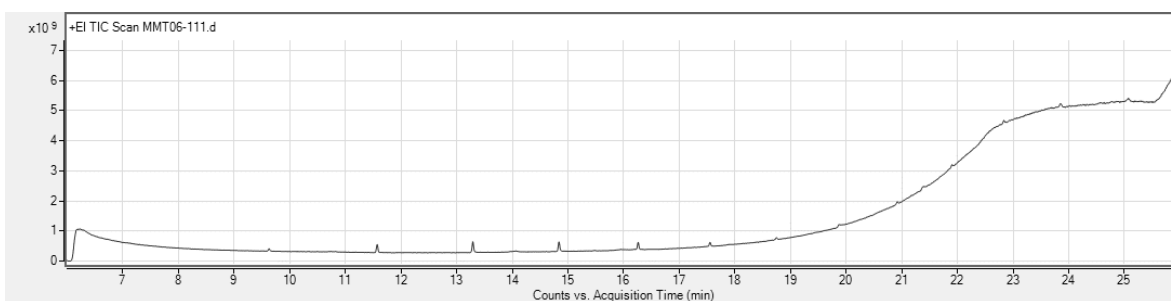
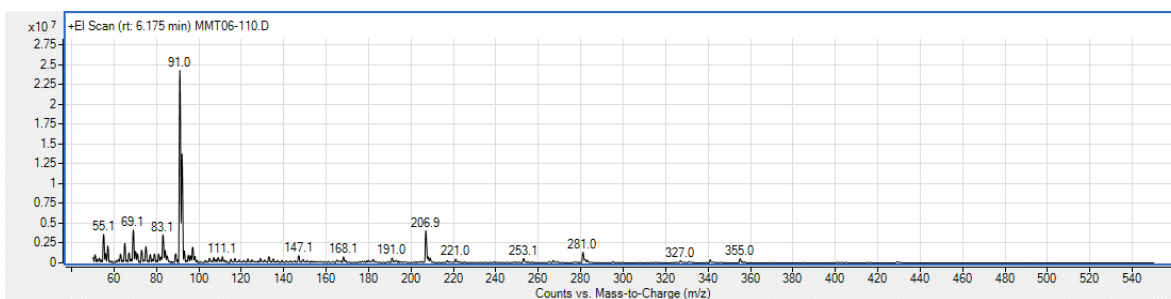
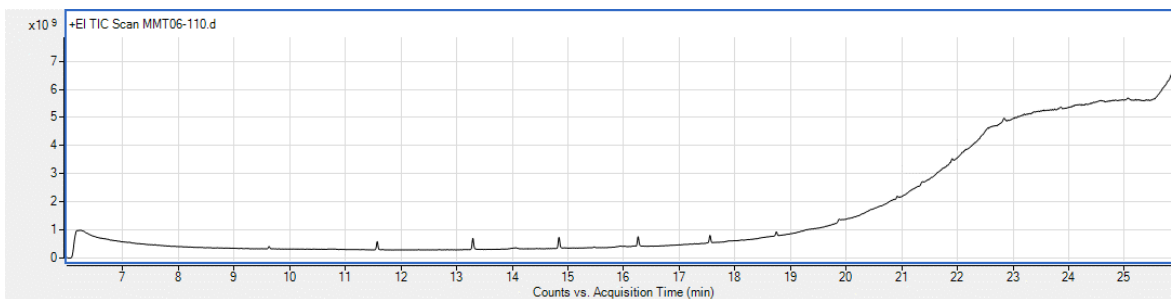
La disolución 1 se diluye 10 veces

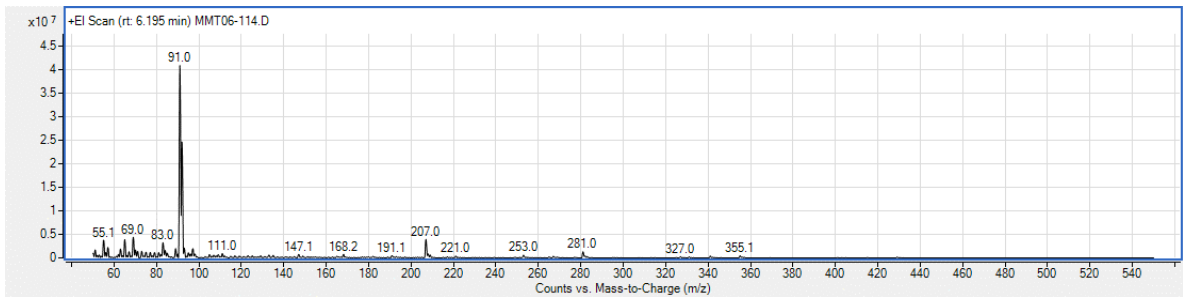
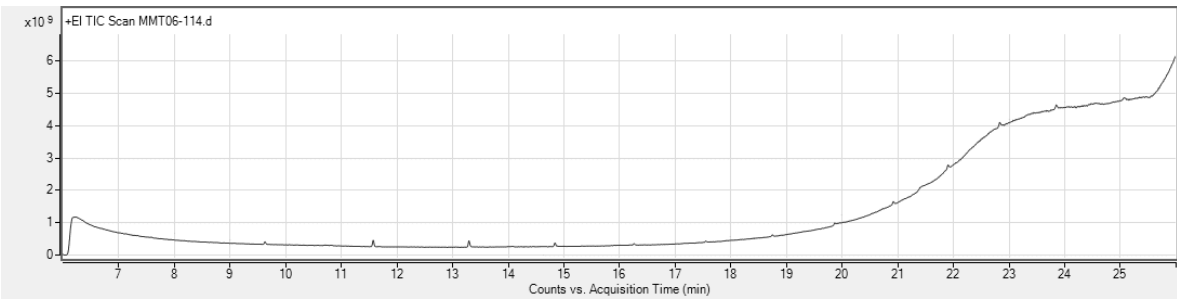
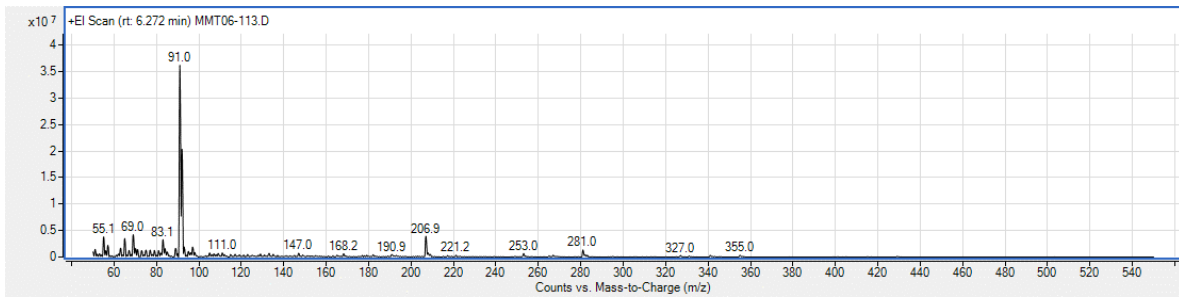
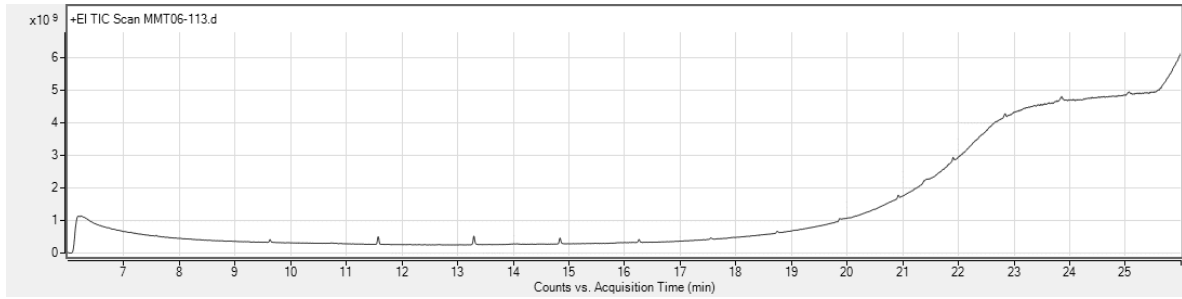
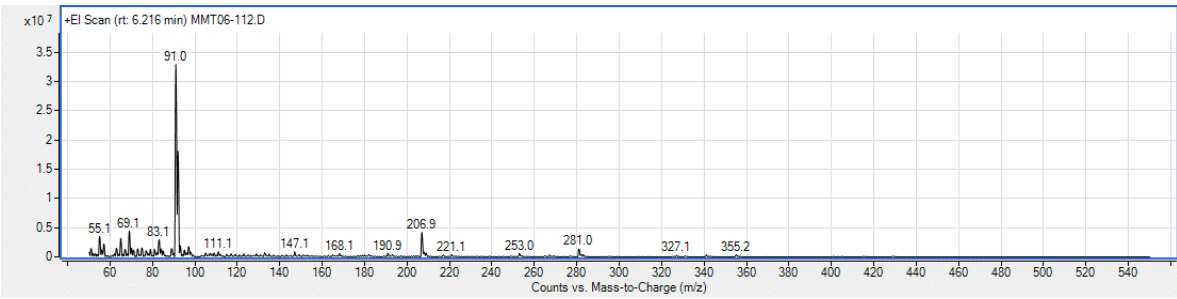
$$\frac{10000 \text{ ng/mL}}{10} = 1000 \frac{\text{ng}}{\text{mL}} \text{ disolución 2}$$

$C_1V_1 = C_2V_1$ por lo que de la disolución stock se tomaran: $V_1 = \frac{(1000 \text{ ng/mL})(1000 \mu\text{L})}{10000 \text{ ng/mL}} = 100 \mu\text{L}$ para llegar a la concentración de la disolución 2: 1000 ng/mL

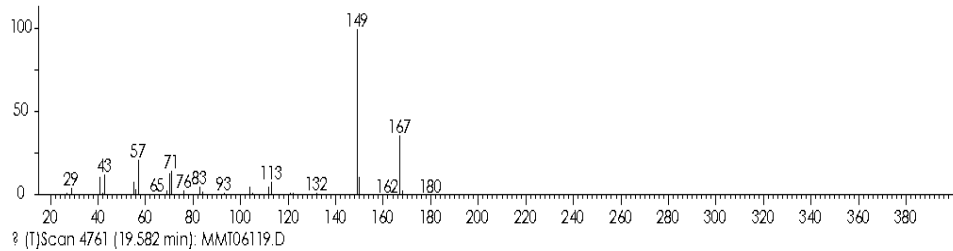
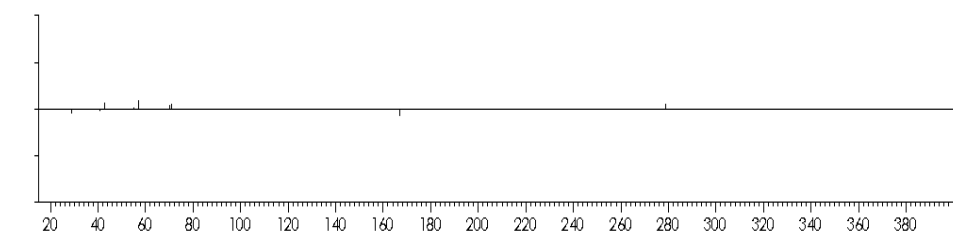
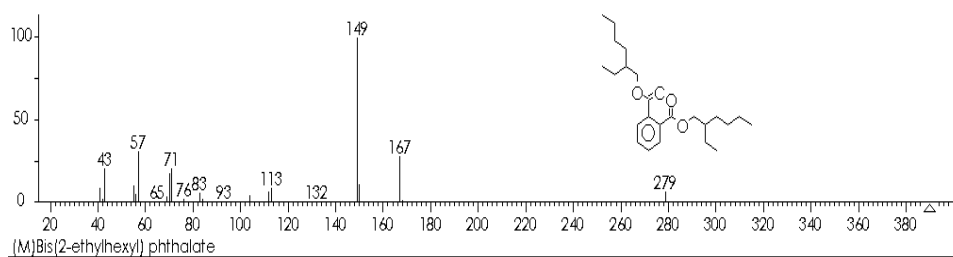
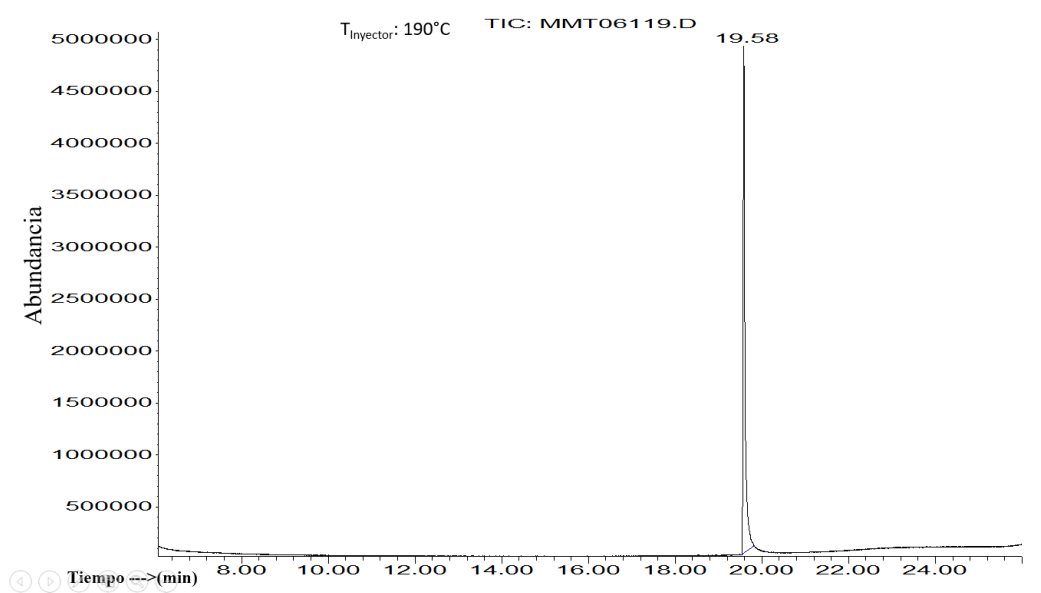
ANEXO C: Análisis CG-EM (equipo de triple cuadrupolo, usando modo simple)







ANEXO D: Análisis CG-EM



ANEXO E: Productos académicos

Resúmenes en memorias de Congresos

Salgado- Torres, Atzimba Mabel¹; Murillo- Tovar, Mario Alfonso. Evaluación De Técnicas Cromatográficas Acopladas A Espectrometría de Masas Para La Determinación De 9,10-Fenantrenoquinona. XXXIII Congreso Nacional de Química Analítica (AMQA). EST003.

Resúmenes en memorias de Simposios

Salgado- Torres, Atzimba Mabel¹; Murillo- Tovar, Mario Alfonso. Evaluación De Técnicas Cromatográficas Acopladas A Masas Para La Determinación De 9,10-Fenantrenoquinona. 2do simposio anual de materiales CIDETEQ “Desarrollo de Materiales y Tecnologías con Aplicaciones en Energía, Industria y Medio Ambiente”

Menciones

Premio al Mejor cartel en el área de química y física del ambiente

Salgado- Torres, Atzimba Mabel¹; Murillo- Tovar, Mario Alfonso. Evaluación De Técnicas Cromatográficas Acopladas A Masas Para La Determinación De 9,10-Fenantrenoquinona. Enel Marco de celebración del 25 aniversario de CIQ.

Conferencias

Salgado- Torres, Atzimba Mabel¹; Murillo- Tovar, Mario Alfonso. Evaluación De Técnicas Cromatográficas Acopladas A Masas Para La Determinación De 9,10-Fenantrenoquinona. LatinXChem 2021 Twitter Poster Conference.



AMQA
ASOCIACIÓN MEXICANA DE QUÍMICA ANALÍTICA A.C.



UAdeC

Dirección de Asuntos
Académicos



**Universidad
Autónoma
de Coahuila**

XXXIII
CONGRESO
NACIONAL
DE QUÍMICA
ANALÍTICA

XXXIII
SIMPOSIO
ESTUDIANTIL

CONSTANCIA

A: Atzimba Mabel Salgado-Torres, Mario Alfonso Murillo-Tovar

Por su presentación del trabajo en modo Cártel: “Evaluación de Técnicas Cromatográficas Acopladas a Masas para la Determinación de 9,10 fenantrenoquinona.”.

Lo anterior en el marco de las actividades del **XXIII Congreso Nacional de Química Analítica** y **XXIII Simposio Estudiantil** realizado del 9 al 11 de junio de 2021 a través de la plataforma Microsoft Teams de la **Universidad Autónoma de Coahuila**.

Saltillo, Coahuila. 11 de junio de 2021

Dra. María Teresa Ramírez Silva
Presidenta Asociación Mexicana de Química Analítica

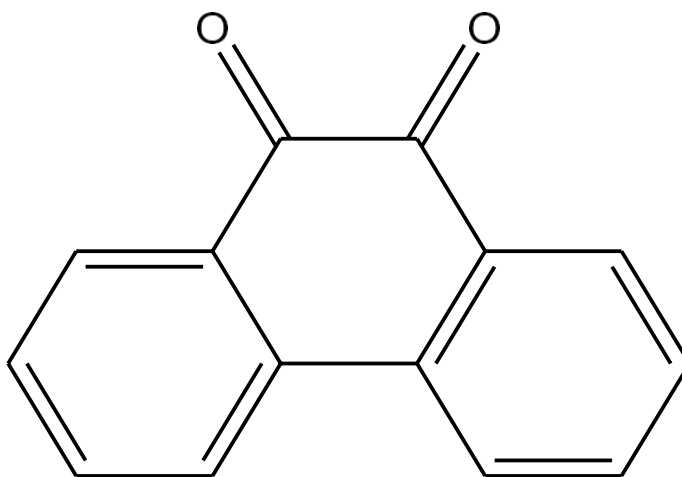
Dr. Gerardo de Jesús Sosa Santillán
Director Facultad de Ciencias Químicas UAdeC



Est003. Cartel. Jueves 10 de junio de 16:30 a 16:40 hrs

Evaluación de técnicas cromatográficas acopladas a espectrometría de masas para la determinación de 9,10-Fenantrenoquinona

Evaluation of chromatographic techniques coupled to mass spectrometry for the determination of 9,10 -Phenanthrenequinone



Atzimba Mabel Salgado-Torres*, Mario Alfonso Murillo-Tovar**.
Universidad Autónoma del Estado de Morelos, IICBA-CIQ, Lab.313, Avenida
Universidad No. 1001, Chamilpa, 62209 Cuernavaca, Morelos, México.

*Correspondencia para autor: Atzimba Mabel Salgado Torres

**Correspondencia para autor: Mario Alfonso Murillo-Tovar

Universidad Autónoma del Estado de Morelos

Correo electrónico: atzimba.salgadotor@uaem.edu.mx / mario.murillo@uaem.mx

Resumen

La 9,10 fenantrenoquinona es un compuesto de interés toxicológico ya que es dañino para el medio ambiente y la salud humana, se ha reportado que su inhalación puede causar diversas enfermedades como inflamaciones en las vías respiratorias, alergias, asma y puede llegar hasta causar cáncer a largo plazo. La determinación de esta molécula en compartimientos ambientales representa un desafío analítico debido a que se encuentra en concentraciones traza dentro de una mezcla compleja, en este trabajo se realizó una investigación experimental en donde se pretende evitar la derivatización, se realiza una disolución stock de la quinona y posteriormente una serie de disoluciones hasta llegar a una concentración traza, se lleva a un análisis cromatográfico en donde se hacen inyecciones para llegar a las condiciones óptimas de inyección y separación para posteriormente continuar con experimentos de MRM, sin embargo, los resultados no son satisfactorios ya que la quinona se degradaba en el puerto de inyección, por esta razón se optó por hacer un análisis directo en ionización química, teniendo resultados favorables, debido a esto se pretende probar y evaluar las técnicas cromatográficas y sus fuentes de ionización para distinguir cuál es la más óptima para su análisis.

Palabras Clave: 9,10-fenantrenoquinona, cromatografía, toxicológico, muestras ambientales

Abstract

Phenanthrenoquinone 9,10 is a compound of toxicological interest since it is harmful to the environment and human health, it has been reported that its inhalation can cause various diseases such as inflammation in the respiratory tract, allergies, asthma and can even cause cancer long-term. The determination of this molecule in environmental compartments represents an analytical challenge because it is found in trace concentrations within a complex mixture, in this work an experimental investigation was carried out in which it is intended to avoid derivatization, a stock solution of quinone is made and subsequently a series of solutions until reaching a trace concentration, it is taken to a chromatographic analysis where injections are made to reach the optimal injection and separation conditions to later continue with MRM experiments, however, the results are not satisfactory Since quinone was degraded in the injection port, for this reason it was chosen to make a direct analysis in chemical ionization, having favorable results, due to this it is intended to test and evaluate the chromatographic techniques and their ionization sources to distinguish which is the most optimal for your analysis.

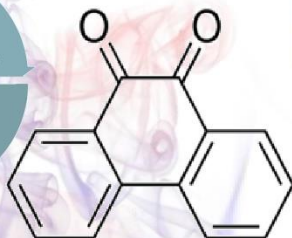
Key words: 9,10-phenanthrenoquinone, chromatography, toxicological, environmental samples

EVALUACIÓN DE TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS ACOPLADAS A ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA LA DETERMINACIÓN DE 9,10 FENANTRENOQUINONA

Salgado-Torres, Atzimba Mabel; Murillo-Tovar, Mario Alfonso

Centro de Investigaciones Químicas-IICBA Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad no. 1001 Chamilpa, Cuernavaca Morelos CP.62210 correo: mabelsalgado@gmail.com; mario.murillo@uaem.mx

INTRODUCCIÓN



METODOLOGÍA



La determinación de esta molécula en compartimientos ambientales representa un desafío analítico debido a que se encuentra en concentraciones traza dentro de una mezcla compleja, en este trabajo se está realizando experimentos para evaluar la factibilidad del uso de métodos cromatográficos para su identificación y cuantificación en muestras ambientales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las pruebas que se realizaron en el equipo de CG-MS de triple cuadrupolo en modo simple lo único que se puede observar es un ion de 91 m/z que posiblemente puede pertenecer al disolvente seleccionado (tolueno).

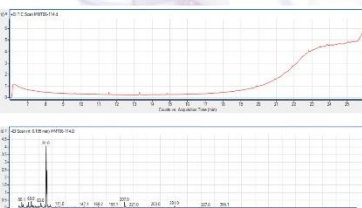


Fig. 1 Cromatograma del estándar de la 9,10 FQ y su espectro de masas

La 9,10 fenantrenoquinona aparentemente se está degradando, aunque no se observan señales de los fragmentos producidos por la degradación.



Fig. 2 Cromatograma del estándar de la 9,10 FQ

Antes de los siguientes experimentos se inyecta un blanco del disolvente seleccionado.

En el cromatograma se observa una señal muy abundante en el tiempo de retención

aproximado de 19 min, lo cual se pensó que era el compuesto de interés sin embargo al extraer el espectro de masas (fig. 3) puede observar un ion de

180 m/z que ayuda a identificar inequívocamente a la molécula pero en una abundancia muy baja

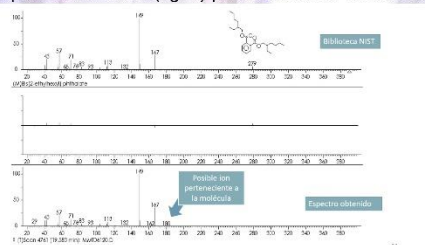


Fig. 2 Espectro de masas obtenido de la figura 2

Se realiza un experimento en ionización química el cual muestra resultados satisfactorios, se logra observar el ion cuasi-molecular 209 m/z y el ion más estable que identifica a la molécula que nos sugiere la revisión bibliográfica 180 m/z, el ion de 83 m/z perteneciente al disolvente utilizado, lo que sugiere que puede ser una buena opción para los análisis de esta molécula.

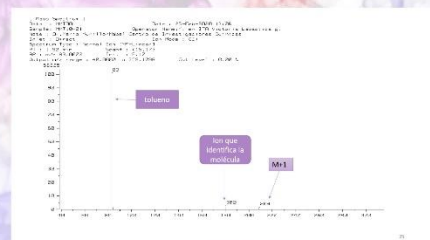


Fig. 4: Espectro de masas en un modo de ionización química (+)

CONCLUSIONES

En base a los experimentos realizados una buena opción para analizar la 9,10 fenantrenoquinona sería un análisis por ionización química, sin derivatización ya que es una técnica más suave y nos permitiría su determinación identificando su ion molecular sin embargo debió a su baja reproducibilidad podría presentar variaciones el método que se desarrollaría.

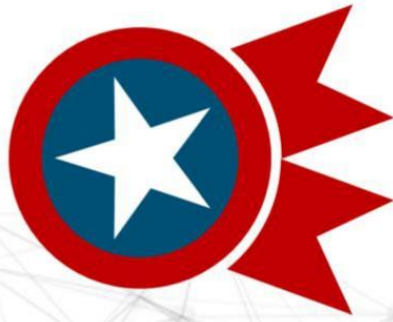
Una recomendación para analizarla por CG sería realizar experimentos sin lana de vidrio en el *liner* ya que este se encarga de retener moléculas orgánicas de baja concentración que puedan interferir con los análisis y la molécula de interés se encuentra en una concentración ambiental traza por lo que puede que esto esté sucediendo.

AGRADECIMIENTOS

Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Centro de Investigaciones Químicas, Lab313, LANEM; ASOCIACIÓN DE QUÍMICA ANALÍTICA A.C

REFERENCIAS

- Asahi, Miki, Hi M, Kawai M, Toyama T, Kumagai Y, Chusuard T, Tang N, Kameda T, Hayakawa K, Toriba A. *Chemical Research in Toxicology*, diciembre de 2014: 76-85;
- Cho, Arthur K, Emma D, Stefano, Ying You, Chester E, Rodriguez, Debra A, Schmitz, Yoshito Kumagai, Antonio H, Miguel, Arantazu Eiguren-Fernandez, Takahiro Kobayashi, Ed Avol & John R. *Aerosol Science and Technology*, agosto de 2014: 37-41.
- Naoya K, Naotaka Kuroda. *Revista de análisis farmacéutico y biomédico*, 2013; 4-Naoya K; Maiko N; Yoshihito O; Kenichiro N; *Chemosphere*, 2006: 834-838;
- Naoya K; Hajime N; Kaname O; Kenichiro N. Naotaka K. *Talanta*, 2010: 1852-1855;
- Kishikawa, Naoya. *Journal of Chromatography*, 20 2004: 83-88;
- Sousa, Eliane Teixeira. *Microchemical Journal*, enero de 2015: 26-31.
- Sousa, ET; Wilson AL; Jailson B. de Andrade. *Journal of Chromatography A*, mayo de 2016; 9-10; Toriba, Akira. *Revista de Cromatografía A*, agosto de 2016: 89-100



Capítulo estudiantil
SMMater – CIDETEQ

OTORGA EL PRESENTE

RECONOCIMIENTO

A

Salgado-Torres, Atzimba Mabel; Murillo-Tovar, Mario Alfonso

Por su destacada participación en el **CONCURSO DE CARTELES** del 2do Simposio Anual de Materiales “Energía, Industria y Medio Ambiente” con el trabajo titulado:

Evaluación de Técnicas Cromatográficas Acopladas a Masas para la Determinación de 9,10 Fenantrenoquinona.

Celebrado los días 27 y 28 de mayo del 2021, en modalidad remota en la plataforma Zoom.

Dra. Julieta Torres González
Directora General de CIDETEQ.

Dr. J. Manuel Mora Hernández
Coordinador de Capítulos Estudiantiles de la SMMater.

M. en E.Q. Jesús A. Pérez García
Presidente del Capítulo Estudiantil SMMater – CIDETEQ.



CONACYT
Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología



Sociedad Mexicana
de Materiales A.C.



Capítulo estudiantil
SMMater – CIDETEQ



“Evaluación De Técnicas Cromatográficas Acopladas A Masas Para La Determinación De 9,10Fenantrenoquinona”

Salgado- Torres, Atzimba Mabel¹; Murillo- Tovar, Mario Alfonso^{1,2}
UAEM, IICBA-CIQ, Lab.313, Avenida Universidad No. 1001, Chamilpa, 62209 Cuernavaca,
Morelos, México

Palabras clave: Cromatografía, 9,10 fenantrenoquinona, toxicología

Resumen

Introducción: La 9,10 fenantrenoquinona es un compuesto de interés toxicológico ya que es dañino para el medio ambiente y la salud humana, se ha reportado que su inhalación puede causar diversas enfermedades como inflamaciones en las vías respiratorias, alergias, asma y puede llegar hasta causar cáncer a largo plazo. La determinación de esta molécula en compartimientos ambientales representa un desafío analítico debido a que se encuentra en concentraciones traza dentro de una mezcla compleja, en este trabajo se realizó una investigación experimental y bibliográfica sobre la factibilidad del uso de métodos cromatográficos para su identificación y cuantificación en muestras ambientales.

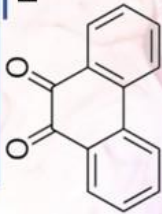
Materiales y Métodos: Se realiza un estándar de 9,10 fenantrenoquinona mediante una serie de disoluciones para llegar a una concentración de 1,000 ng/mL y se analiza por cromatografía de gases dos distintas fuentes de ionización: impacto electrónico, ionización química.

Resultados y Discusión: El análisis de esta molécula por CG se dificulta principalmente por su inestabilidad térmica, Cho fue el primer informe que ha logrado cuantificarla mediante su derivatización con zinc, el cual ha sido la más eficiente y la más usada, sin embargo, al implementar una derivación de moléculas en niveles ambientales traza se corre mucho riesgo (Sousa, 2015). Se realiza un experimento en ionización química el cual muestra resultados satisfactorios, se logra observar el ion cuasi-molecular 209 m/z y el ion más estable que identifica a la molécula que nos sugiere la revisión bibliográfica 180 m/z , el ion de 83 m/z perteneciente al disolvente utilizado, lo que sugiere que puede ser una buena opción para los análisis de esta molécula. Una alternativa muy promisoriosa es CG-EM/EM, se desarrolló un método con quinonas derivatizadas el cual sensible y selectivo, e incluso la sensibilidad fue mayor que el análisis directo con el mismo método de CG-EM/EM.

Conclusión: Los métodos implementados para el análisis de la quinona han sido satisfactorios, sin embargo, aún se requiere un método estándar para lograr regularla, en base a los experimentos y a la revisión bibliográfica una buena opción para analizar la 9,10 fenantrenoquinona será un análisis por ionización química, sin derivatización ya que es una técnica suave que permitiría su determinación identificando su ion molecular, sin embargo debido a su baja reproducibilidad podría presentar variaciones el método que se desarrollaría.

Referencias

Cho, Arthur K. «Determination of Four Quinones in Diesel Exhaust Particles, SRM 1649a, and Atmospheric PM2.5 Special Issue of Aerosol Science and Technology on Findings from the Fine Particulate Matter Supersites Program. » *Aerosol Science and Technology*, agosto 2014: 37-41; Kishikawa, Naoya. «Analytical techniques for the determination of biologically active quinones in biological and environmental samples. » *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2013; Sousa, Eliane Teixeira. «Direct determination of quinones in fine atmospheric particulate matter by CG-EM. » *Microchemical Journal*, January 2015: 26-31.



EVALUACIÓN DE TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS ACOPLADAS A MASAS PARA LA DETERMINACIÓN DE 9,10-FENANTRENOQUINONA

Salgado-Torres, Azirimba Mateo; Murillo-Tovar, Mario Alfonso
 Centro de Investigaciones Químicas-ICQA Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad s/n. 1001 Chamilla, Cuernavaca Morelos CP. 62210

INTRODUCCIÓN

La 9,10-fenantrenoquinona es un compuesto de interés toxicológico ya que es dañino para el medio ambiente y la salud humana, se ha reportado que su inhalación puede causar diversas enfermedades como inflamaciones en las vías respiratorias, alergias, asma y puede llegar hasta causar cáncer a largo plazo. La determinación de esta molécula en compartimentos ambientales representa un desafío analítico debido a que se encuentra en concentraciones traza dentro de una mezcla compleja, en este trabajo se realizó una investigación experimental y bibliográfica sobre la factibilidad del uso de métodos cromatográficos para su identificación y cuantificación en muestras ambientales.



METODOLOGÍA



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de esta molécula por CG se dificulta principalmente por su inestabilidad térmica, Cho fue el primer informe que ha logrado cuantificarla mediante su derivatización con zinc (fig. 1), el cual ha sido la más usada, sin embargo, al implementar una derivación de moléculas en niveles ambientales traza se corre mucho riesgo (Souza, 2015), por esta razón se realizó una comparación de moléculas en su forma derivatizada acetilada, y no derivatizadas (figura 3) en donde se puede observar que la molécula no derivatizada se observa en un menor tiempo de retención y mayor abundancia, lo que significa que es más recomendable realizar inyecciones directas, sin embargo la fuente de ionización de impacto electrónico no puede ser la más adecuada por las por las propiedades de la molécula.



Fig. 1: 9,10-fenantrenoquinona y su derivado diacetilo (Cho, 2014)

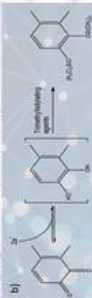


Fig. 2: Reacción de derivatización reductiva one-pot con trimethylsilyl sobre HAPs (Toribas, 2016)

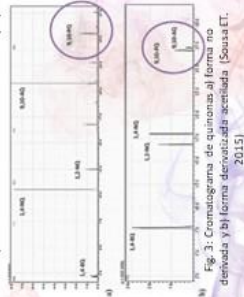


Fig. 3: Cromatograma de quinona a) forma no derivada y b) forma derivada acetilada (Souza ET. 2015)

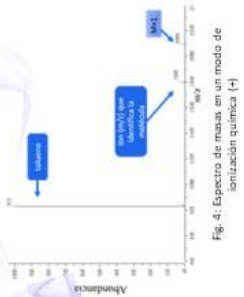


Fig. 4: Espectro de masas en un modo de ionización química (*)

Una alternativa muy promisoría es CG-MS/MS, se desarrolló un método con quinonas derivatizadas (fig. 2), el cual sensible y selectivo, e incluso la sensibilidad fue mayor que el análisis directo con el mismo método de GC-MS/MS, en la figura 5 se muestra el espectro de masas de los iones producto que identifican inequívocamente la molécula [M-88]⁺ + (M-CH₃)⁺ (4.5). En cromatografía de líquidos se ha analizado la 9,10-FQ mediante derivatizaciones, los métodos que se han implementado son pre-columna (Kishikawa, 2004) y post-columna (Kishikawa, 2010), en ambos se ha logrado determinar la molécula, sin embargo, son poco eficientes, su selectividad muy baja y tienen poca resolución.

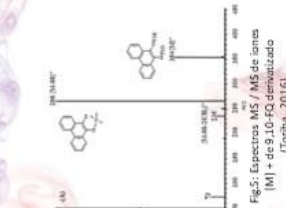


Fig. 5: Espectros MS/MS de iones [M]-88.10-FQ derivatizado (Toribas, 2016)

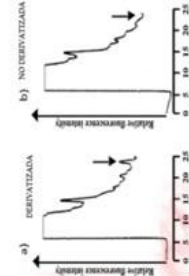


Fig. 6: A) Cromatogramas para FQ en el extracto de partículas en el aire; (B) cromatograma de partículas en el aire enriquecidas con FQ estándar.

CONCLUSIONES

Los métodos implementados para el análisis de la quinona han sido satisfactorios, sin embargo, aun se requiere un método estándar para lograr regularla, en base a los experimentos y a la revisión bibliográfica una buena opción para analizar la quinona sería un análisis por ionización química, sin derivatización ya que es una técnica suave que permitiría su determinación identificando su ion molecular, sin embargo debido a su baja reproducibilidad podría presentar variaciones el método que se desarrollará. Por otro lado el análisis por CG-MS/MS derivatizado sería una alternativa para el desarrollo de un método estándar (Toribas, 2016)

REFERENCIAS

AGRADECIMIENTO

Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Centro de Investigaciones Químicas, Lab313, LANEM





**El Centro de Investigaciones Químicas
a través de la
Universidad Autónoma del Estado de Morelos**

Otorga el **Premio al Mejor Cartel** en el área de *Química y Física del Ambiente*

a:

Salgado Torres Atzimba Mabel

Con el trabajo titulado:

"Evaluación de Técnicas cromatográficas acopladas a masas para la determinación de 9,10 Fenantrenoquinona"

Reconociendo su excelente participación en la Sesión de Carteles llevada a cabo el marco del 25 Aniversario del Centro de Investigaciones Químicas, celebrada de manera virtual el 3 de mayo del 2021.

A t e n t a m e n t e

Por una Humanidad Culta
Una Universidad de Excelencia

Dr. Víctor Barba López
Encargado de la Dirección CIQ-UAEM



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

a través del

CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS



otorga la presente



Constancia

a:

**Atzimba Mabel Salgado Torres y Mario Alfonso Murillo
Tovar**

Por su participación en el Cartel Virtual titulado:

**“Evaluación de técnicas cromatográficas acopladas a masas para la
determinación de 9,10 Fenantrenoquinona”**

En el marco de la celebración del 25 Aniversario del CIQ llevado a cabo en la modalidad virtual
el 3 de mayo del 2021

**Por una humanidad culta
una Universidad de excelencia**

Dr. Víctor Barba López

Encargado de Despacho la Dirección del CIQ

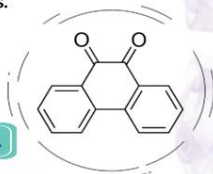
EVALUACIÓN DE TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS ACOPLADAS A MASAS PARA LA DETERMINACIÓN DE 9,10 FENANTRENOQUINONA

Atzimba Mabel Salgado Torres, Mario Alfonso Murillo Tovar
 Centro de Investigaciones Químicas-IICBA Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad no. 1001 Chamilpa, Cuernavaca Morelos CP.62210
 correo: mabelsalgado@gmail.com; mario.murillo@uamem.mx



INTRODUCCIÓN

La 9,10 fenantrenoquinona es un compuesto de interés toxicológico ya que es dañino para el medio ambiente y la salud humana, se ha reportado que su inhalación puede causar diversas enfermedades como inflamaciones en las vías respiratorias, alergias, asma y puede llegar hasta causar cáncer a largo plazo. La determinación de esta molécula en compartimientos ambientales representa un desafío analítico debido a que se encuentra en concentraciones traza dentro de una mezcla compleja, en este trabajo se realizó una investigación experimental y bibliográfica sobre la factibilidad del uso de métodos cromatográficos para su identificación y cuantificación en muestras ambientales.



METODOLOGÍA

Diseño y estrategia de búsqueda

Criterio de inclusión y exclusión



PREPARACIÓN SOLUCIÓN STOCK

SECCIÓN BIBLIOGRÁFICA

Se localizaron 11 artículos que son relevantes para el objetivo de esta investigación.

La información se estructura en 4 apartados principales: análisis térmico, derivatización, análisis por CG y análisis por CL.

SECCIÓN EXPERIMENTAL

DISOLUCIONES

ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

hasta llegar a una concentración traza

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de esta molécula por CG se dificulta principalmente por su inestabilidad térmica, Cho fue el primer informe que ha logrado cuantificarla mediante su derivatización con zinc (fig.1), el cual ha sido la más eficiente y la más usada, sin embargo, al implementar una derivación de moléculas en niveles ambientales traza se corre mucho riesgo (Souza, 2015), por esta razón se realizó una comparación de moléculas en su forma derivatizada acetilada, y no derivatizadas (figura 3) en donde se puede observar que la molécula no derivatizada se observa en un menor tiempo de retención y mayor abundancia, lo que significa que es más recomendable realizar inyecciones directas, sin embargo la fuente de ionización de impacto electrónico no puede ser la más adecuada por las propiedades de la molécula.

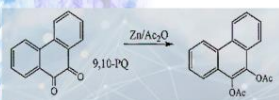


Fig. 1: 9,10-fenantrenoquinona y su derivado diacetilo (Cho,2014)

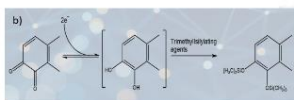


Fig. 2: Reacción de derivatización reductiva one-pot con trimethylsilyl sobre HAPs (Toriba, 2016)

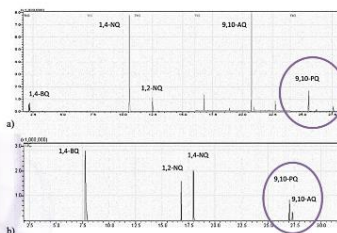


Fig. 3: Cromatograma de quinonas (a) forma no derivada y (b) forma derivatizada acetilada (Souza E. T., 2015)

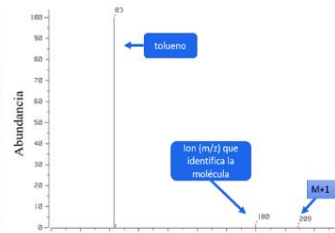


Fig. 4: Cromatograma en un modo de ionización química (+)

Se realiza un experimento en ionización química el cual muestra resultados satisfactorios, se logra observar el ion cuasi-molecular 209 m/z y el ion más estable que identifica a la molécula que nos sugiere la revisión bibliográfica 180 m/z, el ion de 83 m/z perteneciente al disolvente utilizado, lo que sugiere que puede ser una buena opción para los análisis de esta molécula.

Una alternativa muy promisoría es CG-MS/MS, se desarrollo un método con quinonas derivatizadas (fig. 2) , el cual sensible y selectivo, e incluso la sensibilidad fue mayor que el análisis directo con el mismo método de GC-MS/MS, en la figura 5 se muestra el espectro de masas los iones producto que identifican inequívocamente a la molécula [M-88] + (M- (CH3) 4-Si) .

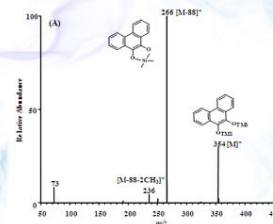


Fig. 5: Espectros MS / MS de iones [M]+ de 9,10-FQ derivatizado (Toriba, 2016)

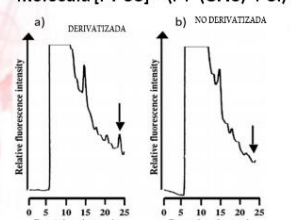


Fig. 6: A) Cromatogramas para FQ en el extracto de partículas en el aire; (B) cromatograma de partículas en el aire enriquecidas con FQ estándar.

En cromatografía de líquidos se ha analizado la 9,10 FQ mediante derivatizaciones, los métodos que se han implementado son pre-columna (Kishikawa, 2004) y post-columna (Kishikawa, 2010), en ambos se ha logrado determinar la molécula, sin embargo, son poco eficientes, su selectividad muy baja y tienen poca resolución.

CONCLUSIONES

Los métodos implementados para el análisis de la quinona, han sido satisfactorios, sin embargo, aún se requiere un método estándar para lograr regularla, en base a los experimentos y a la revisión bibliográfica una buena opción para analizar la 9,10 fenantrenoquinona sería un análisis por ionización química, sin derivatización ya que es una técnica suave que nos permitiría su determinación identificando su ion molecular, sin embargo, debido a su baja reproducibilidad podría presentar variaciones el método que se desarrollaría., por otro lado el análisis por CG-MS/MS con quinonas derivatizadas puede llegar a ser una buena opción para el desarrollo de un método estándar (Toriba 2016), ya que como se puede observar el ruido que se produce es generalmente menor y el análisis que se obtiene es más selectivo.

AGRADECIMIENTOS

Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Centro de Investigaciones Químicas, Lab313, LANEM

REFERENCIAS

- 1- Akashi, Miki, Hi M, Kawai M, Toyama T, Kumagai Y, Chusaszaro T, Tang N, Kameda T, Hayakawa K, Toriba A. *Chemical Research in Toxicology*, diciembre de 2014; 76: 85
- 2- Cho, A, Huh, K, Emma D, Stefano, Ying You, Chever E, Rodriguez, Debra A, Schmitz, Yoshito, Kumagai, Antonio H, Miguel, Arantza, Eguen-Fernandez, Takahiro Kabayashi, Ed Avall & John R. *Aerosol Science y Technology*, agosto de 2014; 47: 41.
- 3- Naoaya K., Naotaka Kuroda. *Revista de análisis (farmacológico y biomédico)*, 2013.
- 4- Naoaya K., Masao N., Yoshitaka O., Kenichiro N. *Chromatographia*, 2006; 63: 438
- 5- Naoaya K., Hajime N., Kaname O., Kenichiro N., Naotaka K., Takanai, 2010; 1852-1855.
- 6- Kishikawa, Naoya. *Journal of Chromatography*, 20 2004; 83-88.
- 7- Sousa, Eliete, Teixeira. *Microchemical Journal*, enero de 2015; 26-31.
- 8- Souza, F.F, Wilson A.L, Jailson B. de Andrade. *Journal of Chromatography A*, mayo de 2016.
- 9- Toriba, Akira. *Revista de Cromatografía A*, agosto de 2016; 89-100.1

#QFA26



September 24, 2021

This is to certify that

Atzimba Mabel Salgado Torres and Mario Alfonso Murillo Tovar

participated in the #LatinXChem Twitter Conference 2021 on Sept. 20, 2021 with the poster #Ana75 entitled:

Evaluación de técnicas cromatográficas acopladas a masas para la determinación de 9,10 Fenantrenoquinona



Gabriel Merino
on behalf of the
#LatinXChem Organizing Committee



Julio Aguilar
#LXChemAna organizer



Laura Hinojosa
#LXChemAna organizer

ANEXO F: Cronograma de actividades

ACTIVIDAD	2019								2020								2021				
	Elección de tema		Estancia de laboratorio 1				Estancia de laboratorio 2				Seminario de titulación										
	M	J	J	A	S	O	N	D	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	
	A	U	U	G	E	C	O	I	N	E	A	B	A	U	U	G	E	C	O	I	
	Y	N	L	O	P	T	V	C	E	B	R	R	Y	N	L	O	P	T	V	C	
Elección del tema de tesis																					
Entrega de formato para la validación de tema de estancia																					
Elaboración del protocolo																					
Entrega del protocolo																					
Revisión bibliográfica																					
Cálculos experimentales																					
Pruebas de análisis preliminares																					
Análisis a diferentes temperaturas																					
Análisis de datos																					
Tutoriales																					
Optimización de la temperatura de inyección																					
Adecuación a tesis bibliográfica																					
Escritura tesis (incluyendo los protocolos)																					
Discusión de resultados bibliográficos																					
Seminario de titulación																					
Entrega manuscrito																					
Titulación																					