

2005A – 2010B

301456334

**Universidad de Guadalajara**

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

División de Ciencias Biológicas y Ambientales



**“Optimización de una Metodología para Derivatizar Disruptores Endócrinos ( $17\beta$ -Estradiol y  $17\alpha$ -Etinilestradiol) y su Análisis por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (CG-EM)”**

**Tesis**

Que para Obtener el Título de

**Licenciado en Biología**

**Presenta**

Perla Berenice Sánchez Torres

Las Agujas, Zapopan, Jalisco, Diciembre 2013

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ) dentro de la Unidad de Tecnología Ambiental, bajo la dirección del Dr. Mario Alfonso Murillo Tovar y se contó con la asesoría de la Mtra. Aurora Rosas Ramírez y el Mtro. Leonel Hernández Mena. Este trabajo se derivó del proyecto de Investigación Científica Fondo Sectorial de Investigación para la educación con nombre “Proceso de Oxidación Avanzada basado en Ozono para degradar compuestos Disruptores Endócrinos emergentes presentes en el Agua” (Convenio No. 84425).





**Universidad de Guadalajara**  
**Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias**

*Coordinación de Carrera de la Licenciatura en Biología*

**C. PERLA BERENICE SÁNCHEZ TORRES  
PRESENTE**

Manifiestamos a usted, que con esta fecha, ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de **TESIS E INFORMES** opción **TESIS** con el título: **“Optimización de una Metodología para Derivatizar Disruptores Endócrinos (17β-Estradiol y 17α-Etinilestradiol) y su Análisis por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de masas (CG-EM)”**, para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos, que ha sido aceptado como director de dicho trabajo el **Dr. Mario Alfonso Murillo Tovar** y como asesores a la **M. C. Aurora Rosas Ramírez** y al **M.C. Leonel Hernández Mena**.

Sin más por el momento, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"PIENSA Y TRABAJA"**

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., 11 de junio de 2013

  
**DRA. GEORGINA ADRIANA QUIROZ ROCHA**  
**PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

**COMITE DE  
TITULACION**



  
**M.C. VERÓNICA PALOMERA ÁVALOS**  
**SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

Dra. Georgina Adriana Quiroz Rocha.  
 Presidente del Comité de Titulación.  
 Licenciatura en Biología.  
 CUCBA.  
 Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad Tesis e Informes, opción Tesis con el título: **“Optimización de una Metodología para Derivatizar Disruptores Endócrinos (17β-Estradiol y 17α-Etinilestradiol) y su Análisis por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (CG-EM)”** que realizó el/la pasante **Perla Berenice Sánchez Torres** con número de código **301456334** consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

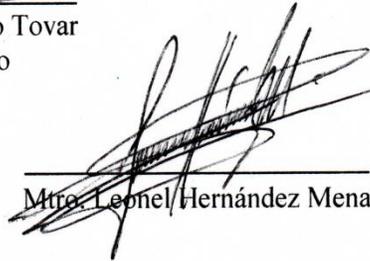
Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente  
 Las Agujas, Zapopan, Jal. 20 de noviembre 2013

  
 Dr. Mario Alfonso Murillo Tovar  
 Director/a del trabajo

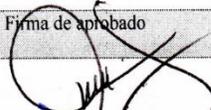
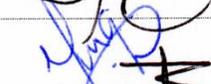
  
 Mtra. Aurora Rosas Ramírez

Asesor(es)

  
 Mtra. Leonel Hernández Mena



COORDINACIÓN DE LA CARRERA  
 LICENCIADO EN BIOLOGÍA

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Mtra. Rosa María Domínguez Arias		20 nov/2013
Dra. Martha Georgina Orozco Medina		20 Nov. 2013
Dr. Javier García Velasco		21/NOV/2013
Supl. Mtra. Aurora Rosas Ramírez		21/nov/2013

  
 22/Nov/13  
 COMITÉ DE  
 TITULACIÓN  
  
 LICENCIATURA  
 EN BIOLOGÍA

## ***Dedicatoria***

*Esta tesis se la dedico a toda mi familia por su paciencia y apoyo incondicional, en especial a mis padres Abel y Sofía por estar siempre presentes en las partes importantes de mi vida y por darme su cariño y consejos para hacer de mi una mejor persona. A mis hermanas que siempre me han apoyado.*

## ***Agradecimientos***

*Me gustaría expresar mi sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo, comenzando con el Dr. Alberto López López director de la Unidad de Tecnología Ambiental por permitirme realizar este trabajo en las instalaciones de dicha área, un especial agradecimiento al Dr. Mario Alfonso Murillo Tovar, director de esta tesis, por aportarme su conocimiento, orientación, y supervisión continúa de la misma, pero sobre todo por la paciencia. Del mismo le agradezco al asesor el Mtro. Leonel Hernández Mena por brindarme sus consejos, sugerencias y correcciones en mejora del trabajo y también a la asesora la Mtra. Aurora Rosas por sus recomendaciones y por darme siempre ánimos.*

*También extiendo mi agradecimiento a los compañeros de la Unidad Ambiental en especial al Dr. Ramiro Vallejo Rodríguez y a la Ing. Quím. Luz Edith Cruz Rodríguez por su colaboración en la realización de la parte experimental y sobre todo por brindarme su amistad.*

*Asimismo agradezco a los sinodales, la Dr. Martha Georgina Orozco Medina y el Dr. Javier García Velasco por sus sugerencias y atinadas correcciones, y un agradecimiento muy especial para la Mtra. Rosa María Domínguez Arías por su interés mostrado al trabajo y por brindarme siempre su tiempo, consejo y sugerencias que mejoraron el trabajo.*

*Nuestra lealtad es para las especies y el planeta. Nuestra obligación  
de sobrevivir no es sólo para nosotros mismos sino también  
para ese cosmos, antiguo y vasto, del cual derivamos.*

*Carl Sagan*

## Índice

1.INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Justificación.....	4
1.3. Hipótesis.....	5
1.4. Objetivos.....	6
1.4.1. General.....	6
1.4.2. Específicos.....	6
2.MARCO TEÓRICO.....	7
2.1. Situación de la contaminación del Agua en México.....	7
2.1.1. Normatividad para la Potabilización del Agua.....	8
2.1.2. Calidad del Agua Potable.....	8
2.1.3. Calidad del Agua purificada envasada.....	9
2.1.4. Tipos de contaminantes en el agua.....	11
2.2. Compuestos Disruptores Endócrinos.....	11
2.2.1. Mecanismo de acción de los disruptores endócrinos.....	12
2.3. Hormonas esteroideas.....	13
2.3.1. Origen y fuentes de $17\beta$ -Estradiol y $17\alpha$ -Ethinilestradiol.....	14
2.3.2. Efectos toxicológicos en fauna y posibles riesgos en humanos.....	15
2.3.3. Propiedades fisicoquímicas.....	16
2.4. Características de los métodos de análisis.....	17

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	20
3.1. Reactivos y materiales.....	20
3.2. Preparación de disoluciones.....	21
3.3. Procedimiento de extracción con fase sólida.....	21
3.4. Reducción del extracto orgánico y concentración de esteroides.....	22
3.5. Secado del extracto orgánico.....	22
3.6. Derivatización de esteroides.....	22
3.7. Análisis cromatográfico.....	23
3.8. Aplicación del método a muestras de agua comercial (embotellada) y potable.....	23
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
4.1. Separación e identificación de compuestos por CG-EM.....	24
4.2. Optimización de las condiciones de derivatización.....	25
4.2.1. Efecto del disolvente.....	28
4.2.2. Eficiencia del secado con nitrógeno.....	29
4.3. Optimización de las condiciones de extracción y reducción del extracto.....	30
4.3.1. Ajuste del volumen de elución.....	30
4.3.2. Evaluación de las condiciones de reducción en evaporador rotatorio.....	31
4.4. Evaluación del método analítico.....	32
4.4.1. Eficiencia de la extracción y la derivatización.....	32
4.4.2. Precisión de la respuesta analítica.....	33
4.4.3. Linealidad.....	35

4.4.4. Selección del tipo de regresión.....	37
4.4.5. Límites de detección y cuantificación.....	39
4.5. Determinación de esteroides en muestras de agua.....	40
5. CONCLUSIONES.....	43
6. RECOMENDACIONES.....	45
7. BIBLIOGRAFÍA.....	46
8. ANEXOS.....	53

## Índice de Tablas

Tabla 1. Algunas especificaciones sanitarias para el agua potable y agua envasada.....	10
Tabla 2. Comparación de parámetros de tres disolventes por secado con nitrógeno (n=4).....	30
Tabla 3. Valores de recobro obtenidos a distintas condiciones con extractos en cloruro de metileno (n=3).....	32
Tabla 4. Recobros promedio del subrogado en cada nivel de ensayo en la curva del método analítico(n=2).....	33
Tabla 5. Repetibilidad y Reproducibilidad para E2 en el método analítico (n=4).....	34
Tabla 6. Repetibilidad y Reproducibilidad para EE2 en el método analítico (n=4).....	34
Tabla 7. Parámetros analíticos de la curva de calibración del método.....	37
Tabla 8. Evaluación de la homocedasticidad de las varianzas para E2 (n=4).....	38
Tabla 9. Evaluación de la homocedasticidad de las varianzas para EE2 (n=4).....	38
Tabla 10. Pendiente y ordenada al origen ponderados de las curvas de calibración del método. .....	39
Tabla 11. Límites de detección y cuantificación del método ( $\text{ng L}^{-1}$ ).....	39
Tabla 12. Concentraciones de esteroides ( $\text{ng L}^{-1}$ ) en muestras de agua.....	41
Tabla 13. Concentración de las soluciones madre y soluciones de trabajo.....	53
Tabla 14. Puntos de dilución de la curva de calibración del método.....	54
Tabla 15. Evaluación de la linealidad de la curva de calibrado.....	56

## Índice de Figuras

Figura 1. Estructura química de (E2) 17 $\beta$ -Estradiol y (EE2) 17 $\alpha$ -Etinilestradiol.....	17
Figura 2. Diagrama del procedimiento general del método analítico.....	20
Figura 3. Orden de elución del compuesto subrogado DDE y los esteroides derivatizados Di-TMS-E2: 17 $\beta$ -Estradiol y Di-TMS-EE2: 17 $\alpha$ -Etinilestradiol.....	24
Figura 4. Espectro de masas de Di-TMS-E2: 17 $\beta$ -Estradiol.....	25
Figura 5. Espectro de masas de Di-TMS-EE2: 17 $\alpha$ -Etinilestradiol.....	25
Figura 6. Reacción de la derivatización de 17 $\beta$ -Estradiol (E2).....	26
Figura 7. Reacción de la derivatización de 17 $\alpha$ -Etinilestradiol (EE2).....	26
Figura 8. Cromatograma que muestra el subproducto distinto al Di-TMS-EE2, correspondiente a Mono-TMS-E1 Estrona (a) y espectro de masas con estructura derivatizada (b).....	28
Figura 9. Cromatograma que muestra la desaparición de Mono-TMS-E1 utilizando piridina.....	29
Figura 10. Distribución de la masa del compuesto subrogado (DDE) en las fracciones durante el proceso de elución.....	31
Figura 11. Curva de calibración del método analítico para los esteroides E2 (a) y EE2 (b).....	36

## Resumen

Los Disruptores endocrinos (DEs) son compuestos que tienen la característica de provocar un desequilibrio hormonal de animales y humanos. Existen numerosas moléculas identificadas como DEs, éstas pueden ser de origen antropogénico o biológico y tienen una amplia distribución en el ambiente, en especial, se ha documentado la presencia en aguas residuales, superficiales, subterráneas y agua potable. Generalmente una de las dificultades en las técnicas analíticas para la determinación de DEs en muestras de agua, radica en el hecho de que éstas moléculas, se encuentran en concentraciones en el orden de nanogramos por litro (ppt), asimismo las matrices acuosas contienen interferencias de otros compuestos orgánicos. Además es preocupante la presencia de estos compuestos en los cuerpos de agua, debido a que aún a bajas concentraciones, pueden llegar a inducir daños en el sistema hormonal de los organismos.

Debido a ello surgió el interés de adecuar un método analítico sensible y robusto para determinar estos compuestos en agua. En éste trabajo se desarrolló una metodología para determinar por medio de Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (CG-EM) a dos disruptores endocrinos, la  $17\beta$ -Estradiol (E2) una hormona natural y la  $17\alpha$ -Ethinilestradiol (EE2) hormona sintética, en muestras de agua embotellada y agua potable. El proceso implicó la optimización de las condiciones de extracción por fase sólida y derivatización para su identificación y determinación. La técnica de extracción en fase sólida facilitó la concentración de los esteroides en un volumen menor al de la muestra inicial, lo cual favoreció la detección por el sistema cromatográfico. En cuanto a la derivatización, aportó estabilidad térmica a los esteroides en el análisis por CG-EM. El método en su conjunto mostró resultados satisfactorios al obtener un promedio de recobro del 87 %, con límites de detección de 1.0 y 3.0 ng L<sup>-1</sup> y de cuantificación de 3.0 y 10 ng L<sup>-1</sup> para E2 y EE2, respectivamente.

De esta manera la metodología permitió la determinación confiable de E2 y EE2 en muestras de agua embotellada. A pesar de haberse detectado los esteroides en muestras de agua potable no se logró su cuantificación debido a que las concentraciones fueron inferiores al límite de detección del método. La presencia de éstos compuestos en las muestras estudiadas, podría representar un riesgo a la salud pública, al tener evidencia que en especies menores como peces, concentraciones de 1 nanogramo / L inducen cambios reproductivos; este riesgo podría verse elevado ya que el consumo de agua embotellada es cada vez más frecuente.

## **1. Introducción**

### **1.1. Antecedentes**

Los compuestos emergentes (CE) son sustancias químicas que recientemente han surgido como potenciales responsables de riesgos que pueden afectar los procesos metabólicos de los ciclos de vida de organismos, incluyendo a los humanos, y de los cuales, se requiere todavía normatividad que regule su presencia (Becerril, 2009, Gil *et al.* 2012).

Entre los CE, los esteroides son de particular interés científico debido a que son clasificados como disruptores endócrinos porque se ha señalado que tienen un impacto negativo en el equilibrio hormonal de animales y humanos (Kandarakis *et al.* 2009) y pueden causar problemas de diferenciación sexual en diversas especies acuáticas y aún más porque los efectos pueden ocurrir a muy bajas concentraciones (Velicu y Suri 2009, Zhou *et al.* 2009, Shin *et al.* 2011).

La presencia de los esteroides en cuerpos de agua es actualmente uno de los temas con mayor atención de la comunidad académica, especialistas en salud pública, ingenieros ambientales y científicos de distintas áreas, particularmente por los riesgos que puede tener para la salud y por los retos que representa eliminarlos de aguas tratadas (Bila y Dezotti 2007).

A pesar de qué en la mayoría de los países existen plantas para el tratamiento de aguas residuales, estas se limitan a medir los parámetros normados por cada país (OMS, 2004) o bien por la escasa disponibilidad de recursos económicos y técnicos, se restringe el desarrollo y puesta en marcha de tecnologías que eliminen eficientemente los compuestos orgánicos peligrosos para el ambiente y la salud (Castanheira, 2010, Mnif *et al.* 2010). Estos compuestos llegan a los cuerpos de agua principalmente a través de aguas residuales municipales o de actividades agrícolas y pecuarias (Velicu y Suri 2009, Vallejo y López 2012), las cuales son vertidas directamente o son tratadas inadecuadamente (Gil *et al.* 2012).

De esta modo, su origen puede ser antropogénico o biológico, dentro de los primeros se encuentran compuestos sintetizados en la industria como los anticonceptivos, tratamientos de sustitución hormonal, algunos aditivos de los alimentos para animales, etc., y en los segundos, hormonas naturales; como la progesterona, testosterona y estrógenos que forman parte del sistema endócrino de los seres humanos y animales, que se liberan sin intención en el ambiente (Chimchirian *et al.* 2006, Kandarakis *et al.* 2009) pero que se han incrementado junto con el crecimiento de los asentamientos humanos y la crianza masiva de animales para producir carne, leche y otros productos derivados.

Entre los más frecuentemente identificados, debido a su persistencia en el ambiente, comercialización y uso, se encuentran el estrógeno 17 $\alpha$ -Ethinilestradiol (EE2) que es una hormona sintetizada a partir del colesterol y es el ingrediente activo de las píldoras anticonceptivas, y el 17 $\beta$ -Estradiol (E2) que es una hormona natural (Desbrow *et al.* 1998).

Estos compuestos se han reportado en muestras de agua mediante diversos métodos. Algunos pueden basarse en bioensayos utilizando: desde levaduras, invertebrados u otro tipo de organismo midiendo su nivel de estrogenicidad al ser expuestos a muestras de agua (Desbrow *et al.* 1998, Stevenson *et al.* 2010). El método convencional, para determinar esteroides en muestras de agua por lo regular involucra filtración seguido de una extracción en fase sólida (EFS) que retiene los componentes orgánicos y los extrae de la matriz acuosa, con columnas de fase inversa de C<sub>18</sub> que pueden ser eluidos con una amplia gama de disolventes orgánicos de acuerdo a su polaridad (Wolthers y Kraan 1999, Liu *et al.* 2009). El extracto orgánico es evaporado para cambiar el tipo de disolvente o bien para concentrar los analitos y correr el análisis químico a través de cromatografía de líquidos (CL) o de gases (CG) (García, 2008). En CL, los extractos son analizados directamente, mientras que en CG se requiere la conversión química o derivatización de los esteroides para mejorar la estabilidad térmica (Knapp, 1979).

La derivatización empleada en los esteroides principalmente se utiliza para transformarlos en compuestos volátiles y que sean térmicamente estables (Bowden *et al.* 2009), en el caso de los esteroides el grupo polar hidroxilo es el responsable de su dificultad para analizarlos por CG (Zhou *et al.* 2007, Huang *et al.* 2010), por lo que se utiliza el método de silanización, en el cual los grupos hidroxilos son transformados en

grupos trimetilsilanoles (TMS) (Shareef *et al.* 2006, Bowden *et al.* 2009) por medio de reactivos derivatizantes o mezclas de ellos (Knapp, 1979, Ding y Chiang. 2003).

## 1.2. Justificación

Existen numerosos métodos de análisis desarrollados para la identificación y determinación de los esteroides, los cuales se enfrentan a dos principales dificultades, como es la diversidad y naturaleza química de las mezclas que constituyen las matrices ambientales las cuales pueden provocar interferencias que sesguen las determinaciones y las bajas concentraciones en que se encuentran (Vallejo *et al.* 2012).

Por ello es necesario implementar métodos analíticos con características que disminuyan la incertidumbre en las determinaciones de estos compuestos. La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) es una alternativa para la determinación de los esteroides. Esta técnica brinda mayor información estructural y capacidad de separación entre los componentes de una mezcla que la cromatografía de líquidos con detectores UV/visible, disminuyendo la probabilidad de sesgos en la identificación y cuantificación. Sin embargo, se necesita extraer y concentrar los esteroides en un disolvente orgánico para alcanzar los límites de detección y posteriormente modificar su estructura para evitar que se degraden térmicamente en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases. Aunque este procedimiento represente un costo mayor en tiempo y dinero, los beneficios obtenidos se ven reflejados en determinaciones con concentraciones menores que con la cromatografía de líquidos.

De esta forma, la metodología desarrollada en este trabajo pretende contar con una guía de análisis para la determinación confiable de esteroides en agua potable y embotellada que pueda ser implementada por laboratorios oficiales con el propósito de realizar seguimiento a la presencia de estos componentes y brindar las bases para futuras reglamentaciones que los regulen debido a los riesgos que representan para la salud y medio ambiente. Sobre todo porque actualmente la información es limitada sobre la presencia de estos compuestos en el agua potable de los sistemas de abastecimiento local y en el agua comercial de las ciudades mexicanas.

### 1.3. Hipótesis

La técnica de derivatización basada en la modificación de los grupos hidroxilo mediante el mecanismo de silanización química podría facilitar la determinación confiable de los esteroides seleccionados ( $17\beta$ -Estradiol y  $17\alpha$ -Ethinilestradiol) en concentraciones ambientales traza ( $\text{ng L}^{-1}$ ) en muestras de agua por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).

## **1.4. Objetivos**

### **1.4.1. General**

Desarrollar una metodología analítica confiable y robusta para derivatizar y favorecer el análisis químico de disruptores endócrinos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) en muestras de agua.

### **1.4.2. Específicos**

- Optimizar la derivatización de los esteroides  $17\beta$ -Estradiol y  $17\alpha$ -Etinilestradiol para su análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).

- Determinar las condiciones del tratamiento de muestra de los esteroides  $17\beta$ -Estradiol y  $17\alpha$ -Etinilestradiol para su análisis en CG-EM.

- Evaluar la eficiencia de la recuperación de los esteroides por el procedimiento de derivatización y tratamiento de la muestra a distintos niveles de concentración, similares a las reportadas en muestras ambientales.

- Aplicar la metodología analítica optimizada para la determinación de los esteroides en muestras de agua comercial (embotellada) y agua potable del sistema de abastecimiento local.

## **2. Marco Teórico**

### **2.1. Situación de la contaminación del Agua en México**

El agua es un recurso fundamental para la sobrevivencia de cualquier ser vivo, el hombre a lo largo de la historia ha utilizado este líquido para diferentes necesidades ya sea para subsistir o para producir e intercambiar bienes y servicios, partiendo de esta condición la demanda de este líquido ha ido en aumento generando una sobreexplotación y contaminación de ríos, arroyos, lagos y acuíferos.

A finales del 2001 más del 70 % de los cuerpos de agua del país presentaban contaminación y sobreexplotación, de acuerdo con la Comisión Nacional del Agua (CONAGUA) éstos se concentran en zonas con mayor población, algunas de ellas son: la Península de Baja California, Balsas, Valle de México y Lerma-Santiago-Pacífico siendo esta última la que le compete al estado de Jalisco. La CONAGUA cuenta con la Red Nacional de Monitoreo (RNM), la cual analiza la calidad de los cuerpos de agua y de acuerdo a los datos obtenidos indican que las principales corrientes de Jalisco y del Lago de Chapala, muestran problemas importantes de contaminación, siendo una fuente de riesgos para la salud (CONAGUA, 2011).

El agua limpia y su saneamiento se encuentran como factores importantes para el bienestar, la salud y desarrollo humano, por ello la ONU declaró en el 2002 como derecho fundamental el acceso al agua de manera segura y confiable, libre de patógenos, contaminantes orgánicos e inorgánicos. Sin embargo la atención y los esfuerzos suelen estar dirigidos al abasto hídrico, dejando en segundo término los aspectos sanitarios para el uso y consumo del agua, asimismo en escasas ocasiones y sobre todo en países en vías de desarrollo no se tiene acceso al recurso económico y técnico para el diseño y construcción de sistemas de tratamiento (Haro *et al.* 2012). En el caso de México se carece de tratamiento en 64.5 % de aguas municipales y 82.3 % de aguas residuales, para el caso de Jalisco sólo el 31.4 % de aguas residuales tiene tratamiento (CONAGUA, 2011). Lo que representa una problemática para la salud pública, por esta razón la gestión de los recursos hídricos debe estar encaminado hacia la implementación de reglamentaciones y normas a fin de garantizar la seguridad del agua (OMS, 2004).

### **2.1.1. Normatividad para la Potabilización del Agua**

El marco legal federal en materia de agua está integrado por los artículos 27 y 115 de la Constitución Mexicana de las cuales se conforman las leyes que determinan la normativa respecto a la calidad del agua; la primera de ellas es la Ley de Aguas Nacionales que establece los lineamientos para el aprovechamiento sustentable de dicho recurso (DOF, 1992), la segunda es la Ley Federal de Derechos e implica la reglamentación en el pago de derechos a los servicios relacionados con el agua (DOF, 1981), la tercera es la Ley General de Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente y trata acerca de la prevención control de la contaminación de ecosistemas acuáticos (DOF, 1988), y por último la Ley General de Salud que determina los valores permisibles y ciertos requisitos sanitarios para la protección de la salud (DOF, 1984).

Otros elementos jurídicos de regulación de la calidad son algunas normas oficiales mexicanas (NOM) que definen los límites permisibles de los contaminantes así como la implementación de análisis y tratamientos de los diferentes tipos de agua, tales como aguas residuales municipales e industriales, aguas subterráneas, agua para uso y consumo humano, entre otras (DOF, 1992, Carabias *et al.* 2005).

### **2.1.2. Calidad del Agua Potable**

El Agua para uso y consumo humano es aquella que no contiene contaminantes objetables, ya sean químicos o agentes infecciosos y que no causa efectos nocivos al ser humano, denominada también como agua potable (OMS, 2004). El agua que se capta en embalses, pozos, lagos, etc., es llevada a través de los sistemas de abastecimiento locales donde es sometida a tratamiento de acuerdo con los criterios de evaluación de los parámetros establecidos en las NOM-127 y NOM-179. La calidad del agua es un factor determinante de la salud pública y de los ecosistemas, asociada a enfermedades agudas y crónicas en distintos lugares del mundo, ya sea por ingestión directa o mediante la contaminación de alimentos (OMS, 2004, Carabias *et al.* 2005). En el 2003 un estudio realizado por el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) colocó a México en la posición 106 de un total de 122 países con respecto a la calidad del vital líquido, siendo la peor de Latinoamérica (Carabias *et al.* 2005). A pesar que la SEMARNAT indique que el 85% del agua potable es

apta para consumo humano (CONAGUA, 20 11), la percepción de la ciudadanía no está del todo de acuerdo, optando a consumir agua de otras fuentes.

### **2.1.3. Calidad del Agua purificada envasada**

Actualmente en el mundo es cada vez más común la elaboración, comercialización y consumo de agua envasada, principalmente a causa de la desconfianza en la calidad del vital líquido de los sistemas de abastecimiento local o coloquialmente conocido como “agua de la llave”. En el caso de México el consumo de agua envasada ha ido en aumento teniendo un consumo del 70 % para agua de garrafón y 30 % de agua embotellada (Haro *et al.* 2012).

La comercialización de estas presentaciones de agua está a cargo en un 50 % por los principales consorcios, mientras que el otro 50 % es comercializado por empresas pequeñas y por establecimientos llamados “llenaderos”, siendo estos últimos los que cuentan con escasos o nulos procesos de purificación. Las especificaciones sanitarias que deben seguir las plantas purificadoras en la producción de agua envasada, tales como tener registros de las pruebas efectuadas a la materia prima (agua), producto en proceso, producto terminado, lavado de envases, mantenimiento sanitario del equipo, líneas de producción, accesorios y número de lote asignado al producto, deben conservarse por un año a disposición de la autoridad sanitaria (Haro *et al.* 2012). Sin embargo las empresas o los establecimientos dedicados a este comercio en debidas ocasiones no cumplen con las reglas sanitarias, esto se demuestra en estudios realizados a diferentes marcas de agua embotellada, señalando que aún las marcas más comerciales presentaron parámetros por arriba de las especificaciones sanitarias establecidos en las normas oficiales NOM-127 y NOM-041 ver (**Tabla 1**) (PROFECO, 1995).

**Tabla 1.** Algunas especificaciones sanitarias para el agua potable y agua envasada.

Parámetro	Agua potable	Agua envasada	Límite máximo	
Sabor	Agradable	Insípido		
Olor	Agradable	Inodoro		
Color	20 UCV	15 UCV		
Turbiedad	5 UTN	5UTN		
Sólidos disueltos totales	1,000 ppm	500 ppm		
pH	6.5-8.5	6.5-8.5		
Arsénico (mg/L)	0.01	0.05		
Cloruros (mg/L)	250	250		
Nitritos (mg/L)	0.05	0.05		
Mesofílicos aerobios (UFC/mL)	-	100		
Coliformes totales (UFC/ 100 mL)	-	Cero		
Vibrio cholerae	-	Negativo		
Aldrín y Dieldrín (µg/L)	0.03	0.03		
DDT (µg/L)	1.00	1.00		
Hexaclorobenceno (µg/L)	1.00	0.01		

Fuente: Elaboración propia de acuerdo con las normas NOM-127-SSA1-1994 (Salud ambiental, agua para uso y consumo humano - límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización) y NOM-041-SSA1-1993 (Bienes y servicios. Agua purificada envasada especificaciones sanitarias). UFC: unidades formadoras de colonias, UCV: unidades de color verdadero, UTN: unidades de turbidez nefelométricas, ppm: partes por millón.

Sin embargo la normatividad en cuanto al agua potable y el agua envasada es relativamente completa en ciertos rubros, con lo referente a calidad bacteriológica y fisicoquímica en compuestos inorgánicos, pero incipiente en compuestos orgánicos, debido a que la determinación de parámetros orgánicos es en general más costosa que la de los inorgánicos, aunado a esto, hay poca información existente acerca de la calidad del agua potable (Haro *et al.* 2012)

#### **2.1.4. Tipos de contaminantes en el agua**

Existe un sin número de contaminantes orgánicos que son vertidos a los cuerpos de agua procedentes de descargas municipales, agrícolas e industriales (Carabias *et al.* 2005). En las últimas décadas se ha incrementado la diversidad de compuestos orgánicos. Un ejemplo de ello es que la Unión Europea tiene un registro de más de 100,000 sustancias químicas distintas y se estima que cada año 1,000 compuestos sintéticos entran a la economía química y sólo una fracción de éstos ha sido estudiada o está regulada. Sin embargo, en los últimos años, el desarrollo de nuevos y más sensibles métodos de análisis ha permitido alertar de la presencia de otros contaminantes, potencialmente peligrosos, denominados como emergentes (Barceló y López 2008, Castanheira, 2010).

Los contaminantes emergentes, cuyo estudio se encuentra a cargo de los principales organismos dedicados a la protección de la salud pública y medioambiental, tales como la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Agencia para la Protección del Medio Ambiente de los Estados Unidos (EPA), o la Comisión Europea, los definen como contaminantes previamente desconocidos o no reconocidos, cuya presencia en el ambiente no es necesariamente nueva. La característica de estos grupos de contaminantes es que no necesitan persistir en el ambiente para causar efectos negativos, puesto que sus altas tasas de transformación/remoción se pueden compensar por su introducción continua en el ambiente (Bila y Dezotti 2007, Barceló y López 2008, Becerril, 2009). Para la mayoría de estos compuestos la incidencia, la contribución de riesgos y datos ecotoxicológicos no están disponibles por lo que su regulación se dificulta. Entre los contaminantes emergentes encontramos algunos que pueden generar alteraciones endócrinas, afectando el equilibrio hormonal, la salud de animales y de los seres humanos (Markey *et al.* 2002, Gil *et al.* 2012).

#### **2.2. Compuestos Disruptores Endócrinos**

Un compuesto de alteración endócrina o mejor conocido como disruptor endócrino (DEs) es definido por la EPA como aquellos compuestos exógenos que interaccionan y alteran la síntesis, secreción, transporte y metabolismo que hace parte de la autorregulación normal de reproducción y desarrollo de un individuo, de su descendencia o de poblaciones enteras (Bila y

Dezotti 2007, Kandarakis *et al.* 2009, Castanheira, 2010). El grupo de moléculas identificadas como disruptores endócrinos es diverso y pueden tener un origen antropogénico o biológico, dentro de los primeros se encuentran compuestos sintetizados en la industria como disolventes/lubricantes, pesticidas, herbicidas, fungicidas, agentes farmacéuticos como anticonceptivos, tratamientos de sustitución hormonal, algunos aditivos de los alimentos para animales, etc. En cuanto a los segundos son de origen natural, grupos de hormonas como la progesterona, testosterona y estrógenos que forman parte del sistema endócrino de los seres humanos y animales, que se liberan sin intención en el ambiente (Chimchirian *et al.* 2006, Bila y Dezotti 2007, Kandarakis *et al.* 2009).

Algunos compuestos que tienen capacidad de alterar el sistema hormonal son bioacumulables y resistentes y otros no necesariamente cumplen con esta característica, debido a su continua introducción es frecuente encontrarlos en una amplia variedad de ambientes (Markey *et al.* 2002, Rivas *et al.* 2004, Barceló y López 2008). En diversos países se han realizado estudios para determinar la presencia de contaminantes, incluidos los DEs, en Estados Unidos y algunos países de Europa se determinó la presencia de varios compuestos químicos en agua superficial, agua subterránea, agua potable y sedimentos. Entre los compuestos determinados se encontraron productos farmacéuticos, antibióticos, esteroides, hormonas y otros disruptores endócrinos como herbicidas y plaguicidas, los cuales diferían en cuanto a concentración y frecuencia de acuerdo a los cuerpos de agua examinados (Chimchirian *et al.* 2006).

### **2.2.1. Mecanismo de acción de los disruptores endócrinos**

El sistema endócrino ejerce un complejo control químico interno que regula las funciones vitales de cualquier organismo, como la reproducción, el desarrollo embrionario, el sistema inmunológico y hasta aspectos del comportamiento psicosocial; las sustancias encargadas de regular estas funciones se llaman hormonas. Los disruptores endócrinos interfieren en el funcionamiento del sistema suplantando a las hormonas endógenas, pudiendo bloquear su acción, aumentando o disminuyendo sus niveles, también pueden alterar el patrón de síntesis y metabolismo; o bien modular los niveles de los receptores correspondientes (Bila y Dezotti 2007, Kandarakis *et al.* 2009).

Los alteradores endocrinos tienen acción en los receptores estrogénicos (REs), receptores androgénicos (RAs), receptores de la progesterona (RPs), receptores de la tiroides (RTs), receptores retinoides (RRs), entre otros. En una situación habitual, la hormona se une al receptor celular que desencadena la reacción al nivel esperado. Mientras que en una reacción bloqueada, el disruptor, mimetiza a la hormona natural y se une al receptor para interferir en la reacción, de igual forma puede unirse al receptor y generar una reacción más potente de la normal o generar una reacción más débil (Kandarakis *et al.* 2009). La vulnerabilidad de una determinada especie depende de las propiedades intrínsecas de la sustancia química; del grado, la duración, la frecuencia y la vía de exposición, así como de la forma en que esa especie absorba, distribuya, transforme y elimine las sustancias; por otra parte, también depende de la sensibilidad de órganos concretos en diversas etapas del desarrollo (García, 2008).

### **2.3. Hormonas esteroideas**

Dentro de los DEs que pueden llegar a causar desequilibrio hormonal de los organismos, se encuentran las hormonas esteroideas, estas se clasifican en estrógenos, andrógenos, glucocorticoides y mineralocorticoides (Wolthers *et al.* 1999). En la última década la comunidad científica ha puesto mayor atención, por su potencial influencia en la salud de los humanos y en la fauna silvestre, a los estrógenos naturales y sintéticos, ya que estos compuestos, en comparación con los demás DEs, tienen una actividad estrogénica mayor aún a bajas concentraciones (Mao *et al.* 2010). Los principales estrógenos que inducen una acción son las hormonas naturales estrona (E1), estriol (E3), 17 $\beta$ -Estradiol (E2) y la hormona sintética 17 $\alpha$ -Ethinilestradiol (EE2) (Ying *et al.* 2002, Falconer, 2006). Siendo las dos últimas las de mayor actividad ya que el E2 es 12 veces más potente que la estrona y 80 veces mayor que el estriol; en cuanto al EE2 es 10 a 50 veces de actividad mayor que los estrógenos de origen natural (Oropesa, 2008).

### 2.3.1. Origen y fuentes de 17β-Estradiol y 17α-Etinilestradiol

El esteroide 17β-Estradiol es un componente endógeno del sistema endócrino de mamíferos, es secretado en el ovario, y sus niveles se elevan durante el embarazo, en promedio una mujer excreta 2.4 μg/día, es relativamente bioacumulable y persistente en el ambiente (Bila y Dezotti 2007, Velicu y Suri 2009, Mao *et al.* 2010); el esteroide sintético 17α-Etinilestradiol tiene su origen a partir del ergosterol o colesterol que es el ingrediente activo de las pastillas anticonceptivas en tratamientos de sustitución hormonal y algunos aditivos de alimentos para animales, al igual que E2 es persistente en el ambiente con una vida media de 92 días (Hongxiang *et al.* 2007, García, 2008). Ambos compuestos son excretados en un 70% por la orina y un 30% por heces, es frecuente encontrarlos en forma libre o conjugados como glucorónidos y sulfatos en las aguas residuales de los sistemas municipales (Desbrow *et al.* 1998, Oropesa, 2008, Chimchirian *et al.* 2006). Las descargas de aguas residuales llegan al sistema de alcantarillado y de ahí a las plantas de tratamiento de aguas residuales en donde son removidos y/o biodegradados parcialmente, quedando concentraciones traza en sus efluentes, contaminando así las aguas superficiales.

La presencia de compuestos estrogénicos en diversos cuerpos de agua, se ha convertido en una constante en los países desarrollados y subdesarrollados. El Servicio Geológico de Estados Unidos (USGS por sus siglas en inglés) revela que en general la presencia de los DEs en cuerpos de agua naturales y de E2 se encuentran en concentraciones que alcanzan los 200 ng L<sup>-1</sup> (Cathum y Sabik 2001, Mao *et al.* 2010). Este tipo de compuestos también se han detectado tanto en influentes como en efluentes de estaciones depuradoras de aguas residuales; estudios realizados por Desbrow y colaboradores (1998) Velicu y Suri (2009) identificaron la presencia de estos compuestos en concentraciones de 0.5 a 49 ng/L<sup>-1</sup> para 17α-Etinilestradiol y de 1 a 80 ng L<sup>-1</sup> para 17β-Estradiol. Del mismo modo se han determinado en aguas superficiales, en Estados Unidos se han detectado rangos de concentraciones para 17β-Estradiol de 1.4-3.2 ng L<sup>-1</sup> para agua superficial, mientras que para agua subterránea y agua potable las concentraciones oscilan en 18-80 y 0.20-1.2 ng L<sup>-1</sup> respectivamente, igualmente en el Reino Unido se han determinado concentraciones de 1-5 ng L<sup>-1</sup> para en agua potable (Okkerman y Groshart 2001). En México se tiene reporte de determinaciones en agua de manantial para 17β-

Estradiol y 17 $\alpha$ -Ethinilestradiol con concentraciones de 0.02 y 0.06 ng L<sup>-1</sup> respectivamente (Becerril, 2012). En cuanto a las determinaciones en agua embotellada no se cuenta con información suficiente para estos compuestos.

### **2.3.2. Efectos toxicológicos en fauna y posibles riesgos en humanos**

Debido al papel decisivo que desempeñan las hormonas en el control del desarrollo y en numerosas funciones fisiológicas, resulta de gran importancia, determinar los posibles efectos que pudieran tener sobre los organismos. Los estrógenos sintéticos como 17 $\alpha$ -Ethinilestradiol, suelen acumularse en tejidos grasos, son más resistentes a la degradación y eliminación en los tratamientos, por lo que es más frecuente encontrarlos, además pueden ejercer su actividad estrogénica por largos periodos de tiempo a bajas concentraciones, en cuanto a 17 $\beta$ -Estradiol induce su acción pero generalmente debido a su origen natural los organismos pueden metabolizar y eliminarlo más fácilmente, sin embargo su presencia en los cuerpos de agua se ha incrementado debido al aumento de los asentamientos humanos y la crianza masiva de animales para consumo, de esta manera los organismos se ven cada vez más expuestos y su capacidad de eliminarlos por vía metabólica se ve reducida (Okkerman y Groshart 2001)

Se sabe que los estrógenos son los DEs con mayor potencia estrogénica, ellos pueden actuar dependiendo de la dosis así como el tiempo de exposición (Kandarakis *et al.* 2009), generalmente las principales anomalías se reflejan en factores reproductivos como la disminución de la fertilidad, perdida en la eficacia de apareamiento (Guillete y Uribe 2001, Porte *et al.* 2006, Safe *et al.* 2010), anomalías del comportamiento, feminización y hermafroditismo (Falconer, 2006, Mnif *et al.* 2010).

Más concretamente estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que 17 $\beta$ -Estradiol y 17 $\alpha$ -Ethinilestradiol son muy tóxicos para anfibios, reptiles y peces en éstos últimos, se ha documentado la producción de vitelogenina proteína responsable de producir las yemas de los huevos en los peces machos, siendo un factor reproductivo que le confiere a los peces hembras, también se ha documentado que concentraciones de 0.1 a 0.9 ng L<sup>-1</sup> de EE2 han inducido cambios morfológicos e histológicos en truchas de agua dulce, de igual forma se ha manifestado por medio de estudios, la dosis letal para determinar los efectos glandulares, reproductivos y carcinógenos en especies menores de mamíferos (Okkerman y Groshart

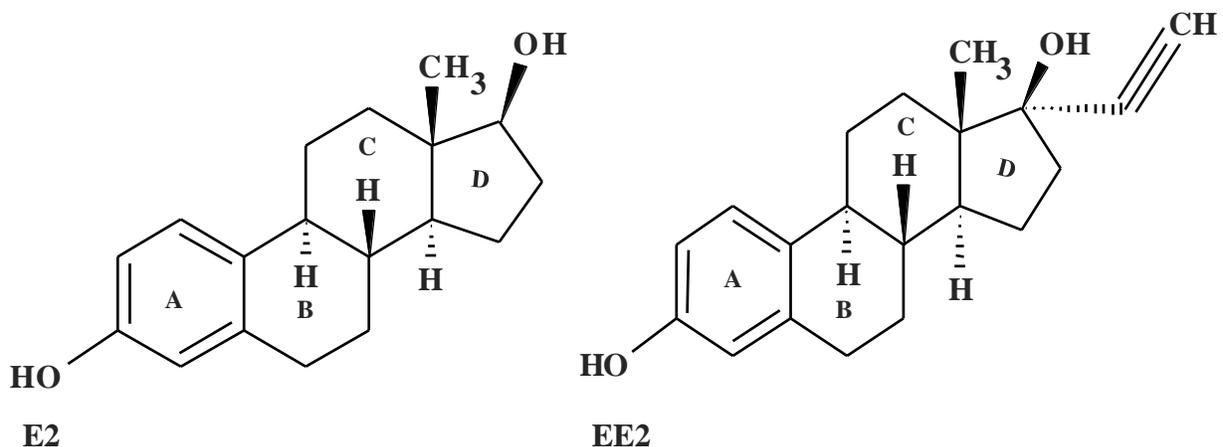
2001).

Los efectos originados por estos compuestos se identifican principalmente en organismos acuáticos, base de las cadenas alimenticias, afectando el éxito reproductivo de los organismos y consecuentemente originando una pérdida de biodiversidad en los ecosistemas acuáticos (Oropesa *et al.* 2008).

En cuanto a los efectos en humanos, la información existente aún no es suficiente para determinar los riesgos a la salud, sin embargo se tiene referencia que en los años 50 y 60 la exposición a la hormona sintética dietilestilbestrol (DES) en mujeres, causó enfermedades como cáncer vaginal, trastornos en desarrollo y descendencia (Harvey *et al.* 1999). Hay informes que muestran que los estrógenos pueden estar relacionados con ciertos efectos adversos producidos a los hombres, tales como la eficiencia en la producción de espermatozoides, ya sea por reducción y mala calidad de los mismos, además existe una relación con el aumento en los casos de cáncer hormono-dependientes (Kandarakis *et al.* 2009, Chimchirian *et al.* 2006), ya que hay datos que indican que los altos niveles de estrógenos endógenos elevan el riesgo de cáncer de mama, lo cual, se manifiesta en estudios experimentales, donde ratas fueron expuestas a niveles altos de estrógenos revelando que pueden inducir y promover tumores en la glándula mamaria (Torres y Ángeles 2009.).

### **2.3.3. Propiedades fisicoquímicas**

Los estrógenos o esteroides  $17\beta$ -Estradiol y  $17\alpha$ -Etinilestradiol son compuestos lípidicos no volátiles y se encuentran en forma neutra en el medio natural, son estables al aire, su solubilidad en agua es  $9.20 \text{ mg L}^{-1}$  para EE2 y  $1.51 \text{ mg L}^{-1}$  para E2 a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  (Shareef *et al.* 2006). Formados por una molécula constituida por cuatro carbociclos condensados denominados A, B, C y D (**Figura 1**). La característica distintiva de los estrógenos es la presencia del triple doble enlace en el anillo A, condición que le confiere propiedades aromáticas (anillo fenólico) únicas de este grupo y específicas para la unión al receptor estrogénico. Aunque los esteroides son principalmente moléculas apolares, se puede distinguir una cabeza polar constituida por el grupo hidroxilo capaz de formar puentes de hidrógeno, y una cola o porción apolar formada por el carbociclo de núcleos condensados y los sustituyentes alifáticos (Lide, 2003).



**Figura 1.** Estructura química de (E2) 17 $\beta$ -Estradiol y (EE2) 17 $\alpha$ -Etinilestradiol.

#### 2.4. Características de los métodos de análisis

Numerosos métodos han sido desarrollados para la identificación y determinación de los esteroides como de otros compuestos químicos, hoy en día existe un gran número de sistemas analíticos sofisticados y robustos, sin embargo los procedimientos deben de ajustarse a las necesidades y propósitos de cada investigación (López y Barceló 2001, Higashi y Shimada 2004, Shin *et al.* 2011). En el análisis de los esteroides la mayor dificultad radica en la diversidad y naturaleza química de las matrices ambientales y las bajas concentraciones en que se encuentran, ya que se deben identificar entre otras cientos o quizá miles de sustancias químicas que componen las muestras ambientales, las cuales podrían provocar interferencias que sesguen las determinaciones (Vallejo y López 2012).

En el método convencional, para determinar esteroides, las muestras de agua se pasan a través de una fase estacionaria sólida que retiene los componentes orgánicos y los extrae de la matriz acuosa, a esta técnica se le conoce como extracción en fase sólida (EFS). Luego se eluyen con una secuencia de distintos disolventes orgánicos individuales o mezclas que separan los disruptores de la mayoría de las interferencias orgánicas. El adsorbente más utilizado es C<sub>18</sub> donde los grupos funcionales orgánicos hidrofóbicos son químicamente unidos a una superficie sólida, tales como la sílice, estos grupos interactúan con compuestos orgánicos hidrofóbicos y los extraen de la fase acuosa (López y Barceló

2001, Vallejo y López 2012). Posteriormente el extracto orgánico es evaporado para cambiar el tipo de disolvente o bien para concentrar los analitos y realizar el análisis químico a través de cromatografía de líquidos (CL) o de gases (CG) (García, 2008).

En CL, los extractos son analizados directamente, mientras que en CG se requiere la conversión química de los esteroides para mejorar la estabilidad térmica de los compuestos, en especial aquellos que tienen grupos polares, cambiando las propiedades de separación de los compuestos ajustando su volatilidad o introduciendo en la molécula un señalador dirigido al detector de masas (Knapp, 1979).

Generalmente para los esteroides se pretende favorecer su volatilidad y resolución en las columnas capilares debido a que los esteroides poseen un alto peso molecular y presentan grupos polares como alcoholes, fenoles e hidroxilos que disminuyen las propiedades de separación en la columna. La derivatización empleada en los esteroides principalmente se utiliza para transformarlos en compuestos volátiles y que sean térmicamente estables (Bowden *et al.* 2009, Shin *et al.* 2011). En el caso de los esteroides el grupo polar hidroxilo es el responsable de su dificultad para analizarse por CG, por lo que se utiliza el método de silanización en el cual los grupos hidroxilos son transformados por grupos trimetilsilanoles (TMS) (Knapp, 1979, Shareef *et al.* 2006, Zhou *et al.* 2007, Bowden *et al.* 2009).

A pesar de que la derivatización química consume tiempo y podría resultar costosa, tiene la ventaja de incrementar la sensibilidad y selectividad de los métodos analíticos, ya que se mejoran los límites de detección y cuantificación del método de tratamiento de muestra y análisis químico si se compara con la determinación directa con CL. Además con la derivatización se pueden optimizar las condiciones para transformar químicamente a un menor grupo de especies químicas o selectivamente se podrían derivatizar un tipo específico de esteroides (Bowden *et al.* 2009, Zhou *et al.* 2009).

La CG brinda distintas opciones de detectores que podrían incrementar la confiabilidad de la identificación, como la espectrometría de masas molecular que es útil para obtener información estructural con gran precisión, separando los fragmentos moleculares en función de su relación carga-masa ( $m/z$ ), adicionalmente proporciona la ventaja de la

identificación inequívoca de los compuestos químicos mediante su espectro de masas característico, que es como una huella digital de la estructura química y prueba confiable de su presencia en la muestra (Knapp, 1979, Huang *et al.* 2010).

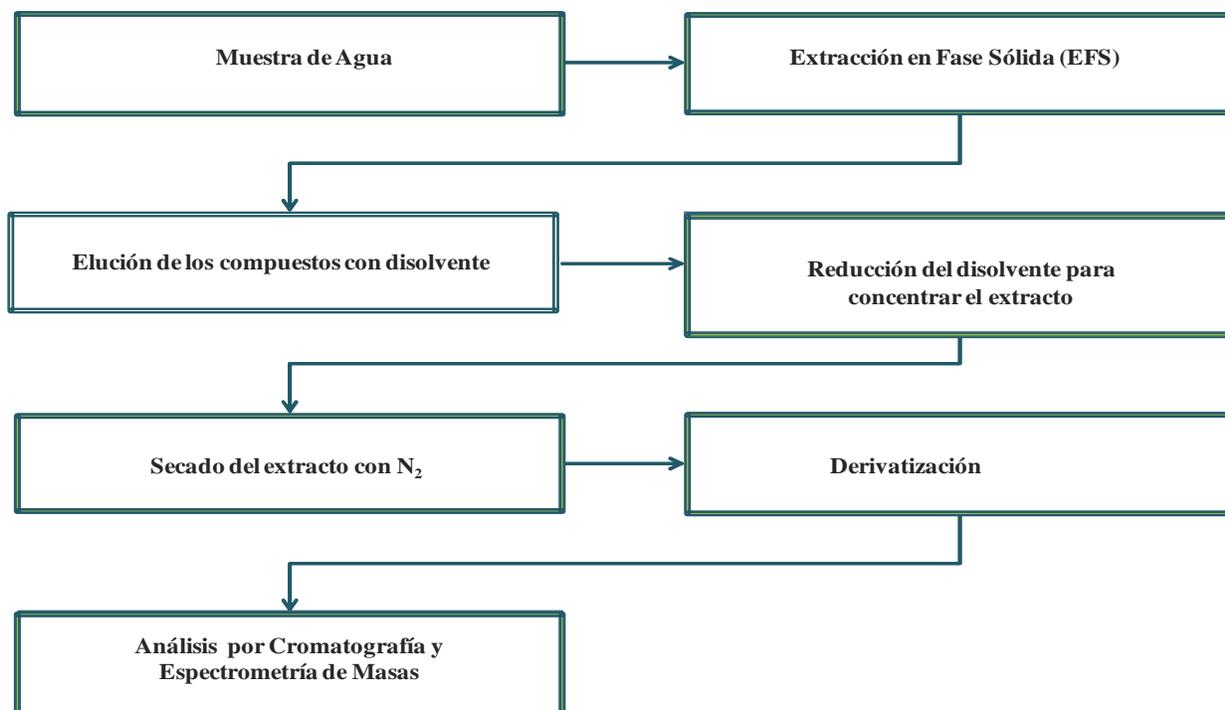
Diversos autores han realizado el tratamiento de muestra con la extracción de compuestos en fase sólida (EFS), aplicando la derivatización de esteroides y el análisis por CG-EM. En 1998 Desbrow y colaboradores combinaron una prueba *in vitro* de actividad estrogénica, y obtuvieron límites de detección para 17 $\beta$ - Estradiol y 17 $\alpha$ - Etinilestradiol de 1 a 50 y 0.2 a 7.0 ng L<sup>-1</sup>, respectivamente. De igual forma Cathum y Sabik (2001) determinaron la presencia de esta y otras hormonas alcanzando un límite de detección de 2.0 ng L<sup>-1</sup>. Más recientemente Velicu y Suri (2009) reportaron esteroides en diferentes zonas de plantas depuradoras de agua, teniendo un límite de detección de 0.8 a 19 ng L<sup>-1</sup> para 17 $\beta$ - Estradiol.

De manera alternativa, el análisis de hormonas esteroides se ha realizado por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), acoplado a espectrometría de masas (EM) con aplicaciones en muestras biológicas y de muestras ambientales. Usualmente los tratamientos que tiene esta técnica son la extracción y la purificación de la muestra, en la mayoría de los estudios realizados para estos compuestos. La CL tiene la ventaja de que no se requiere la derivatización de los esteroides y cuenta con la capacidad de identificación con EM/EM en el análisis químico (Vallejo y López (2012), sin embargo el acople HPLC-EM/EM es costoso y su accesibilidad es limitada.

Hasta ahora, es limitada la información sobre la presencia de estos compuestos en el agua potable de los sistemas de abastecimiento local y en el agua comercial de las ciudades mexicanas. Por lo que resulta de gran importancia que se realicen metodologías analíticas que brinden confiabilidad a la determinación, principalmente que disminuyan la incertidumbre en la identificación debido a la complejidad química de la muestra y que brinden límites de detección que correspondan con los niveles ambientales que previamente han sido reportados.

### 3. Desarrollo Experimental

El procedimiento para determinar los compuestos seleccionados en muestras de agua se adaptó de los trabajos de Bowden *et al.* (2009) y en Velicu y Suri (2009). En la figura 2 se muestra un esquema de las etapas que conformaron la metodología, las condiciones de análisis se optimizaron mediante el método de adición de patrón o de estándares de los compuestos en cantidades conocidas a la muestra de prueba, la cuantificación se realizó por medio del estándar subrogado. Luego, se ajustaron los parámetros para el análisis por cromatografía de gases y espectrometría de masas. Posteriormente el método optimizado se aplicó a muestras de agua embotellada y agua potable de la llave para identificar y cuantificar dos esteroides.



**Figura 2.** Diagrama del procedimiento general del método analítico.

#### 3.1. Reactivos y materiales

Los esteroides seleccionados con 98 % de pureza  $17\beta$ -Estradiol (E2) y  $17\alpha$ -Etinilestradiol (EE2) y el estándar subrogado con 99 % de pureza 1,1-Dicloro-2,2-Bis

(para-clorofenilo) etileno (DDE) se adquirieron en polvo (Sigma-Aldrich). La derivatización se realizó con N, O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) + 1 % trimetilclorosilano (TMCS) con 99 % de pureza en presentación líquida (Sigma-Aldrich). La extracción de los esteroides y el subrogado se realizó mediante el paso de la muestra de agua a través de cartuchos empacados con 0.5 g de octadecilo (C<sub>18</sub>) (Phenomenex y Agilent). Todos los disolventes orgánicos utilizados (ACE: acetona, CM: cloruro de metileno, MET: metanol y PIR: piridina) fueron grado HPLC (Fermont). Todas las conexiones y tuberías empleadas para el paso de muestras estaban elaboradas de teflón. La vidriería como viales de inyección e insertos (Agilent Technologies) se hornearon a 500 °C y el material de vidrio restante (Pyrex) a 120 °C por 24 h. Todo el material se lavó con acetona previo a cada prueba y análisis.

### **3.2. Preparación de disoluciones**

Las disoluciones de trabajo, corregidas por pureza, de 17β-Estradiol (E2), 17α-Etinilestradiol (EE2) y 1,1-Dicloro-2,2-Bis (para-clorofenilo) etileno (DDE) se prepararon a partir de estándares individuales en polvo pesados en una balanza microanalítica SE 2-F (Sartorius) y diluidos en metanol o cloruro de metileno (**Anexo A y B**), según la prueba a realizar y especificada en cada sección. La mezcla derivatizante (BSTFA + 1 % TMCS) líquida se utilizó directamente.

### **3.3. Procedimiento de extracción con fase sólida**

Previamente a la extracción se optimizó el volumen del disolvente de elución a fin de contribuir a incrementar la eficiencia del procedimiento, inicialmente se probó con 12 mL de cloruro de metileno colocados en un cartucho (C<sub>18</sub>) de 0.5 g, a este se le adicionó una cantidad conocida del subrogado DDE (2.5 µg). El disolvente se colectó en fracciones de 1 y 2 mL determinando así el volumen necesario para la elución y se procedió a realizar la extracción.

Primeramente el cartucho empacado se acondicionó mediante el paso a gravedad de 6 mL de metanol seguido por 6 mL de agua ultrapura para disminuir impurezas producto de la fabricación y disponer los sitios activos para la retención de los compuestos. Las muestras

de agua de prueba y embotelladas se pasaron a un flujo constante y sin interrupción, por aplicación de vacío. Luego el cartucho se seca al vacío por 20 min y en seguida los compuestos se eluyen con el disolvente cloruro de metileno.

### **3.4. Reducción del extracto orgánico y concentración de esteroides**

El disolvente orgánico del extracto eluido (10 mL) se redujo aproximadamente a 0.5 mL en un evaporador rotatorio RV10 (IKA) a presión y temperatura controladas para concentrar los componentes de la muestra y facilitar su detección instrumental, para finalmente ser aforados a 1 mL. La eficiencia de la etapa de reducción se evaluó con cloruro de metileno aplicando temperatura diferentes (30, 35, y 40 °C).

### **3.5. Secado del extracto orgánico**

El método de análisis requiere una vez que los esteroides se extraen de las muestras de agua sean transferidos a un disolvente orgánico y se lleven a sequedad con una corriente suave de nitrógeno para evitar reacciones secundarias en la derivatización por la presencia del disolvente utilizado para la extracción.

Sin embargo, hubo que seleccionar un disolvente orgánico que facilitara la disolución de los compuestos de interés y al mismo tiempo tuviera una presión de vapor suficientemente baja para disminuir las pérdidas durante el secado. De esta manera se utilizaron disoluciones de trabajo estándares del compuesto subrogado ( $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) para probar la reducción y secado con tres disolventes que reunían esas propiedades (metanol, acetona y cloruro de metileno), realizando dos replicas por disolvente.

### **3.6. Derivatización de esteroides**

El extracto concentrado y seco se resuspende con 100  $\mu\text{L}$  de piridina y 100  $\mu\text{L}$  BSTFA + 1 % TMCS, la mezcla se homogeniza en un vortex y se coloca en un baño de ultrasonido 5510 (Branson) por 30 minutos a una temperatura de 60 °C (Bowden *et al.* 2009). Pruebas preliminares con y sin piridina, se realizaron para evaluar la eficiencia de la reacción por la formación subproductos.

### **3.7. Análisis cromatográfico**

Las muestras se analizaron por cromatografía de gases (CG) 6890N (Agilent Technologies) y espectrometría de masas (EM) 5975 (Agilent Technologies). La inyección (0.5  $\mu\text{L}$ ) se realizó en el modo splitless por duplicado a una temperatura de 280 °C. La mezcla de compuestos se separó en una columna capilar HP5MS de 30 m de longitud, con 0.25 mm de diámetro interno y 0.25  $\mu\text{m}$  de grosor de película con helio de alta pureza (INFRA) a un flujo de 1 mL  $\text{min}^{-1}$  mediante un programa de temperatura que inició en 120 °C por 2 min, luego se elevó a razón de 15 °C  $\text{min}^{-1}$  hasta llegar a 250 °C y finalmente se incrementó a 5 °C por  $\text{min}^{-1}$  hasta llegar a 300 °C manteniéndose por cinco minutos. La línea de transferencia se mantuvo a 310 °C para evitar la condensación. Los espectros de masa se obtuvieron por impacto electrónico (IE) a 70 eV con la fuente de ionización a 200 °C. Se utilizó el barrido de masas en modo *SCAN* para la optimización de la separación y la identificación de compuestos y en *SIM* para la cuantificación.

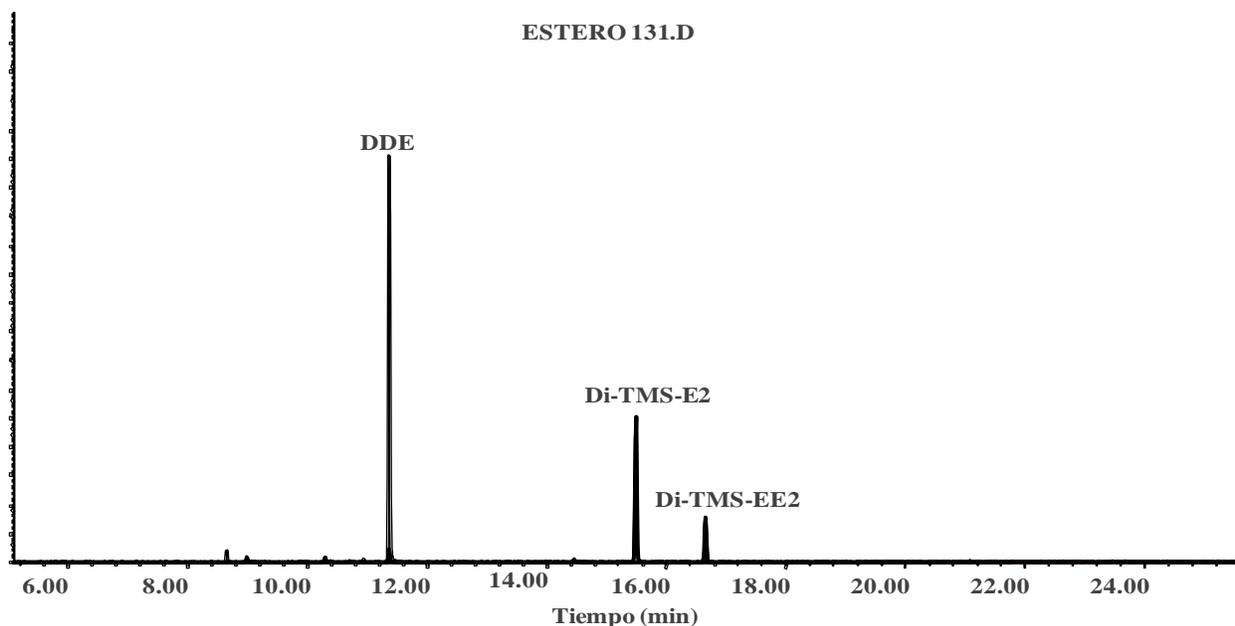
### **3.8. Aplicación del método a muestras de agua comercial (embotellada) y potable**

El método de análisis optimizado se aplicó para la determinación de los dos esteroides seleccionados. Se adquirieron seis marcas de agua embotellada con presentación de 1.5 L, las muestras consistieron en dos botellas por marca, cabe resaltar que algunas marcas tuvieron diferencia en los lotes así como hubo algunas que no lo contenían, estas se almacenaron a 4 °C. En cuanto al agua potable, se conformaron por dos muestras, mismas que se tomaron directamente de la red de distribución y abastecimiento de agua potable de CIATEJ de acuerdo a la NOM-014. El agua potable se pasó a través de un filtro de nylon (Millipore) con el fin de eliminar los sólidos disueltos.

## 4. Resultados y Discusión

### 4.1. Separación e identificación de compuestos por CG-EM

Los parámetros instrumentales por cromatografía de gases y espectrometría de masas (CG-EM) se adaptaron del trabajo de Bowden *et al.* (2009). El análisis de los estándares individuales en disolución del compuesto subrogado (DDE) y los esteroides (E2 y EE2), fue directo (sin derivatizar) y posteriormente se analizaron después de la derivatización. El análisis por CG facilitó la confirmación de los productos Di-TMS, de la reacción de los esteroides con la mezcla derivatizante (BSTFA + 1 % TMCS) a través de los tiempos de retención y el orden de elución (**Figura 3**).



**Figura 3.** Orden de elución del compuesto subrogado DDE y los esteroides derivatizados Di-TMS-E2:  $17\beta$ -Estradiol y Di-TMS-EE2:  $17\alpha$ -Etinilestradiol.

En cuanto a la espectrometría de masas (EM) brindó información estructural de los compuestos analizados y obtenidos experimentalmente por ionización electrónica a 70 eV y confirmados por reportes previos (Bowden *et al.* 2009). Así, en cada espectro, se seleccionaron los dos valores de relación masa/carga ( $m/z$ ) de mayor abundancia (**Figuras 4 y 5**) los cuales, se utilizaron como criterio de identificación en las pruebas de optimización de condiciones y posteriormente en la aplicación del método.

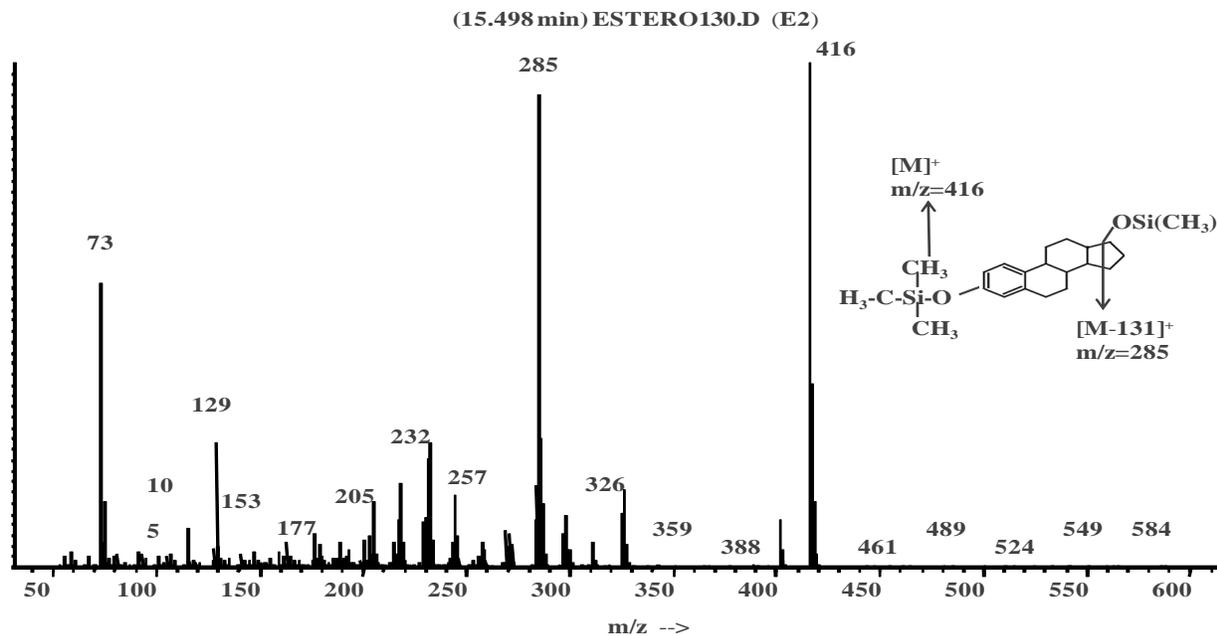


Figura 4. Espectro de masas de Di-TMS-E2: 17 $\beta$ -Estradiol.

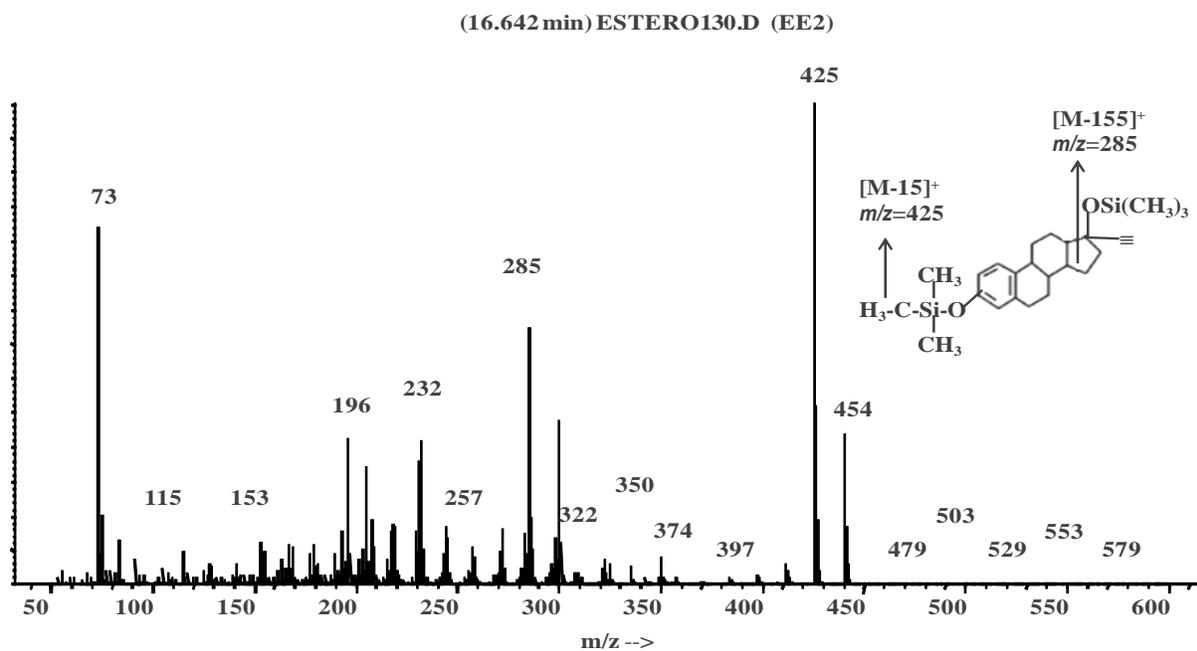
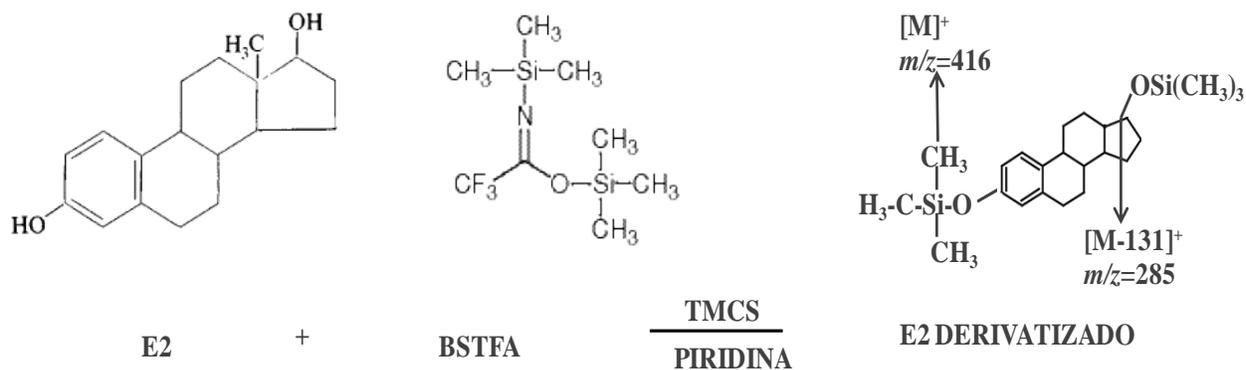


Figura 5. Espectro de masas de Di-TMS-EE2: 17 $\alpha$ -Etinilestradiol.

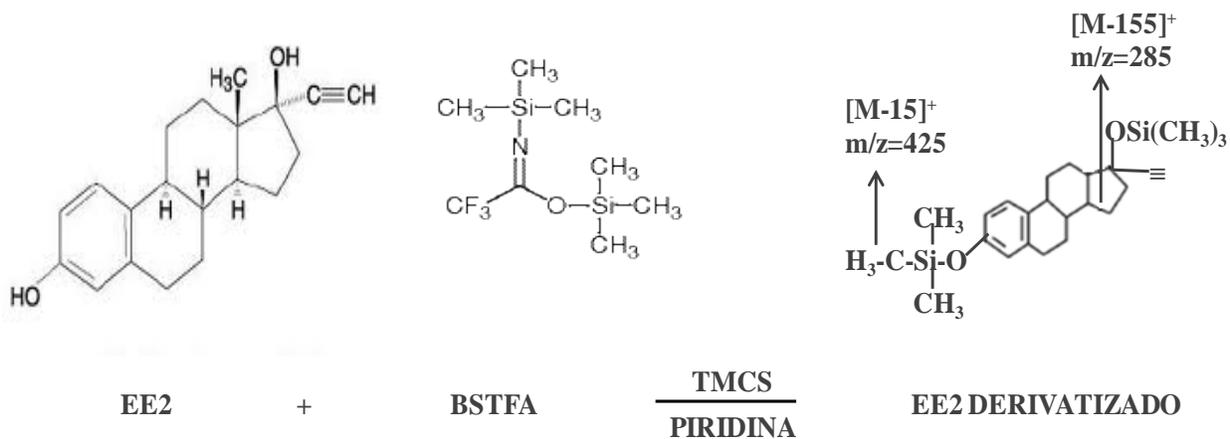
#### 4.2. Optimización de las condiciones de derivatización

La derivatización se realiza para facilitar el análisis de los esteroides por CG-EM,

fundamentalmente es una reacción en la que se sustituyen los átomos de hidrógeno de los grupos hidroxilo (OH) en las moléculas de  $17\beta$ -Estradiol (**Figura 6**), y del hidroxilo y el etino en el  $17\alpha$ -Etinilestradiol (**Figura 7**). Esto favorece el análisis por cromatografía de gases ya que se incrementa la estabilidad térmica del compuesto (Huang *et al.* 2010) y su presión de vapor, debido, a la reducción de la atracción intermolecular por puentes de hidrógeno. Además, se disminuye la interacción química de los grupos hidroxilo con la fase estacionaria en la columna cromatográfica (Knapp, 1979).



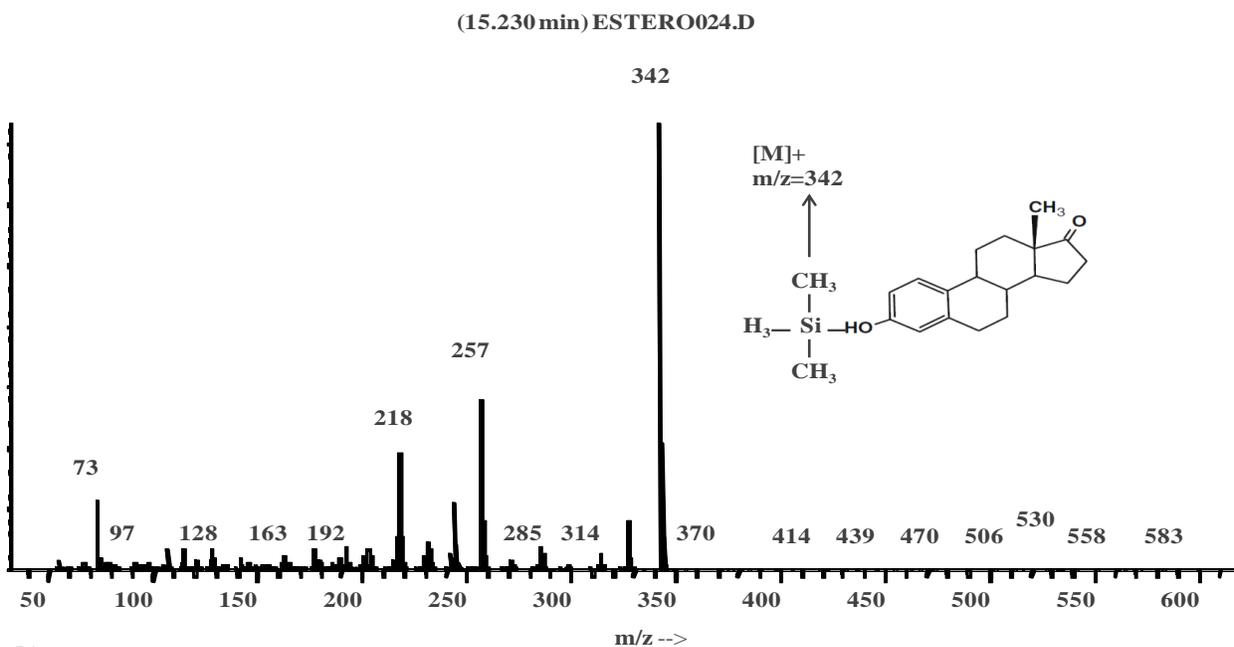
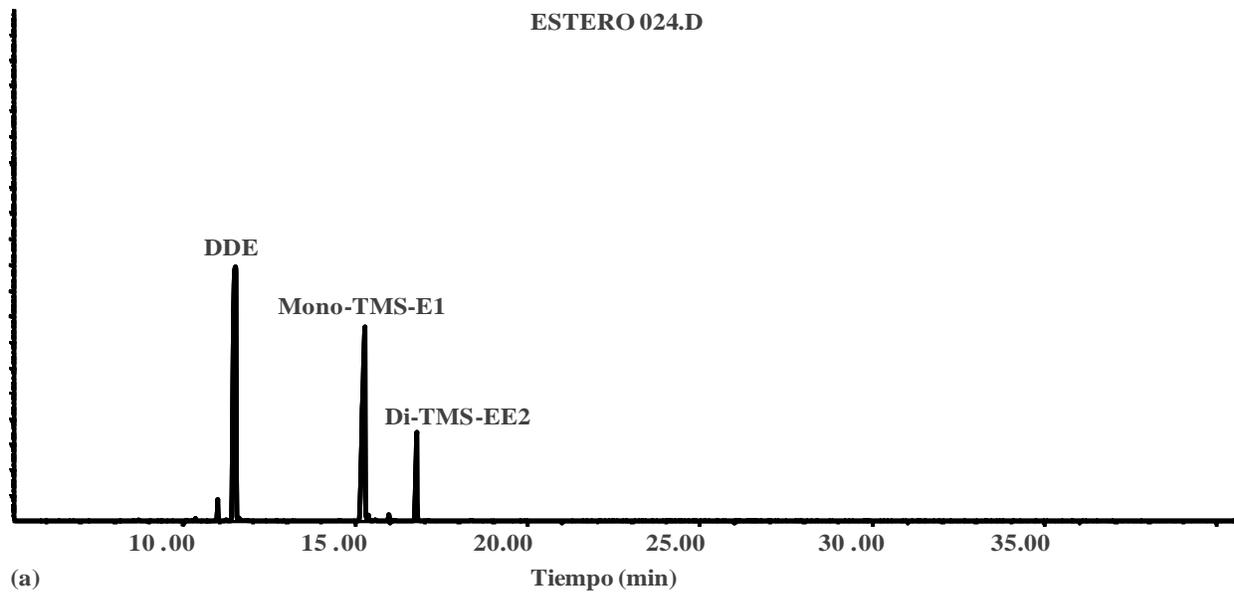
**Figura 6.** Reacción de la derivatización de  $17\beta$ -Estradiol (E2).



**Figura 7.** Reacción de la derivatización de  $17\alpha$ -Etinilestradiol (EE2).

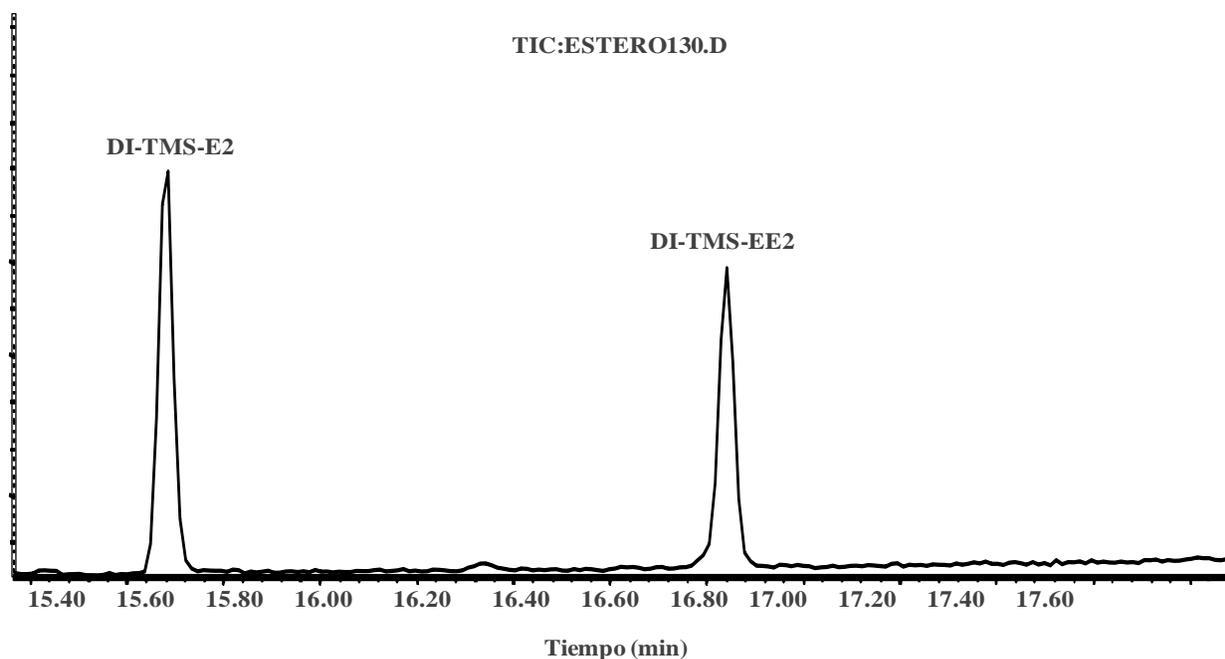
#### 4.2.1. Efecto del disolvente

En ensayos preliminares se realizó la derivatización de los esteroides únicamente con la mezcla de BSTFA + 1 % TMCS y luego se adicionó piridina para evaluar el efecto del disolvente. Sin utilizar disolvente, se forma un compuesto distinto al Di-TMS-EE2 (**Figura 8a**) que podría disminuir la eficiencia de la reacción y sesgar la cuantificación ya que es un sub-producto cuyo espectro de masas corresponde con el derivatizado de Estrona (**Figura 8b**).



**Figura 8.** Cromatograma que muestra el subproducto distinto al Di-TMS-EE2, correspondiente a Mono-TMS-E1 Estrona (a) y espectro de masas con estructura derivatizada (b).

Sin embargo, la adición de piridina a la mezcla de reacción evita su formación de acuerdo con los resultados de Shareef *et al.* (2006), el uso de este disolvente impide la conversión de silanol de TMS-EE2 hasta TMS-E1 (**Figura 9**).



**Figura 9.** Cromatograma que muestra la desaparición de Mono-TMS-E1 utilizando piridina.

Por lo tanto, el uso de piridina se considera en el desarrollo del método para ambos esteroides aunque no hubo evidencia de este y otros subproductos con  $17\beta$ -Estradiol (E2).

#### 4.2.2. Eficiencia del secado con nitrógeno

Se comparó la eficiencia de secado con nitrógeno y los tres disolventes con parámetros como: tiempo de secado y % de recobro así como sus respectivas desviaciones estándar (DE) y coeficientes de variación (CV). En la tabla 2 se muestran los valores obtenidos para el disolvente metanol el cual tuvo un mayor tiempo de secado y un recobro superior al 120 %; en lo que se refiere a DE y CV fueron mayores que los otros dos disolventes quedando descartado. En cuanto a los disolventes acetona y cloruro de metileno ambos tuvieron el mismo tiempo de secado y recobros del 101 y 93 %, respectivamente; sin embargo, al comparar la DE y CV, el cloruro de metileno presenta menor variación entre repeticiones optando a ser empleado como disolvente para los compuestos.

**Tabla 2.** Comparación de parámetros de tres disolventes por secado con nitrógeno (n=4).

<b>Disolvente</b>	<b>t (min)</b>	<b>R (%)</b>	<b>DE</b>	<b>CV</b>
Metanol	35	121	8.6	5.2
Acetona	27	101	4.1	4.0
Cloruro de metileno	27	93	3.2	3.4

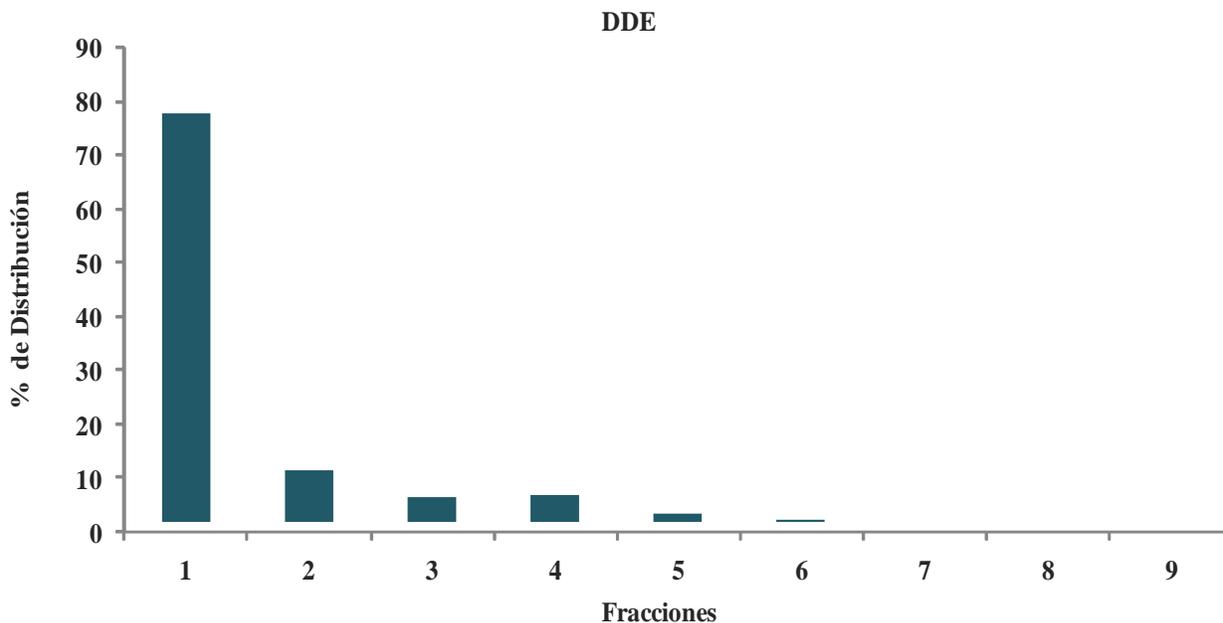
t: tiempo, R (%): porcentaje de recobro promedio, DE: desviación estándar, CV: coeficiente de variación, n: número de observaciones.

### **4.3. Optimización de las condiciones de extracción y reducción del extracto**

En la extracción, los esteroides se retienen temporalmente en octadecilo ( $C_{18}$ ) luego se eluyen con un disolvente orgánico y posteriormente el exceso de disolvente se reduce para concentrar los compuestos y facilitar su posterior derivatización. Las condiciones de la extracción y reducción se optimizaron con el propósito de incrementar su eficiencia como se describe a continuación:

#### **4.3.1. Ajuste del volumen de elución**

La cantidad de disolvente orgánico necesario para eluir los esteroides se optimizó por medio de un análisis de la distribución de masa del compuesto subrogado (DDE), en distintas fracciones (1 a 9), eluidas sucesivamente con 1 y 2 mL de cloruro de metileno. El resultado muestra que la distribución de la masa del DDE se concentra en mayor cantidad en la primera fracción y va disminuyendo en las posteriores fracciones (**Figura 10**). Por lo tanto, se seleccionó un volumen de 10 mL de cloruro de metileno y se obtuvo un recobro del 89 % sumando el área absoluta de las fracciones. Con lo cual se reúne el criterio de ajuste recomendado por Thurman y Mills (1998).



**Figura 10.** Distribución de la masa del compuesto subrogado (DDE) en las fracciones durante el proceso de elución.

#### 4.3.2. Evaluación de las condiciones de reducción en evaporador rotatorio

En el evaporador rotatorio, el exceso de disolvente se disminuye para concentrar los compuestos y facilitar la cuantificación por CG-EM. Las condiciones utilizadas son comúnmente las que recomienda el fabricante, sin embargo es necesario evaluar la eficiencia de recobro cuando se pretende analizar concentraciones traza de los compuestos objeto de estudio, ya que en esos niveles la determinación implica mayor incertidumbre. La evaluación se realizó mediante el análisis directo (sin derivatizar) de una disolución del subrogado (DDE) en cloruro de metileno concentrada veinte veces, a tres temperaturas y presiones distintas por triplicado.

Los valores obtenidos a través de las condiciones aplicadas, muestran en general que los porcentajes de recobro tienen un comportamiento similar, sin embargo para la elección de las condiciones empleadas en el método analítico, se tomo como criterio las que implicaran % de recobro aceptables y presentaran DE y CV menores. Por lo tanto, la condición seleccionada (**Tabla 3**) fue: la temperatura 35 °C, al obtener el 100 % de recobro y 6 % de variación entre repeticiones.

**Tabla 3.** Valores de recobro obtenidos a distintas condiciones con extractos en cloruro de metileno (n=3).

Condiciones		Promedio	
T (° C)	R (%)	DE	CV
30	104	9.6	9.1
35	100	6.6	6.6
40	108	13.1	12.1

n: número de observaciones, T: temperatura, R (%): porcentaje de recobro promedio, DE: desviación estándar, CV: coeficiente de variación.

#### 4.4. Evaluación del método analítico

Una vez optimizadas las condiciones de cada paso, el método de análisis se aplicó a la curva de calibración del método con el propósito de evaluar los siguientes parámetros analíticos de calidad, antes de aplicar el método a las muestras seleccionadas para la determinación. Consistió en muestras de agua ultrapura fortificadas con una mezcla de EE2 y E2, con siete y ocho puntos de concentración respectivamente, y adicionadas con 2500 ng mL<sup>-1</sup> del compuesto subrogado (DDE).

##### 4.4.1. Eficiencia de la extracción y la derivatización

La evaluación de la eficiencia se basó en el método del subrogado, así los recobros obtenidos para cada nivel de ensayo consideran la variación de cada etapa del tratamiento (extracción, reducción, secado y derivatización), el análisis de la muestra y el efecto matriz. Los resultados indican que los recobros son en promedio del 87 % con una DE  $\pm$  6.33 y coeficientes de variación en su mayoría menores a 5.5 % (**Tabla 4**). Estos resultados son consistentes con los reportados previamente por Filali *et al.* (2007), Velicu y Suri (2009), Zhang *et al.* (2010) y Chimchirian *et al.* (2006).

**Tabla 4.** Recobros promedio del subrogado en cada nivel de ensayo en la curva del método analítico (n=2).

<b>Muestra fortificada<sup>a</sup></b>	<b>R (%)</b>	<b>DE</b>	<b>CV</b>
1	89	4.3	4.8
2	86	4.8	5.5
3	88	0.9	1.0
4	79	1.0	1.3
5	84	9.1	10.9
6	88	3.0	3.3
7	81	1.0	1.3

n: número de observaciones, <sup>a</sup>: muestra fortificada con 2500 ng de DDE, R (%): porcentaje de recobro promedio basado en estándar subrogado (DDE), DE: desviación estándar, CV: coeficiente de variación.

Estos recobros se calcularon por medio de la ecuación **C.1 (Anexo C)**, los cuales se utilizaron para corregir el cálculo de los límites de detección y cuantificación y las determinaciones de los esteroides en las muestras de agua analizadas.

#### **4.4.2. Precisión de la respuesta analítica**

La precisión de la respuesta analítica se midió con base a la repetibilidad del área relativa (Área del esteroide derivatizado/Área del subrogado) en cada nivel de ensayo y posteriormente se estimó la reproducibilidad en base a los resultados de repetibilidad (**Tablas 5 y 6**). La repetibilidad para E2 osciló entre el 81 y 100 % según los distintos niveles, en tanto que la reproducibilidad alcanzó el 90 % (se omitió el valor del nivel 8).

**Tabla 5.** Repetibilidad y Reproducibilidad para E2 en el método analítico (n=4).

Dilución	A E2 / A DDE							Repetibilidad
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Prom	DE	CV %	%
1	0.056	0.056	0.066	0.067	0.061	0.006	10	90
2	0.026	0.025	0.036	0.035	0.031	0.006	19	81
3	0.025	0.025	0.023	0.024	0.024	0.001	4	96
4	0.02	0.018	0.018	0.018	0.019	0.001	5	95
5	0.009	0.008	0.007	0.007	0.008	0.001	12	88
6	0.007	0.005	0.006	0.005	0.006	0.001	17	83
7	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.000	0.0	100
<b>Reproducibilidad</b>								90

A E2/ A DDE: área absoluta de E2/ área absoluta de DDE (n=4), DE: desviación estándar (n=4), CV: coeficiente de variación, Prom: promedio del coeficiente de variación en las diluciones (n=7).

**Tabla 6.** Repetibilidad y Reproducibilidad para EE2 en el método analítico.

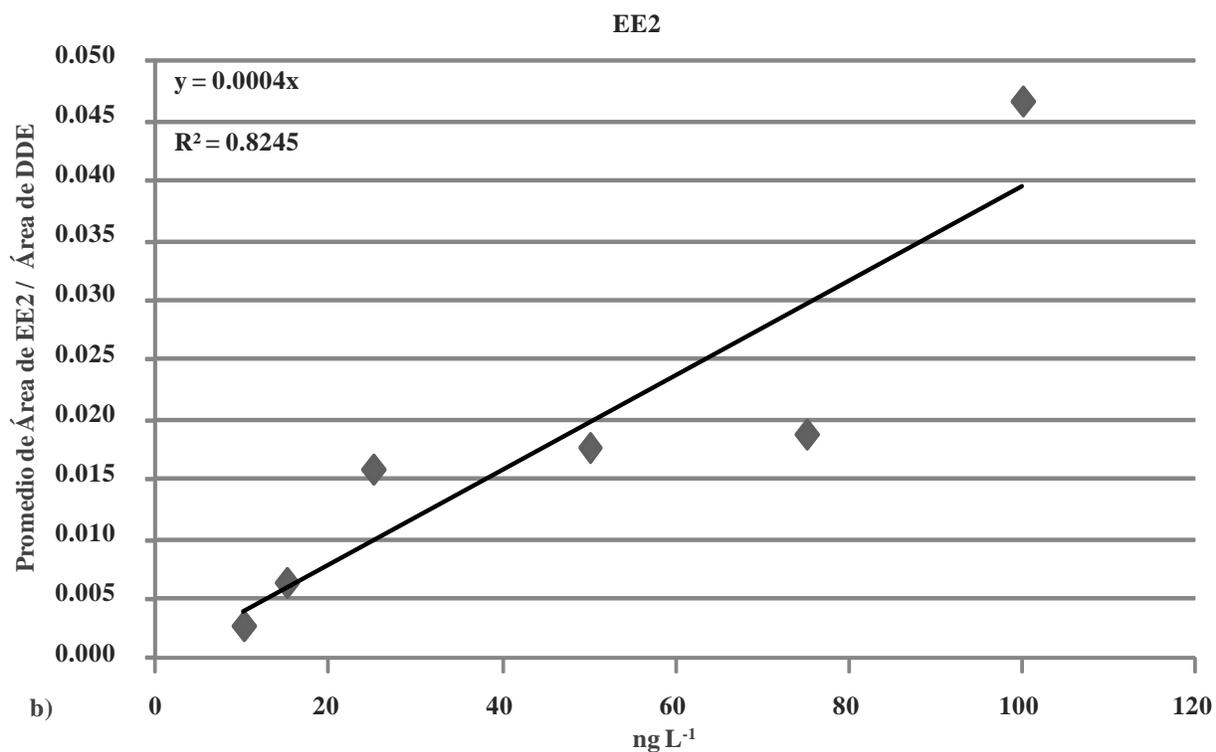
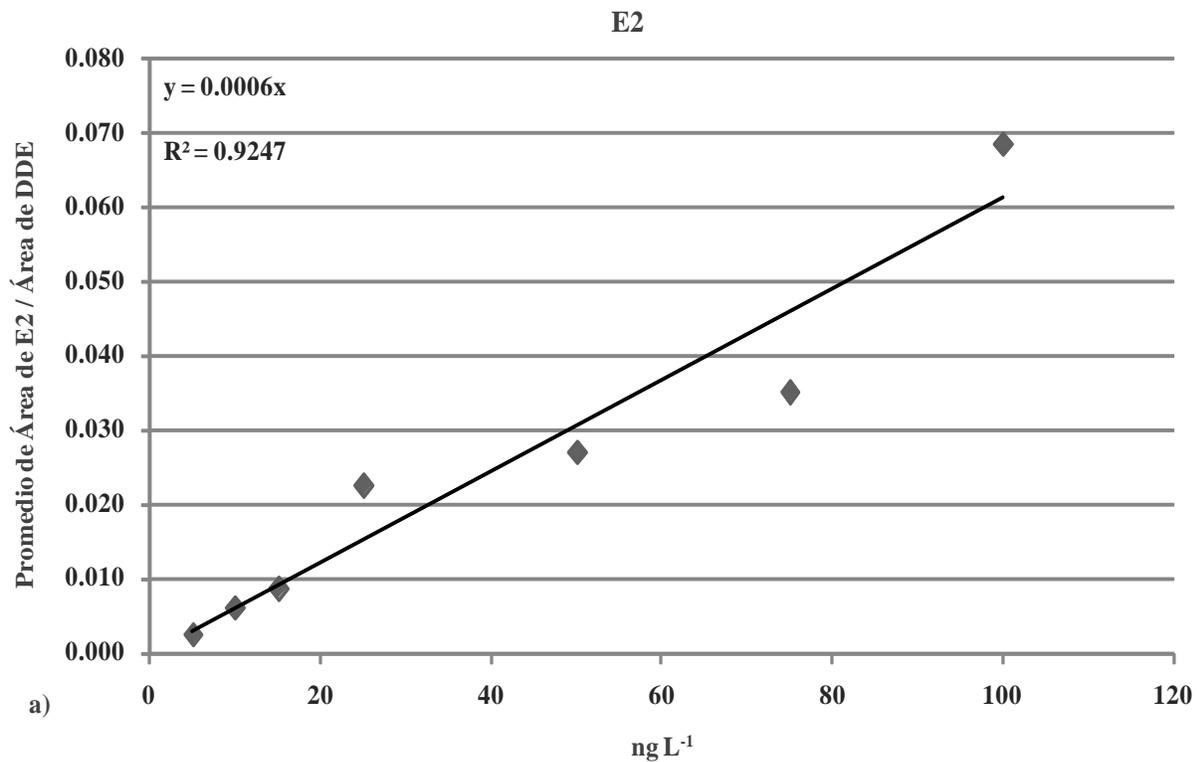
Dilución	A EE2 / A DDE							Repetibilidad
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Prom	DE	CV %	%
1	0.04	0.04	0.043	0.043	0.042	0.002	4	96
2	0.02	0.019	nc	0.023	0.021	0.002	10	90
3	0.013	0.014	0.017	0.018	0.016	0.002	15	85
4	0.014	0.014	0.011	0.011	0.013	0.002	14	86
5	0.006	0.006	0.005	0.005	0.006	0.001	10	90
6	0.003	0.003	0.002	0.003	0.003	0.001	18	82
<b>Reproducibilidad</b>								88

A E2/ A DDE: área absoluta de EE2/ área absoluta de DDE (n=4), nc: no calculado, DE: desviación estándar (n=4), CV: coeficiente de variación, Prom: promedio del coeficiente de variación en las diluciones (n=6).

En cuanto a la repetibilidad para EE2 esta fluctuó entre 82 y 96% según los distintos niveles probados, mientras que la reproducibilidad alcanzó un 88 % (se excluyó el nivel 7).

#### **4.4.3. Linealidad**

Este parámetro indica la bondad de la relación lineal entre la respuesta analítica y la concentración. De esta manera; la linealidad de los esteroides se graficó a través de la respuesta relativa promedio en cada punto de la curva, correspondiente a la concentración. El análisis de regresión muestra que la variación de la respuesta analítica corregida por el estándar subrogado es proporcional a la concentración adicionada de esteroides con coeficientes de determinación ( $r^2$ ) para E2 (**Figura 11a**) y EE2 (**Figura 11b**) iguales a 0.9247 y 0.8245, respectivamente.



**Figura 11.** Curva de calibración del método analítico para los esteroides E2 (a) y EE2 (b).

La evaluación del ajuste de los puntos experimentales al modelo lineal se realizó mediante un contraste estadístico de *t* de *student* que determina la significancia del coeficiente de correlación (*r*) (**Anexo D**). Los resultados mostraron que los puntos experimentales para la señal analítica relativa de los esteroides (Área del esteroide/Área del subrogado) se ajustan significativamente a un modelo de regresión lineal en el rango de las concentraciones analizadas (**Tabla 7**).

**Tabla 7.** Parámetros analíticos de la curva de calibración del método.

<b>Esteroide</b>	<b>n</b>	<b>r</b>	<b>r<sup>2</sup></b>	<b>Intervalo (ng L<sup>-1</sup>)</b>
E2	7	0.962	0.9247	5 – 100
EE2	6	0.908	0.8245	10 – 100

E2: 17β-Estradiol, EE2: 17α-Etinilestradiol, n: número de diluciones, r: coeficiente de correlación, r<sup>2</sup>: coeficiente de determinación. Los valores de r resultaron significativos (p<0.05) con  $t_{\text{calculado}} > t_{\text{tabulado (n-2)}}$  (Miller y Miller, 2002).

#### 4.4.4. Selección del tipo de regresión

En regresiones lineales simples se asume comúnmente que la varianza (Var: desviación estándar al cuadrado) de la señal analítica se mantiene constante con el incremento de la concentración (homocedasticidad). Sin embargo, diferentes autores han encontrado que la varianza incrementa significativamente con el aumento de la concentración (heterocedasticidad) en el análisis de compuestos orgánicos por cromatografía de gases (Medina 2010, Murillo 2010, Valle *et al.* 2010, Flores 2012). Esto puede provocar sesgos en el cálculo de los parámetros de la recta de regresión y en los límites de detección y cuantificación, así como en la determinación de las concentraciones de los analitos de interés. En su lugar, Miller y Miller (2002) sugieren la aplicación de una regresión ponderada, la cual brinda a cada punto una ponderación inversamente proporcional a la varianza respectiva y proporciona una ponderación adicional a los puntos de la curva donde las barras de error son más cortas.

Los resultados de la evaluación de la homocedasticidad mediante una prueba estadística de “F de Fisher” sugieren un comportamiento heterocedastico de la varianza a través de los puntos experimentales de la recta, ya que al menos la varianza del punto experimental con mayor concentración difiere significativamente de aquellos con menor concentración ( $F_{\text{calculada}} > F_{\text{tablas}}$ ) (**Tablas 8 y 9**).

**Tabla 8.** Evaluación de la homocedasticidad de las varianzas para E2 (n=4).

Dilución	A <sub>relativa</sub>	DE	Var	F <sub>calculada</sub> consecutiva <sup>a</sup>	F <sub>calculada</sub> interdilución <sup>b</sup>
1	0.061	0.006	3.6 x 10 <sup>-5</sup>	nc	27.9
2	0.031	0.006	3.0 x 10 <sup>-5</sup>	1.18	35.2
3	0.024	0.001	1.3 x 10 <sup>-6</sup>	23.6	207.7
4	0.018	0.001	8.6 x 10 <sup>-7</sup>	1.49	0.04
5	0.008	0.001	8.1 x 10 <sup>-7</sup>	1.06	0.00
6	0.006	0.001	8.3 x 10 <sup>-7</sup>	0.99	0.00
7	0.002	0.000	3.9 x 10 <sup>-9</sup>	210.6	0.00

E2: 17β-Estradiol, n: número de observaciones, A<sub>relativa</sub>: promedio del Área del esteroide/Área del DDE (n=4), DE: desviación estándar, Var: varianza, F<sub>calculada</sub>: valor de F de Fisher calculada como varianza de la dilución mayor/ varianza dilución menor: <sup>a</sup>1/2, 2/3, 3/4, 4/5, 5/6, 6/7, 7/8 y <sup>b</sup>1/3, 1/2, 2/4, 5/7, 6/8), nc: no calculado.

**Tabla 9.** Evaluación de la homocedasticidad de las varianzas para EE2 (n=4).

Dilución	A <sub>relativa</sub>	DE	Var	F <sub>calculada</sub> consecutiva <sup>a</sup>	F <sub>calculada</sub> interdilución <sup>b</sup>
1	0.042	0.001	1.1 x 10 <sup>-6</sup>	nc	0.33
2	0.016	0.005	2.6 x 10 <sup>-5</sup>	0.04	39.28
3	0.016	0.002	3.2 x 10 <sup>-6</sup>	8.07	50.72
4	0.013	0.001	6.5 x 10 <sup>-7</sup>	4.86	0.02
5	0.005	0.000	8.8 x 10 <sup>-8</sup>	7.42	0.00
6	0.003	0.000	2.6 x 10 <sup>-9</sup>	34.37	0.00
7	0.004	0.000	1.7 x 10 <sup>-9</sup>	1.48	0.00

EE2: 17α-Etinilestradiol, n: número de observaciones, A<sub>relativa</sub>: promedio del Área del esteroide/Área del DDE (n=4), DE: desviación estándar, Var: varianza, F<sub>calculada</sub>: valor de F de Fisher calculada como varianza de la dilución mayor/ varianza dilución menor: <sup>a</sup>1/2, 2/3, 3/4, 4/5, 5/6, 6/7, y <sup>b</sup>1/3, 1/2, 2/4, 5/7, nc: no calculado.

El valor F de tablas 3,3 fue de 15.44 con un nivel de significancia de 0.05 siendo menor que las  $F_{calculada}$  consecutiva (Varianza de la dilución mayor/Varianza de la dilución menor), por lo tanto se rechaza la hipótesis nula y se acepta que el comportamiento de las varianzas es heterocedastico (hipótesis alterna).

De acuerdo con el resultado anterior se realizó la regresión ponderada para los puntos experimentales de cada esteroide (**Anexo E**) siguiendo el procedimiento descrito por Miller y Miller (2002), esto resultados se muestran en la tabla 10.

**Tabla 10.** Pendiente y ordenada al origen ponderados de las curvas de calibración del método.

<b>Esteroides</b>	<b><math>m_w</math></b>	<b><math>b_w</math></b>
E2	0.00058	-0.0000095
EE2	0.00035	-0.000040

E2: 17 $\beta$ -Estradiol, EE2: 17 $\alpha$ -Ethinilestradiol,  $m_w$ : pendiente ponderada,  $b_w$ : ordenada al origen ponderada.

#### 4.4.5. Límites de detección y cuantificación

Los límites de detección y cuantificación se calcularon a partir de la regresión ponderada mediante las ecuaciones **F.1** y **F.3** (**Anexo F**). Los valores encontrados consideran la variabilidad y la eficiencia de cada etapa del método de análisis (**Tabla 11**) y tienen un orden de magnitud similar a los reportados previamente en otros estudios sobre agua (Wang-Hsien *et al.* 2003, Chimchirian *et al.* 2006, Zhou *et al.* 2009).

**Tabla 11.** Límites de detección y cuantificación del método (ng L<sup>-1</sup>).

<b>Esteroides</b>	<b>n</b>	<b>LDM</b>	<b>LCM</b>
E2	7	1.0	3.0
EE2	6	3.0	10

E2: 17 $\beta$ -Estradiol, EE2: 17 $\alpha$ -Ethinilestradiol, n: número de diluciones, LDM: límite de detección del método, LCM: límite de cuantificación del método.

#### **4.5. Determinación de esteroides en muestras de agua**

El análisis por CG-EM de las muestras de agua embotellada, mostró la presencia de uno o dos esteroides en cada una de las marcas y únicamente se detectaron y cuantificaron simultáneamente los dos esteroides en dos de ellas, en cuanto a las muestras del agua potable no se logró la cuantificación (**Tabla 12**). Las concentraciones encontradas fueron calculadas con la ecuación **G.1 (Anexo G)** y tienen un orden de magnitud similar a los reportados previamente por Velicu y Suri (2009) y Zhou *et al.* (2008) en aguas superficiales y por Becerril (2012) en agua de manantial.

**Tabla 12.** Concentraciones de esteroides (ng L<sup>-1</sup>) en muestras de agua.

Tipo de muestra	Número de muestra	E2 (CV) <sup>a</sup>	EE2 (CV) <sup>b</sup>	R (%) <sup>c</sup>
<b>Agua embotellada</b>	1 (I)	i.l.d.	i.l.d.	120
	2 (I)	12.8 (87.2)	37.3 (0.1)	109
	3 (II)	i.l.d.	i.l.d.	107
	4 (II)	i.l.d.	85.2 (51.8)	111
	5 (III)	i.l.d.	i.l.d.	80
	6 (III)	3.9 (0.1)	i.l.d.	74
	7 (IV)	i.l.d.	i.l.d.	72
	8 (IV)	571.0 (3.4)	185.8 (5.9)	68
	9 (V)	170.9 (2.2)	1396.6 (71.5)	132
	10 (V)	74.8 (1.5)	69.3 (0.3)	131
	11 (VI)	355.7 (0.7)	129.3 (4.9)	148
	12 (VI)	36.4 (1.4)	984.8 (57.6)	129
<b>Agua potable</b>	13	i.l.d.	i.l.d.	94
	14	i.l.d.	i.l.d.	88

I: marca uno sin lote, II: marca dos mismo lote, III: marca tres diferente lote, IV: marca cuatro mismo lote, V: marca cinco sin lote, VI: marca seis sin lote, a,b n=2, c, n=3, i.l.d: inferior al límite de detección, E2: 17 $\beta$ -Estradiol, EE2: 17 $\alpha$ -Ethinilestradiol, R (%):) porcentaje de recobro promedio basado en estándar subrogado (DDE), DE: desviación estándar, CV: coeficiente de variación

Las muestras de agua potable, a pesar de que se encontraron los dos esteroides, su cuantificación se dificultó debido a que las concentraciones quedan por debajo de los límites de detección. Si se considera que el agua de la red municipal de la zona metropolitana contiene mayor cantidad de materia orgánica, esto pudo dificultar la retención de los esteroides en la fase del cartucho y la derivatización de los mismos. Conjuntamente es posible que una buena proporción de los compuestos se encuentren en forma metabolizada, esto lo reporta Desbrow *et al.* (1998) y Chimchirian *et al.* (2006)

debido a la presencia de sales, óxidos, bases y ácidos y a la reacción que ocurre durante el tratamiento del agua. Además los procesos de tratamiento no son tan exhaustivos y eficientes como se hace con el agua comercial para su purificación. Así mismo, hay que señalar que es una representación de una muestra pequeña proveniente de un solo sitio de muestreo.

Por otra parte resulta preocupante la presencia de estos compuestos en las muestras de agua embotellada, ya que en los últimos años la población del país ha incrementado el consumo de este producto, generando que la exposición potencial a estos compuestos sea de manera directa y prolongada, convirtiéndose en un posible factor detonante de efectos adversos al sistema endocrino de las personas, que a pesar de la escasa información con la que se cuenta en cuanto a los efectos a la salud en humanos, representa un riesgo a la salud humana, ya que se tiene referencia que en especies menores, concentraciones de hasta  $1 \text{ ng L}^{-1}$  son capaces de producir cambios a nivel reproductivo y morfológico (Bila y Dezotti. 2007, Barceló y López. 2008). Por lo que resulta de gran importancia que se contemplen normativas para regular estos compuestos en este tipo de agua.

## 5. Conclusiones

-Se logró desarrollar una metodología confiable que estandarizó las condiciones en el procedimiento analítico, mismas que favorecieron el análisis químico de los disruptores endócrinos en el equipo de Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (CG-EM) para su determinación en muestras de agua embotellada e identificación en muestras de agua potable.

-La técnica de extracción en fase sólida facilitó la concentración en un volumen cerca de 200 veces más bajo que la cantidad de muestra inicial, lo cual favoreció la detección por el sistema cromatográfico.

-El acople de la cromatografía de gases a espectrometría de masas brindó información estructural que ayudó a la identificación más confiable de los esteroides derivatizados.

-La derivatización por medio de BSTFA + TMCS y la piridina, resultó ser un procedimiento que favoreció el análisis de los esteroides  $17\beta$ -Estradiol y  $17\alpha$ -Etinilestradiol por medio de la cromatografía de gases acoplado a la espectrometría de masas, ya que les proporcionó volatilidad e incrementó la estabilidad térmica de los compuestos.

-El método desarrollado cumple con los criterios de control de calidad requeridos para la determinación confiable de  $17\beta$ -Estradiol y  $17\alpha$ -Etinilestradiol en muestras de agua comercial, ya que la eficiencia del recobro, basada en el estándar subrogado, tuvo un promedio de 87 %. La repetibilidad para E2 fue de 81 a 100 % y una reproducibilidad del 90 %, en cuanto a EE2 la repetibilidad fluctuó entre 82 y 96 % mientras que la reproducibilidad alcanzó un 88 %.

-Los límites de detección y cuantificación de los dos esteroides fueron similares al orden de magnitud que las concentraciones en muestras de agua reportadas previamente.

-La aplicación del método analítico optimizado favoreció la determinación de uno o los dos esteroides en todas las muestras de agua de distintas marcas comerciales.

-Sin embargo el método no fue tan preciso para las muestras de agua potable, a pesar de haberse detectado los compuestos en las dos muestras por medio del equipo, su determinación se vio sesgada por la complejidad de la misma muestra.

-La identificación y determinación de estos compuestos en estos tipos de agua, brinda información a las autoridades y a la ciudadanía sobre los posibles riesgos a la salud y muestra antecedentes de la presencia y niveles base que podrían ser considerados en futuras acciones de control, o bien para implementar nuevas metodologías.

## **6. Recomendaciones**

-Sería recomendable en las muestras de agua embotellada probar el método analítico en diferentes volúmenes ya que las marcas comerciales cuentan con varias presentaciones.

-En las condiciones de extracción se podría mejorar el control de la presión en el momento del paso de la muestra a través de los cartuchos C<sub>18</sub> de la fase sólida, también se podrían utilizar cartuchos con mayor cantidad de fase solida a fin de comparar los resultados.

-Se podrían realizar ensayos para conocer el tiempo necesario en el secado del cartucho.

-En cuanto a la determinación en muestra de agua potable sería recomendable para disminuir el efecto de matriz de la muestra optimizar la etapa de limpieza y filtración de la misma.

-Se podría ampliar el número de muestras experimentales de agua potable así como generar muestras de referencia con rangos de concentraciones bajas, intermedias y altas y de esta manera, tener criterios de comparación para su posible determinación.

## **Perspectivas**

-Continuar con la optimización de condiciones de las etapas del método analítico para obtener límites de detección y de cuantificación menores a los obtenidos.

-Ya que la EE2 forma parte de ingrediente activo de las pastillas anticonceptivas habría que concientizar a la población acerca de la problemática ambiental y sus posibles riesgos a la salud humana, para racionar el uso y consumo de esta hormona.

-En el caso de la hormona E2, siendo un compuesto endógeno y a que la liberación al ambiente no es de forma intencionada, deberían de promoverse iniciativas para que las autoridades encargadas del tratamiento y calidad del agua, incluyan estos compuestos entre los parámetros normados y se implementen nuevos tratamientos para disminuir su presencia en agua embotellada y agua potable.

## 7. Bibliografía

Barceló D, López de Alda, M.J. (2008). Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales\_ CSIC (Barcelona). *Panel Científico-Técnico de Seguimiento de la Política de Aguas*.

Becerril J. E. (2012). Optimización de metodologías analíticas para la determinación de contaminantes emergentes en aguas de abastecimiento y residuales. *Tesis Doctoral*.

Becerril J.E. (2009). Contaminantes emergentes en el agua. *Revista Digital Universitaria DGSCA-UNAM*. 10, 1-6.

Bila D, Dezotti M\*. (2007). Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e conseqüências. *Quimica. Nova*. 30, 651-666

Bowden J, Colosi D, Mora D. (2009). Enhancement of chemical derivatization of steroids by chromatography/mass spectrometry (GC/MS). *Journal of Chromatography B*, 877, 3237-3242.

Carabias J, Landa R, Collado J, Martínez P, (2005). Agua medio ambiente y sociedad: hacia la gestión integral de los recursos hídricos en México. *Universidad Nacional Autónoma de México. El colegio de México: Fundación Gonzalo Río Arronto*. 221.

Castanheira A, P. (2010). Aplicación de membrana de nanofiltración para eliminar disruptores endocrinos en la potabilización del agua. *Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Cataluña*.

Cathum S, Sabik H. (2001). Determination of steroids and Coprostanol in surface water, effluent and mussel using gas chromatography-mass spectrometry. *Chromatographia Supplement*, 53, 394-399.

CEA: Comisión Estatal del Agua (2007). Programa hídrico visión 2030 del Estado de Jalisco. *Comisión Nacional del Agua*.

Chimchirian F, Rominder P.S, Stofey J, Helmig E, Constable R. (2006). Analysis of

levels of free and conjugated synthetic and natural estrogen hormones in water in wastewater. *Environmental Protection Agency*.

CONAGUA. (2011). Estadísticas del agua en México, edición 2011. *Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT)*.

Desbrow C, Routledge E.J, Brighty G.C, Waldock M, Sumter J.P. (1998). Identification Estrogenic Chemicals in STW Effluent 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. *Environmental Science & Technology*, 32, 1549-1558.

Ding W, Chiang C. (2003). Derivatization procedures for the detection of estrogenic chemicals by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 17, 56-63.

DOF: Diario Oficial de la Federación. (1981). Ley federal de derechos. *Secretaría de Gobernación*.

DOF: Diario Oficial de la Federación. (1984). Ley general de salud. *Secretaría de Gobernación*

DOF: Diario Oficial de la Federación. (1988). Ley general de equilibrio ecológico y protección al ambiente. *Secretaría de Gobernación*.

DOF: Diario Oficial de la Federación. (1992). Ley de aguas nacionales. *Secretaría de Gobernación*.

Falconer I. (2006). Are endocrine disrupting compounds a health risk in drinking water? *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 3, 180-184.

Filali Y, Auriol M, Adams C, Surampalli R. (2007). Quantification of steroid sex hormones using solid-phase extraction. *Water Environment Research*. 79, 687-696.

Flores A. (2012). Determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos oxigenados en las aeropartículas finas de la zona metropolitana de Guadalajara. *Tesis que para optar el título de Química Farmacéutica Bióloga. UAG*

García A. (2008). Coacervados y hemimicelas/admicelas como sistemas extractantes

de alteradores endocrinos. *Tesis doctoral. Publicaciones de la Universidad de Córdoba.*

Gil M, Soto A, Usma J, Gutiérrez O. (2012). Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. *Producción + Limpia.* 7, 52-73.

Guillete L, Uribe C. (2001). Alteraciones en el sistema reproductor de *Alligato mississippiensis* por contaminantes ambientales. *Boletín: Sociedad Mexicana Herpetológica,* 9, 1-11.

Haro J, Nubes G, Calderón R. (2012). Riesgos sanitarios en la calidad bacteriológica del Agua. Una Evaluación en diez Estados de la Republica Mexicana. *Región y Sociedad.* 3, 258- 288

Harvey P, Rush K, Cookborn A. (1999). Endocrine and Hormonal Toxicology. *John Wiley & Sons.* Reino Unido.

Higashi T, Shimada K. (2004). Derivatization of neutral steroids to enhance their detection characteristics in liquid chromatography- mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry,* 378, 875-882.

Hongxiang F, Rominder P, Chimchirian R, Helmig E, Constable R. (2007). Ultrasound-induced Destruction of low levels of Estrogen Hormones in Aqueous Solutions. *Environmental Science & Technology,* 41, 5869-5874.

Huang B, Pan X, Liu J, Fang K, Wang Y, Gao Y. (2010). New discoveries of heating effect on trimethylsilyl derivatization for simultaneous determination of steroid endocrine disrupting chemicals by GC-MS. *Chromatographia.* 71, 149-153

INEGI (2013). Estadística básica sobre medio Ambiente datos de Jalisco. *Boletín de Prensa núm. 136/13.*

Kandarakis D, Bourguignon J, Giudice L, Hausser R, Prins G, Soto A, Zoeller R, Gore A. (2009). Endocrine-disrupting, chemicals. *Endocrine Society Scientific Statement, Endocrine Reviews,* 30, 293-342.

Knapp D. (1979). Handbook of Analytical Derivatization Reactions. *John Wiley &*

*Songs*. New York.

Lide D. (2003). CRC Handbook of Chemistry and Physics. *CRC Press*, 34, 3254, 3490.

Liu Y, Guan Y, Mizuno T, Tsuno H, Zhu W. (2009). A pretreatment method for GC–MS determination of endocrine disrupting chemicals in mollusk tissues. *Chromatographia*. 69, 1/2

López M, Barceló D. (2001). Use of Solid-phase extraction in several of its modalities or sample preparation in the determination of estrogens and progestogens in sediment in water. *In Journal Chromatography*, 145-153.

Mao L, Lu J, Gao S, Huang Q. (2010). Transformation of 17 $\beta$ -Estradiol mediated by Lignin Peroxidase: The Role of veratryl alcohol. *Environmental Contamination and Toxicology*, 59, 13-19.

Markey C, Beverly S, Soto A. (2002). Endocrine disruptors: from wingspread to environmental developmental biology. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 83, 235-244.

Medina M. (2010). Diseño y estandarización de un método analítico para la determinación de disruptores endocrinos en partículas suspendidas  $\leq 2.5 \mu\text{m}$ . *Tesis que para optar el título de Química Farmacéutica Bióloga*. UNAM, México, D.F., 95 p.

Miller J, Miller J. (2002). Estadística y Quimiometría para Química Analítica. *Prentice Hall*.

Mnif W, Dagninus S, Escanda A, Pillon A, Fenet H, Gómez E, Casellas C, Dushesne M. (2010). Biological analysis of endocrine disrupting-compounds in Tunisian sewage treatment plants. *Environmental Contamination and Toxicology*, 59, 1-12.

Murillo M. (2012) Optimización de las condiciones analíticas para la determinación simultánea de *n*-alcanos, hidrocarburos aromáticos policíclicos y sus derivados oxigenados en aeropartículas menores que 2.5  $\mu\text{m}$ . *Tesis de Doctorado*. UNAM.

NOM-041-SSA1-1993. Bienes y servicios. agua purificada y envasada especificaciones sanitarias. *Secretaría de Salud (SSA)*.

Okkerman P, Groshart C. (2001). Chemical Study on Estrogens. *Ministerie van Verkeer en Waterstaat*.

Organización Mundial de la Salud. (2004). Guías para la calidad del Agua Potable. *Biblioteca de la OMS*.1, 1-101

Oropesa A. (2008). Disruptores endócrinos en el medio ambiente: Caso del 17- $\alpha$ -etinil-estradiol. *Observatorio Medioambiental*, 11, 63-76.

Porte C, Janer C, Lorusso L, Ortiz M, Cajaravile M.P. (2006). Endocrine disruptors in marine organisms: Approaches and perspectives comparative biochemistry and physiology Part C. *Toxicology & Pharmacology*, 143, 333-315.

PROFECO. (1995). Conozca la calidad de las aguas envasadas. *Revista del consumidor*.

Rivas A, Granada A, Jiménez M. (2004). Exposición humana a disruptores endocrinos. *Ecosistemas*, 13, 7-12.

Safe S, Jutooru I, Chadalapaka G. (2010). Estrogenic endocrine disruptors: Molecular characteristics and human impacts. *Comprehensive Toxicology*, 609-621.

Shareef A, Angove M, Wells J, Johnson B. (2006). Aqueous solubilities of estrone, 17 $\beta$ - Estradiol, 17 $\alpha$ - Ethynylestradiol and Bisphenol A. *Journal of Chemistry and Engineering*, 51, 879-881.

Shareef A, Angove M.J, Wells J.D. (2006). Optimization of silylation using *N*-methyl-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide, *N,O*-bis (trimethylsilyl)-trifluoroacetamide and *N*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-*N*-methyltrifluoroacetamide for the determination of the estrogens estrone and 17 $\alpha$ -ethynylestradiol by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography*. 121-128

Shin H, Oh A, Shin S. (2011). Sensitive determination of natural and synthetic steroidal hormones of a free and conjugated Form in surface water by gas chromatography-

mass spectrometry. *Bulletin of the Korean Chemical Society*. 32, 809

Stevenson M, Brown A, Montgomery T, Clotfelter T. (2010). Reproductive consequences of exposure to waterborne phytoestrogens in male fighting fish *Betta splendens*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 60, 501-510

Thurman E, Mills M. (1998). Solid phase extraction: Principles and Practice. Wiley & Sons. USA.

Torres G, Ángeles A. (2009). Factores reproductivos y cáncer de mama: principales hallazgos en América Latina y el mundo. *Salud Pública en México*. 51, 165-171.

Valle B, Mugica V, Salinas E, Amador M, Murillo M, Villalobos R, De Vizcaya A. (2010) Temporal variation of nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons in PM10 and PM2.5 collected in Northern México City. *Science of the Total Environment* 408, 5429–5438.

Vallejo R, López A. (2012). Compuestos disruptores endocrinos: Identificación y análisis en agua superficial y su degradación con procesos avanzados de oxidación utilizando ozono. *Retos de la Investigación del Agua en México*. 396-410.

Velicu M, Suri R. (2009). Presence of steroid hormones and antibiotics in surface water of agricultural, suburban and mixed-use areas. *Environmental Monitoring Assessment*. 154, 349–359.

Wolthers B.G, Kraan G.P. (1999). Clinical applications of gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry of steroids. *Elsevier Journal Chromatography*, 843, 247-274.

Ying G.G, Kookane R.S, Ru Y.S. (2002). Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environment International*. 28, 545-551

Zhang X, Gao Y, Li Q, Li G, Guo Q, Yan C. (2010). Estrogenic compounds and estrogenicity in surface water, sediments, and organisms from Yundang Lagoon in Xiamen, China. *Environmental Contamination and Toxicology*.

Zhou Y, Wang Z, Jia N. (2007). Formation of multiple trimethylsilyl derivatives in the derivatization of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol with BSTFA or MSTFA followed by gas chromatography-mass spectrometry determination. *Journal of Environmental Sciences* 19, 879–884.

Zhou Y, Zhou J, Xu Y Zha J, Ma M, Wang Z. (2009). An alternative method for the determination of estrogens in surface water and wastewater treatment plant effluent using pre-column trimethylsilyl derivatization and gas chromatography/mass spectrometry. *Environmental Monitoring Assessment*. 158, 35–49.

## 8. Anexos

### Anexo A. Preparación de disoluciones de trabajo

Para la elaboración de las soluciones madre (SM) de los esteroides se pesó en una balanza Sartorius (SE 2-F) 1, 2.7 y 2.0 mg de los compuestos 17 $\beta$ -Estradiol (E2), 17 $\alpha$ -Ethinilestradiol (EE2) y compuesto subrogado (DDE), respectivamente, se colocaron independientemente en matraces aforados y se diluyeron en 10 mL con cloruro de metileno (CM) grado HPLC (Fermont), de esta manera se obtuvieron la SM1 (E2), SM2 (EE2) y SM3 (DDE) las cuales se almacenaron a -20° C, todo esto en base a lo propuesto por Bowden *et al.* (2009).

Para la elaboración de los ensayos de derivatización, extracción en fase sólida y la curva de calibración del método se utilizaron soluciones de menor concentración, la primera de ellas fue la solución de trabajo de esteroides (STE), disolución con la mezcla de los dos esteroides preparada a una concentración de 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Para ello se tomaron volúmenes de 0.2 mL y 0.08 mL de la SM1 y la SM2, respectivamente y se diluyeron en 10 mL con CM. La siguiente fue la solución de trabajo del compuesto DDE (STD) de una concentración de 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , para lo cual se tomó un volumen de 0.25 mL de la SM3 y se diluyó en 10 mL con el mismo disolvente, almacenándose de la misma manera que las SMs (**Tabla 13**).

**Tabla 13.** Concentración de las soluciones madre y soluciones de trabajo.

Compuesto	SM (1,2,3) mg mL <sup>-1</sup>	STE $\mu\text{g mL}^{-1}$	STD $\mu\text{g mL}^{-1}$
E2	1	2	
EE2	2.7	2	
DDE	2		5

E2: 17 $\beta$ -Estradiol, EE2: 17 $\alpha$ -Ethinilestradiol, DDE: compuesto subrogado, SM: solución madre, STE: solución de trabajo de esteroides, STD: solución de trabajo del estándar subrogado DDE

## Anexo B. Disoluciones de trabajo para la curva de calibración del método

Se prepararon disoluciones de trabajo de la curva de calibración del método (STCM) para los puntos de dilución de la misma. Estas se enumeraron en 1, 2 y 3 siguiendo un orden de mayor a menor concentración.

Para la STCM1 se tomó una alícuota de 1.25 mL a partir de la STE y se diluyó en 5 mL con CM, a partir de esta solución se tomaron alícuotas de 0.2 mL para el punto 1 y 0.15 mL para el punto 2, mientras que para el punto 3 se tomaron 0.1 mL. En la preparación de la STCM2 se utilizó un volumen de 0.4 mL de la STCM1 y se diluyó en 2 mL con CM que sirvió para los puntos 4, 5 y 6 tomando alícuotas de 0.25 ,0.15 y 0.1 mL, respectivamente; y finalmente para la STCM3 se empleo un volumen de 0.2 mL de la STCM2 la cual se diluyó a 2 mL con CM, siendo empleada para las diluciones 7 y 8 utilizando 0.5 y 0.1 mL. Las concentraciones de las soluciones y de los puntos de dilución se muestran en la Tabla 14, cabe resaltar que a estos puntos de dilución se les adicionó 0.5 mL de la solución STD y se aforaron a 1 L<sup>-1</sup> con agua ultrapura.

**Tabla 14.** Puntos de dilución de la curva de calibración del método.

Dilución	STCM1 (500 ng mL <sup>-1</sup> )	STCM2 (100 ng mL <sup>-1</sup> )	STCM3 (10 ng mL <sup>-1</sup> )
1	100		
2	75		
3	50		
4		25	
5		15	
6		10	
7			5
8			1

STCM: solución de trabajo para la curva de calibración del método.

### **Anexo C. Eficiencia de la extracción y la derivatización**

Para determinar la eficiencia de las etapas que conforman el método, se evaluó el porcentaje de recuperación por medio del estándar subrogado DDE, mismo que se utilizó para monitorear todo el procedimiento, con el supuesto de, lo que le ocurriera al DDE le ocurriría a los esteroides. Para ello se preparó una solución de referencia, tomando 0.2 mL de la STD y se colocó en viales de 2 mL y se analizaron directamente en el CG-EM. Se compararon las señales analíticas de las muestras con la señal de sus respectivas referencias, determinando así el porcentaje de recobro mediante la siguiente ecuación:

$$R (\%) = (Y) / (Y_r \times F.c) \times 100 \quad \text{(Ecuación C.1)}$$

Donde:

R (%)	-porcentaje de recobro
Y	-área absoluta de la muestra
Y <sub>r</sub>	-área absoluta de referencia
F.c	-factor de corrección

## Anexo D. Evaluación de la linealidad de la curva de calibrado

**Tabla 15.** Evaluación de la linealidad de la curva de calibrado

<b>Esteroides</b>	<b><i>n</i></b>	<b><i>t</i><sub>calculado</sub><sup>*</sup></b>
E2	8	7.87
EE2	7	4.35

E2: 17β-Estradiol, EE2: 17α-Etinilestradiol, Cuando  $t_{calculado} (n) > t_{tabulado} (n-2)$  existe correlación lineal significativa entre la respuesta y la concentración con  $t_{calculado} = \frac{r\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$  y  $t_{tabulado} (n-2, 95\%) = 2.45 (n=7)$  y  $2.57 (n=6)$ .

## Anexo E. Regresión lineal ponderado.

De acuerdo a los resultados de la prueba “F de Fisher”, se obtuvo la ecuación de la recta de cada esteroide corregida por el compuesto o estándar subrogado, mediante una regresión ponderada teniendo como base el cálculo de la pendiente (**Ecuación E.1**) y la ordenada en el origen ponderada (**Ecuación E.2**).

$$m_w = \frac{\sum_i w_i x_i y_i - n \bar{x}_w \bar{y}_w}{\sum_i w_i x_i^2 - n \bar{x}_w^2} \quad \text{(Ecuación E.1)}$$

$$b_w = \bar{y}_w - m \bar{x}_w \quad \text{(Ecuación (E.2))}$$

Donde:

- |             |  |                       |
|-------------|--|-----------------------|
| $m_w$       | -Pendiente ponderada.  |                       |
| $b_w$       | -Intercepto ponderado con el eje de las ordenadas.                                   |                       |
| $w_i$       | -Factor de ponderado de la iésima dilución   | <b>(Ecuación E.3)</b> |
| $x_i$       | -Concentraciones de Esteroides corregidas por pureza y recobro (compuesto subrogado) |                       |
| $y_i$       | -Área relativa del esteroide.  |                       |
| $\bar{x}_w$ | -Centroide ponderado de “x”, dado por $\bar{x}_w = \frac{\sum_i w_i x_i}{n}$         |                       |
| $\bar{y}_w$ | -Centroide ponderado de “y”, dado por $\bar{y}_w = \frac{\sum_i w_i y_i}{n}$         |                       |
| $n$         | -Número de diluciones que forman la curva.   |                       |

$$w_i = \frac{s_i^{-2}}{\sum_i \frac{s_i^{-2}}{n}} \quad \text{Ecuación (E.3)}$$

Donde:

- |            |   |
|------------|---|
| $w_i$      | -Factor de ponderado de la iésima dilución.                     |
| $s_i^{-2}$ | -Inverso de la varianza de las áreas bajo la curva de la iésima |

dilución.

n -Número de diluciones que forman la curva.

## Anexo F. Límites de detección y cuantificación ponderados.

Una vez calculados los parámetros ponderados, se determinaron los límites de detección y cuantificación (Ecuación F.2 y F.4 respectivamente).

$$LD_i = y_B + 3S_B \quad \text{(Ecuación F.1)}$$

$$LDI = \frac{LD_i - a_w}{b_w} \quad \text{(Ecuación F.2)}$$

$$LC_i = y_B + 10S_B \quad \text{(Ecuación F.3)}$$

$$LCI = \frac{LC_i - b_w}{m_w} \quad \text{(Ecuación F.4)}$$

Donde:

$LD_i$  - Señal del instrumento significativamente diferente de la señal del blanco.

$LDI$  - Límite de detección instrumental del esteroide en  $\text{ng mL}^{-1}$ .

$LC_i$  - Señal del instrumento significativamente diferente de la señal del blanco.

$LCI$  - Límite de cuantificación instrumental del esteroide en  $\text{ng mL}^{-1}$ .

$y_B$  - Señal del blanco. Igual al valor del intercepto ponderado ( $b_w$ ).

$S_B$  - Desviación estándar de la señal del blanco. Se representa como el valor del estadístico  $S_{y/x w}$ . Se calcula con la ecuación F.5

$$S_{y/x w} = \left\{ \frac{\sum_i w_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2} \right\}^{\frac{1}{2}} \quad \text{(Ecuación F.5)}$$

Donde:

$S_{y/x w}$  - estadístico estima los errores aleatorios en dirección y

$\Sigma i$	-sumatoria
$w_i$	-Factor de ponderado de la iésima dilución
$y_i$	-Área relativa del esteroide
$\hat{y}_i$	-Valores de “y” ajustados y calculados con los valores individuales de x, se calcula de acuerdo con la ecuación <b>F.6</b>

$$\hat{y}_i = (x_i \times m_w) + b_w \quad \text{(Ecuación F.6)}$$

Donde:

$\hat{y}_i$	-Valores de “y” ajustados y calculados con los valores individuales de x,
$x_i$	-Concentraciones de Esteroides corregidas por pureza y recobro (compuesto subrogado)
$m_w$	-Pendiente ponderada.
$b_w$	-Intercepto ponderado con el eje de las ordenadas.

## Anexo G. Determinación de las concentraciones de esteroides en agua.

$$C \text{ (ng L}^{-1}\text{)} = \frac{[(Y_i \text{ corregida por } Y_{ib} \times \text{Concentración corregida por Recobro}) / R \text{ (\%)}]}{\text{en } M_{\text{experimental}}] \times R \text{ (\%)} \text{ en } M_{\text{referencia}} \times 100$$

**(Ecuación G.1)**

La concentración corregida por recobro fue dada por:

$$C = \text{Concentración en } M_{\text{referencia}} \times \text{Volumen de aforo} / \text{Recobro}$$

**(Ecuación (G.2))**

El área relativa corregida por blanco de campo fue dada por:

$$\text{Área relativa corregida por blanco} = Y_i - Y_{ib}$$

**(Ecuación (G.3))**

Donde:

C (ng L<sup>-1</sup>)                      -concentración en nanogramos por litro

Y<sub>i</sub>                                      -área relativa del compuesto esteroide.

Y<sub>ib</sub>                                      -área relativa del blanco

M<sub>experimental</sub>                      -muestra experimental

M<sub>referencia</sub>                              -muestra de referencia (100 ng L<sup>-1</sup>)

R (%)                                      -porcentaje de recobro