



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

**"CUANTIFICACIÓN DE 17β -ESTRADIOL PROVENIENTE DE
EFLUENTES HOSPITALARIOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS
DE ALTA RESOLUCIÓN Y DETERMINACIÓN DE CINÉTICA DE
DEGRADACIÓN"**

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICAS**

PRESENTA:

Q.F.B. ARIANA NIETO HERNÁNDEZ

DIRIGIDO POR:

DR. JORGE JAVIER RAMÍREZ GARCÍA

DR. JOSÉ LUIS GALLEGOS PÉREZ

DR. ARTURO COLÍN CRUZ



TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO, ENERO DE 2014



UAEM | Universidad Autónoma
del Estado de México

3° (EV. DE GRADO)
OFICIO NO 007/2014

Toluca, México, 08 de enero de 2014

P. DE MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS
ARIANA NIETO HERNANDEZ
FACULTAD DE QUIMICA
P R E S E N T E

La que suscribe Directora de la Facultad de Química, dependiente de la Universidad Autónoma del Estado de México, comunica a Usted que el Jurado de su Evaluación de Grado estará formado por:

Dr. Arturo Colín Cruz
PRESIDENTE

Dr. Jorge Javier Ramírez García
SECRETARIO

Dr. Armando Ramírez Serrano
PRIMER VOCAL

M. en C.A. María Magdalena García Fabila
SEGUNDO VOCAL

Dr. Francisco Granados Correa
TERCER VOCAL

Dra. Edith Erielia Gutiérrez Segura
SUPLENTE

Dra. Araceli Amaya Chávez
SUPLENTE

FIRMA

ATENTAMENTE
PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO
"2014, 70 Aniversario de la Autonomía/ICLA-UAEM"

M. en A.P. **GUADALUPE OFELIA SANTAMARIA GONZALEZ**
DIRECTORA



U. A. E. M.
FACULTAD DE QUIMICA
DIRECCION



c.c.p. Archivo

www.uaemex.mx

Facultad de Química • Paseo Colón Esq. Paseo Tollocan • Toluca Estado de México
Tel. y Fax: 217-5109 y 217-3890 • fquim@uaemex.mx

Agradecimientos

Agradezco en primer lugar a Dios por estar siempre en cada paso de mi vida, por darme valor y fortaleza para enfrentar todas las pruebas que la vida me presenta y darme la confianza día a día para continuar.

A mis padres Sergio y Araceli, por ser mis guías, quienes me han brindado todo su amor y apoyo incondicional en todo momento.

A mi hermano Sergio por su cariño, por compartir tantos momentos conmigo, por escucharme y mostrarme su solidaridad.

A mi amiga Adriana por estar a mi lado en la maestría, por concederme la oportunidad de conocerla y brindarme su cariño, por compartir tus conocimientos, y apoyarme en toda situación.

A mi amiga Samantha, por su apoyo en los muestreos de agua residual y compartir parte de tu tiempo conmigo, afecto y solidaridad.

A mis amigos, cada uno con diferente significado por ayudarme a salir adelante y quererme por lo que soy al trasmitirme su alegría y confianza.

Al Dr. Jorge Javier Ramírez García por brindarme su amistad, consejos, conocimientos y apoyo en la elaboración en este trabajo.

Al Dr. José Luis Gallegos y Dr. Arturo Colín por la colaboración en este trabajo al transmitirme sus conocimientos y sugerencias para la mejora del mismo.

A CONACYT por la beca otorgada durante el periodo del trabajo de investigación.

Al proyecto de la UAEM con clave de registro 3413/2013CHT por el apoyo a la realización de este trabajo

ÍNDICE GENERAL

<i>RESUMEN</i>	11
<i>ABSTRACT</i>	13
1. <i>INTRODUCCIÓN</i>	15
2. <i>ANTECEDENTES</i>	18
2.1 Hormonas en el medio ambiente acuático	19
2.2 Cloración como tratamiento de agua residual	22
2.3 El 17 β -estradiol y sus metabolitos	23
2.4 Degradación de hormonas en el ambiente	24
2.5 Fotodegradación de hormonas	25
2.6 Contaminación hospitalaria	27
2.7 Métodos de extracción de hormonas en agua residual	27
2.8 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución	30
2.9 Identidad de 17 β -estradiol	32
2.10 Técnicas de detección y monitoreo de hormonas	34
2.11 Validación del método analítico	37
2.12 Eliminación y tratamiento	39
3. <i>JUSTIFICACIÓN</i>	41
4. <i>HIPÓTESIS</i>	42
5. <i>OBJETIVOS</i>	43
5.1 General	43
5.1.1 Específicos	43
6. <i>METODOLOGÍA</i>	45
6.1 Metodología analítica	45
6.2 Gestión para el muestreo	46
6.3 Caracterización de 17 β -estradiol	46
6.4 Condiciones cromatográficas	46
6.5 Extracción de la muestra	47

6.6 Validación del método analítico	48
6.7 Muestreo de agua residual	49
6.8 Degradación de 17 β -estradiol.....	50
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
7.1 Artículo científico.....	53
RESULTADOS NO PUBLICADOS	74
7.2 Gestión del muestreo.....	74
7.3 Caracterización de 17 β -estradiol	75
7.4 Espectro de UV-visible de 17 β -estradiol.....	77
7.5 Adecuabilidad del sistema, evaluación de columnas	79
7.6 Validación del sistema analítico	80
7.7 Degradación de 17 β -estradiol por luz UV y luz solar por cromatografía de líquidos de alta resolución.....	88
7.8 Recobro por extracción en fase sólida en muestras de agua desionizada.....	90
7.9 Porcentaje de recobro de muestras de agua residual mediante extracción en fase sólida	91
7.10 Cromatogramas de muestras de agua residual de la planta de tratamiento del Hospital de Ginecología y Obstetricia enriquecidas con 17 β -estradiol	92
7.11 Análisis estadístico (ANOVA)	93
8. CONCLUSIONES	97

Índice de tablas

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del 17 β -estradiol	24
Tabla 2. Métodos de extracción en fase sólida de hormonas	29
Tabla 3. Condiciones cromatograficas para la determinación de 17 β -estradiol	47
Tabla 4. Extracción de la muestra en fase sólida	48
Tabla 5. Determinación del pH de 17 β -estradiol en solución	75
Tabla 6. Grupos funcionales de 17 β -estradiol	76
Tabla 7. Parámetros cromatográficos para la optimización del método analítico	79
Tabla 8. Linealidad del sistema analítico	81
Tabla 9. Verificación del límite de detección y de cuantificación	82
Tabla 10. Verificación de la linealidad del sistema	83
Tabla 11. Evaluación de la exactitud del sistema analítico	84
Tabla 12. Robustez del sistema analítico de 17 β -estradiol	85
Tabla 13. Precisión del sistema de 17 β -estradiol	87
Tabla 14. Precisión intermedia del sistema cromatógrafico	88
Tabla 15. Porcentaje de recobro de muestras de agua desionizada a diferentes concentraciones de 17 β - estradiol	90
Tabla 16 . Porcentaje de recobro en muestras de agua residual mediante extracción en fase sólida	91
Tabla 17. Concentraciones de afluente y efluente de agua residual de un hospital	93
Tabla 18. Parámetros de validación evaluados	97

Índice de figuras

Figura 1. Puntos de ataque del cloro al estradiol	22
Figura 2. Resumen de la fotodegradación de E2 tras la excitación de UV. Etiquetas de pico referido al cromatograma de CG/EM	26
Figura 3. Metodología analítica general	45
Figura 4. Validación del método analítico	49
Figura 5. Planta de tratamiento de agua residual del Hospital de Ginecología y Obstetricia	50
Figura 6. Oficio emitido por el Comité de Enseñanza y Aprendizaje del Hospital de Ginecología y Obstetricia	74
Figura 7. Espectro de infrarrojo de 17 β -estradiol	76
Figura 8. Espectro de 17 β -estradiol UV-visible	78
Figura 9. Cromatograma de 17 β -estradiol con tiempo de retención 2.144 min	80
Figura 10. Representación de la concentración vs área (linealidad)	81
Figura 11. Degradación de 17 β -estradiol por luz solar	89
Figura 12. Degradación de 17 β -estradiol por luz UV	89
Figura 13. Cromatograma del efluente adicionado con el estándar de 17 β -estradiol con un tiempo de retención de 2.117	92
Figura 14. Cromatograma del afluente adicionado con el estándar de 17 β -estradiol con un tiempo de retención de 2.113	92
Figura 15. Gráfica de cajas y bigotes comparando luz solar y luz UV	95
Figura 16. Gráfica de barras de error de la degradación de 17 β -estradiol comparando la luz solar y luz UV	96

NOMENCLATURA

APCI	Ionización química a presión atmosférica
BPA	Bisfenol A
DAD	Detección por Arreglo de Diodos
EDAR	Efluentes De Aguas Residuales Urbanas
EDC	Disruptores Endocrinos
ESI	Ionización por Electrospray
E₂	17 β -estradiol
E₁	Estrona
E₃	Estriol
EE₂	Etinilestradiol
F	Valor de la distribución de Fisher asociado a una confianza del 5% y a grados de libertad (gl) establecidos
gl	Grados de Libertad
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
CLAR-EM	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución Acoplada a Espectrometría de Masas
K_{ow}	Coeficiente de partición octanol/agua
Kg	Kilogramos
L	Litros
LC	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección
mg	Miligramos
mg/día	Miligramo día
min	Minuto (s)

µg/ L	Microgramos por litro
EM	Espectrometría de masas
ng/L	Nanogramos por litro
NG	Norgestel
nm	Nanómetro
NMX	Norma Mexicana
NOM	Norma Oficial Mexicana
NOR	Noretindrona
pH	-logaritmo de la actividad de los iones hidronio
pg/L	Picogramos por litro
r²	Coefficiente de determinación
% DER	Porcentaje de desviación estándar relativa
DE	Desviación Estándar
S/R	Relación señal/ruido

RESUMEN

RESUMEN

En este trabajo de investigación se efectuó la determinación de 17β -estradiol en el afluente y efluente de una planta de tratamiento de agua residual de un hospital, la metodología incluye una extracción en fase sólida para la recuperación del analito en la muestra empleando el cartucho Oasis HLB, posteriormente se procedió a la cuantificación de esta hormona por un método analítico desarrollado por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución validado, el cual se basó en la separación de la hormona utilizando la columna cromatográfica Symmetry C18 3.0x250 mmx5 μ m Waters con detección UV a 280 nm para lo cual se empleó una fase móvil compuesta por acetonitrilo: agua en proporción 60:40 con 0.1% de ácido fórmico. La curva de calibración de 17β -estradiol se realizó en un rango de 100 μ g/L-5000 μ g/L, mostrando una linealidad con un coeficiente de determinación igual a 0.9997. El límite de detección fue de 50 μ g/L y el límite de cuantificación de 100 μ g/L. El método analítico resultó lineal, preciso, específico y exacto en el desarrollo de su validación en el intervalo de las concentraciones estudiadas. Para la cuantificación de 17β -estradiol en el agua residual del hospital, se realizaron 11 muestreos semanales en los meses comprendidos de abril a junio del 2013. El analito se extrajo y concentró a través de cartuchos Oasis HLB. El promedio de los recobros obtenidos para el afluente fueron de 82.66%-104.52% y del efluente de 86.57-99.25%. La cuantificación por CLAR mostró la presencia de 17β -estradiol con niveles de concentración en el afluente de 18.81-60.57 μ g/L y en el efluente de 5.29-54.63 μ g/L.

También se realizó la degradación de 17β -estradiol con una solución de una concentración de 10 mg/L expuesta a luz UV utilizando dos lámparas de Hg de 15 watts (254 nm) y luz solar con periodos de luz y oscuridad, estableciendo su cinética de degradación y tiempo de vida media por cromatografía de líquidos de alta resolución durante un periodo de 9 días. Para ambos tipos de radiación, los datos obtenidos se ajustaron a una cinética de primer orden, con un tiempo de vida media de 165.035 horas para luz solar y de 198.042 horas para luz UV. Se determinó mediante un análisis de varianza que existían diferencias significativas entre la luz solar y la luz UV, de igual forma el tiempo de exposición fue un factor que influyó en este resultado, con un nivel de confianza de 95%.

ABSTRACT

ABSTRACT

In this research was conducted the determination of 17β -estradiol in the influent and effluent of a wastewater treatment plant from a hospital, the methodology involves an extraction in solid phase using a cartridge Oasis HLB then proceeded to quantification of this hormone by an analytical method validated developed by Liquid Chromatography High Resolution which was based on the separation of hormone using the chromatographic column Symmetry C18 $3.0 \times 250 \text{ mm} \times 5 \mu\text{m}$ Waters with UV detection at 280 nm which was used a mobile phase consisting of acetonitrile: water 60:40 with 0.1 % formic acid. Calibration curve of 17β -estradiol was carried out in a range of $100\mu\text{g/L}$ - $5000 \mu\text{g/L}$, showing a linearity determination coefficient equals 0.9997. Detection limit was $50 \mu\text{g/L}$ and quantification limit $100 \mu\text{g/L}$. The analytical method was linear, precise, specific and accurate in the development of validation within the range of concentrations studied.

For quantification of 17β -estradiol in wastewater hospital, were performed 11 samplings weekly in a period from April to June 2013. Analyte was extracted and concentrated by Oasis HLB cartridge. The average recoveries obtained from influent were between 82.66 % -104.52 % and 86.57-99.25 % to effluent. Quantification by HPLC showed the presence of 17β -estradiol concentration levels in the influent of 18.81 - $60.57 \mu\text{g/L}$ and in the effluent of 54.63 - $5.29 \mu\text{g/L}$.

Degradation of 17β -estradiol also was performed with a solution of a concentration of 10 mg /L , exposed to UV light using two mercury lamps of 15 watts (254 nm) and sunlight with periods of light and darkness, setting kinetics degradation and half-life for high performance liquid chromatography during a period of 9 days. For both cases, the data was fitted to first order kinetics with a half-life time of 165.035 hours for sunlight and 198.042 hours to UV light was determined by an analysis of variance if existed significant differences between sunlight and UV light, just as the exposure time is a factor influencing in this result, with a confidence level of 95 %.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, se ha prestado una mayor atención a los contaminantes no regulados, que pueden ser candidatos para la futura regulación en función de la investigación de sus potenciales efectos para la salud, los cuales son conocidos como contaminantes emergentes (Verlicchi *et al.*, 2010), en este grupo de contaminantes se encuentran los disruptores endocrinos que están recibiendo una creciente atención de la comunidad científica, agencias regulatorias y el público en general, estos han demostrado que interfieren con las funciones normales del sistema endocrino, lo que afecta la reproducción y desarrollo en la vida silvestre y los seres humanos (Sun *et al.*, 2009).

Dentro de los disruptores endocrinos se encuentran las sustancias estrogénicas, las cuales se han estudiado en ambientes acuáticos, se ha investigado la presencia de estrógenos en aguas residuales y aguas superficiales. Los estrógenos naturales (estrón y 17β -estradiol), así como el estrógeno sintético 17α -etinilestradiol, fueron identificados como compuestos responsables de actividades estrogénicas en los efluentes de las EDAR (Chang *et al.*, 2011), los efluentes de los hospitales, así como las excreciones (orina y heces), siendo fuentes importantes de estos compuestos.

En este trabajo de investigación se realizó la cuantificación e identificación de 17β -estradiol en muestras de agua residual de un hospital con la validación de una metodología analítica, basada en Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) para el monitoreo de 17β -estradiol presente en muestras de agua residual de un hospital de la Ciudad de Toluca.

Se presenta la evaluación de la degradación de 17β -estradiol en muestras de agua desionizada adicionando el estándar de la hormona con dos tipos de radiación luz UV y luz solar.

Por lo cual el contenido de este trabajo se ha dividido de la siguiente manera: antecedentes, objetivos, hipótesis, justificación, metodología, resultados y discusión: consiste en el artículo de investigación desarrollado durante este trabajo y los resultados no publicados.

Se determinó la degradación de 17β -estradiol mediante luz solar y luz UV, con un tiempo de vida media de 165.035 horas con luz solar y luz UV de 198.042 horas y su cinética de degradación, siendo esta de primer orden al evaluar los dos tipos de fotodegradación, estadísticamente se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con el programa SPSS, el cual indicó que existen diferencias significativas a un nivel de significancia de 5% entre los 2 tipos de radiación utilizados.

De la misma forma se muestra la validación de la metodología analítica para la determinación de la hormona, presentó parámetros adecuados de exactitud, precisión, precisión intermedia y linealidad en un rango de 100-5000 $\mu\text{g/L}$. De acuerdo con la ICH (guías Q2A y Q2B), cumple con las especificaciones.

Las concentraciones encontradas fueron de 81- 60.57 $\mu\text{g/L}$ para el afluente y de 54.63 -5.29 $\mu\text{g/L}$ del efluente del hospital.

ANTECEDENTES

2. ANTECEDENTES

La presencia de hormonas esteroidales en el medio acuático está recibiendo una mayor atención debido a que pueden interferir en el funcionamiento normal del sistema endócrino de los seres humanos y animales (Zheng *et al.*, 2008). Estas hormonas pertenecen a tres familias diferentes: estrógenos (estrona, E1, α -estradiol, α E2, 17β -estradiol E2; estriol, E3), andrógenos (testosterona, T), y progestágenos (progesterona, Pg) (Combalbert *et al.*, 2012); son utilizadas como productos farmacéuticos en la práctica clínica humana y veterinaria, también pueden ser excretadas por los seres vivos de forma endógena (Zheng *et al.*, 2008), en cantidades diferentes, en función de la edad, el estado de salud, la dieta o el embarazo.

Estas hormonas son predominantes en la mujer, las cuales son importantes para mantener la salud de los tejidos reproductivos, los senos, la piel y el cerebro, mientras que el etinilestradiol es un esteroide sintético, utilizado como anticonceptivo (Silva *et al.*, 2012); se les ha considerado contaminantes ambientales, incluso a niveles tan bajos de nanogramos por litro (ng/L) pudiendo afectar negativamente a la reproducción en una amplia variedad de especies acuáticas, que se pueden transferir a la superficie del agua mediante la descarga de aguas residuales municipales tratadas o por la escorrentía de las operaciones agrícolas; la aplicación de lodo digerido a las aguas residuales municipales y a los campos agrícolas también puede ser una vía importante de transferencia de hormonas al suelo y al agua subterránea (Trinh *et al.*, 2011).

Algunos estudios indican que el 17α -etinilestradiol (EE2), 17β -estradiol (E2) y sus metabolitos, estrona (E1) y estriol (E3) se han detectado en niveles de ng/L en agua natural, en los afluentes y efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales (Chen *et al.*, 2007).

Su aparición en concentraciones detectables en el medio ambiente ha logrado captar la atención tanto del sector público como de la comunidad científica (Xuan *et al.*, 2008).

Otras investigaciones han demostrado que en los efluentes de varias plantas de tratamiento de aguas residuales y ríos de los Estados Unidos, la cantidad encontrada de estas hormonas es

suficiente para inducir efectos perjudiciales en los peces, también se ha demostrado que en las zonas contaminadas las aves, reptiles y mamíferos sufren alteraciones del sistema endócrino (Auriol *et al.*, 2008).

Respecto a las hormonas, 17 β -estradiol y estrona, prevalece una preocupación importante, debido a que ejercen efectos fisiológicos en concentraciones más bajas que otras hormonas esteroidales y se detectan en concentraciones por encima de su nivel mínimo de efecto observable. Se ha informado que la exposición de estrógenos a niveles tan bajos como 1 ng/L es suficiente para causar feminización de la trucha macho (Xuan *et al.*, 2008).

2.1 Hormonas en el medio ambiente acuático

En los últimos años, la detección, eliminación e investigación del destino de hormonas sexuales, en el medio ambiente, especialmente en ecosistemas acuáticos, es un tema prioritario para la química ambiental (Bodzek y Dudziak, 2006).

Los esteroides y sus metabolitos son constantemente vertidos en el medio ambiente debido a su eliminación incompleta en plantas de tratamiento de aguas residuales o a la excreción. Por lo tanto, es necesario desarrollar un método sensible y fiable para analizar diferentes clases de estos compuestos en el agua superficial, aguas residuales y lodos de muestras con el fin de evaluar su potencial impacto ambiental (Liu *et al.*, 2011).

Se han detectado en los efluentes de las aguas residuales y aguas superficiales, así como en aguas subterráneas en varios niveles, su comportamiento y destino en el medio ambiente depende de sus propiedades fisicoquímicas, la solubilidad en agua y el coeficiente de partición octanol/agua (K_{ow}), estos parámetros son clave para determinar su destino en el medio ambiente, otros aspectos que también influyen son la temperatura, la presión y pH (Silva *et al.*, 2012).

Son excretadas por los seres humanos y animales, en el medio ambiente pueden introducirse por el vertido de efluentes de agua residual (Koh *et al.*, 2007); siendo los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales una de las principales fuentes de estrógenos en el

medio ambiente acuático, su degradación durante el tratamiento de aguas residuales y su posterior carga en las aguas naturales receptoras es variable, dependiendo del tipo de tratamiento aplicado, el tiempo de residencia hidráulica, el tiempo de retención de lodos y otros factores operacionales (Pereira *et al.*, 2011).

Las plantas de tratamiento de aguas residuales y la escorrentía de las tierras de cultivo son consideradas fuentes principales para la entrada de hormonas al medio ambiente. El metabolismo humano y animal conjuga las hormonas antes de la excreción, mientras que las bacterias presentes en las aguas residuales dentro de sus instalaciones de tratamiento pueden desconjugarlas (Esperanza *et al.*, 2007).

Los estrógenos una vez conjugados se excretan, como estrógenos libres o estrógenos sulfatados conjugados. Los estrógenos conjugados pueden ser fácilmente desconjugados para producir estrógenos libres y activos, siendo los estrógenos libres capaces de someterse a transformaciones reversibles, también se hidrolizan fácilmente en plantas de tratamiento de aguas residuales, aunque en formas sulfatadas son más recalcitrantes que glucoronizadas y los bajos niveles de estrógenos sulfatados conjugados, se pueden encontrar en los efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales y aguas receptoras (Hutchins *et al.*, 2007).

En las vías pluviales, pueden absorberse en los sedimentos, donde los estrógenos y progestágenos pueden persistir durante largos períodos de tiempo, se han analizado y cuantificado en diferentes matrices ambientales: principalmente en diversas fuentes de agua y en menor medida en lodos, sedimentos y suelos, probablemente debido a la complejidad de estas matrices (Yin *et al.*, 2002).

Se ha informado que la presencia de hormonas esteroidales en las aguas residuales municipales y su destino en las plantas de tratamiento de aguas residuales empezó a estudiarse en la década de 1990; estos estudios fueron principalmente confinados a cuantificaciones de estrógenos derivados de seres humanos en aguas residuales crudas y tratadas y su biodegradabilidad durante el tratamiento biológico convencional de aguas residuales, las concentraciones de hormonas varían de unos pocos ng/L a µg/L principalmente (17β-estradiol, estrona, estriol) que provienen de efluentes de agua residual (Khanal *et al.*,

2006), los cuales llegan al medio acuático conteniendo este tipo de compuestos debido a que no son totalmente removidos o degradados por agentes químicos, físicos y procesos de tratamiento biológico dentro de las plantas (Liu *et al.*, 2011).

Los estrógenos naturales y sintéticos E1 y E2 se han detectado con mayor frecuencia; las concentraciones media/mediana en los efluentes de las aguas residuales se encuentran en un intervalo de 20-55 ng/L para E1 y de 9-20 ng/L para E2. Mientras que en aguas superficiales las concentraciones reportadas en los últimos años para estos dos estrógenos han oscilado entre 0.7 y 143 ng/L para E1 y entre 1.4 y 34 ng/L para E2 (Pereira *et al.*, 2011).

En los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales y aguas superficiales, las concentraciones varían desde pg/L a ng/L (Beck *et al.*, 2005); se determinaron los niveles de los progestágenos, noretindrona (Nor) y norgestrel (NG) que fueron de 224 ng/L y 126 ng/L, respectivamente (Streck, 2009). De acuerdo a su dilución, las concentraciones encontradas generalmente van desde no detectadas a unos pocos ng/L, para estrona, 17 β -estradiol, estriol y 17 α -etinilestradiol (Janex-Habibi *et al.*, 2009).

En el agua potable persisten compuestos estrogénicos si su concentración es muy alta en fuentes de agua debido a una incompleta eliminación con tratamientos convencionales. La presencia de importantes niveles de estrógenos en los ríos, lagos, etc., puede ser un riesgo potencial para el ambiente y en el futuro para los seres humanos, debido a los efectos sinérgicos (Gañán *et al.*, 2013).

Se ha estimado que más del 99% de la actividad estrogénica en los efluentes de agua residual y agua superficial puede atribuirse a la presencia de 17 β -estradiol (E2) y 17 α -etinilestradiol (EE2) en un intervalo de concentraciones de ng/L. Estudios de exposición a estas hormonas indican en los peces la presencia de cambios en los biomarcadores para estrogénicidad en concentraciones de relevancia ambiental de ng/L (E2) y tan bajas como 0.1 ng/L para EE2 (Koh *et al.*, 2007).

2.2 Cloración como tratamiento de agua residual

El cloro es un fuerte oxidante usado como desinfectante para residuos y para el tratamiento de agua potable y/o para mantener una desinfección residual en la distribución de canalizaciones de agua potable, presente como HOCl y OCl⁻ es capaz de reaccionar con productos químicos (Pereira *et al.*, 2011).

Varios estudios mostraron que el 17 β -estradiol y el etinilestradiol reaccionan rápidamente con HClO y se eliminan por completo, sin embargo, hay varios subproductos formados clorados, de los cuales algunos pueden producir carcinogenicidad y/o mutagenicidad, por lo tanto, es importante identificar los productos de reacción de los disruptores endocrinos con cloro disponible y sus actividades estrogénicas asociadas (Auriol *et al.*, 2008).

Se ha estudiado la presencia de derivados clorados de estrona en el efluente de las plantas de tratamiento y su comportamiento al reaccionar con cloro acuoso; la estrona se ha detectado de 10-100 veces en cantidades mayores que el estradiol en agua del medio ambiente, debido a que se oxida rápidamente con ácido hipocloroso, los derivados clorados de estrona tienen una mayor actividad que los disruptores endocrinos artificiales tales como BPA (Zwiener y Richardson, 2005). Los subproductos de la cloración de 17 β -estradiol (E2, una hormona natural) que han sido identificados son el 2,4-dicloro-17 β -estradiol, monocloroestrona, 2,4-dicloroestrona y cuatro subproductos formados por la división del anillo entre las posiciones 9 y 10 y 16 y 17. Estos son posibles debido a que el 17 β -estradiol contiene átomos de carbono activados adecuados para el ataque nucleofílico del cloro. En la Figura 1 se muestra los puntos de ataque del cloro al 17 β -estradiol para la formación de productos clorados en presencia de este ion.

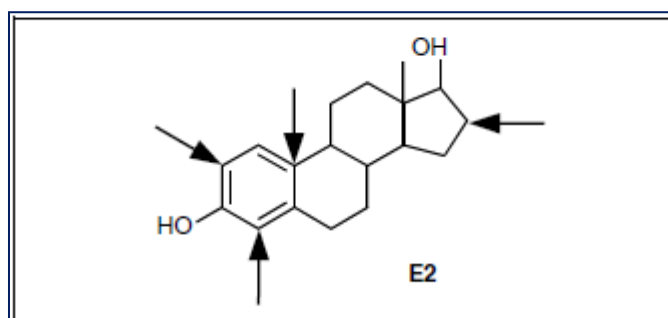


Figura 1. Puntos de ataque del cloro al 17 β -estradiol (Giger, 2009)

Se ha reportado que la estrogenicidad en aguas desinfectadas puede ser inducida principalmente por 2,4-dicloro-E2 (2,4-dicloro-17 β -estradiol) y 2,4-dicloro-E1 (2,4-dicloro-estrone). Se observó que el 4-cloro-E2 produce una actividad estrogénica similar a la estrone. El 2,4-dicloro-E2 presentó una actividad estrogénica aproximadamente 40% más débil que el 4-cloro-E2; y para el caso del dicloro-estrone se observó que tenía una actividad menor que el dicloro-estradiol (Pereira *et al.*, 2011).

2.3 El 17 β -estradiol y sus metabolitos

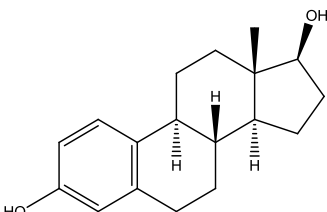
El estradiol, químicamente 1, 3,5 (10)-estratrien-3, 17 β -diol es el estrógeno más potente dentro de un grupo de esteroides estrógenos endógenos que incluyen la estrone y el estriol. Esta hormona es responsable del crecimiento de cáncer de mama y epitelio reproductivo, la maduración de huesos largos y el desarrollo de características sexuales secundarias. El estradiol y sus ésteres semi-sintéticos son principalmente utilizados como hormonas para la menopausia (Havlikova *et al.*, 2006).

Las mujeres embarazadas y durante el periodo de menstruación son los dos grupos más importantes que contribuyen a la excreción de esta hormona, excretando 1076 y 13.42 mg/d de su metabolito E1 (estrone), de 308 y 4.66 mg/d E2 (estradiol) en la orina, mientras que 100 y 0.3 mg/d de E1, 202 y 0.2 mg/d de E2 en las heces (Xu *et al.*, 2012).

Esta hormona es la más importante ya que tiene un efecto estrogénico menor a un nivel de ng/L, por lo tanto es responsable de interrumpir una parte principal de efectos significativos de disruptores endocrinos observados en el medio acuático (Chen y Hu, 2009).

En la Tabla 1 se describen las propiedades principales de 17 β -estradiol, tales como: fórmula estructural, peso molecular, punto de fusión, solubilidad en agua y coeficiente de partición octanol/agua.

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de 17β-estradiol

17 β-estradiol	
Formula estructural	
Peso molecular	272.39 g/mol
Punto de fusión	178-179
Solubilidad (H ₂ O)	12.96 mg/L
Log Kow	3.94

(Beck *et al.*, 2008)

Los metabolitos provenientes del metabolismo de 17β-estradiol en seres humanos y animales es mediante la oxidación rápida de esta hormona a estrona, que puede convertirse posteriormente a estriol, el producto mayoritario de excreción. Muchos otros metabolitos polares se forman como la 16-hidroxi-estrona, de 16 cetoestronea o 16-epiestriol , pueden estar presentes en la orina y las heces (Yin *et al.*, 2002).

2.4 Degradación de hormonas en el ambiente

Una vez que los estrógenos y los progestágenos se han incorporado en los cuerpos de agua, una serie de procesos (por ejemplo, la fotólisis, la biodegradación y la adsorción a los sedimentos) pueden contribuir a su eliminación. Es esencial caracterizar los procesos de degradación y la sorción de hormonas esteroidales para evaluar su distribución en el medio ambiente, su persistencia e importancia ecológica en los sistemas terrestres y acuáticos (Kuster *et al.*, 2004). Respecto a las hormonas pertenecientes a los estrógenos se ha documentado que menos del 10 % se eliminan a través de los procesos de biodegradación.

Aunque una cantidad considerable de hormonas se absorbe en lodos, la mayoría de los compuestos solubles permanecen en el efluente. Sin embargo, no se ha podido determinar si los mecanismos de biodegradación o absorción son los más importantes para eliminar estos

compuestos, es necesario contar con una mayor información sobre estos mecanismos para mejorar el tratamiento de los sistemas existentes y desarrollar nuevas estrategias para su eliminación de las aguas residuales y los lodos (Auriol *et al.*, 2008).

Sus tasas de degradación ayudan a determinar su impacto ambiental y amenaza a la vida acuática debido a su gran potencial biológico y tóxico (Chowdhury *et al.*, 2011).

La degradación de los estrógenos esteroidales se cree que es microbiológicamente mediada, con la desconjugación de estrógenos sulfatados y glucuronizados y la oxidación de E2 y EE2 en E1, así como de las transformaciones esenciales (Atkinson *et al.*, 2012).

2.5 Fotodegradación de hormonas

El tiempo de la degradación de las hormonas esteroidales en el ambiente puede variar desde unas pocas horas a meses, lo cual está en función de diversos parámetros ambientales; los procesos de degradación en el medio ambiente están dados por factores abióticos y bióticos, en los procesos abióticos se encuentra la fotodegradación por irradiación solar que es un factor muy importante para determinar su destino final en el medio acuático; su fototransformación puede ocurrir a través de fotólisis directa o indirecta, la fotólisis directa es el resultado de la absorción de luz por los contaminantes causando su degradación molecular que es crucial para la fotodegradación de estrógenos esteroidales en el medio acuático (Chowdhury *et al.*, 2011). Los estrógenos esteroidales presentan una absorbancia considerable en luz solar en el espectro ultravioleta y la región azul (290-360 nm), se cree que la fotólisis directa desempeña un papel crucial para su fotodegradación en ambientes acuáticos (Chowdhury *et al.*, 2011). Los fotoproductos iniciales generados de la degradación de estos compuestos son muy poco solubles en agua, lo cual dificulta su análisis. Estudios en el laboratorio muestran que las hormonas 17β -estradiol y 17α -etinilestradiol expuestas a luz natural se degradan en aguas de río, presentando una vida media menor a 10 días bajo 12 horas de luz solar por día, su fototransformación también ha sido estudiada mediante radiación UV (Mazellier *et al.*, 2008).

Ha sido efectuada la fototransformación del 17β -estradiol y 17α -etinilestradiol con radiación UV (ya sea utilizando una lámpara monocromática de mercurio de baja presión a 254 nm o

con una lámpara policromática de mercurio de mediana presión) (Mazellier *et al.*, 2008). De acuerdo a información documentada de espectrometría de masas, se propone un esquema general de la degradación de E2, ver Figura 2.

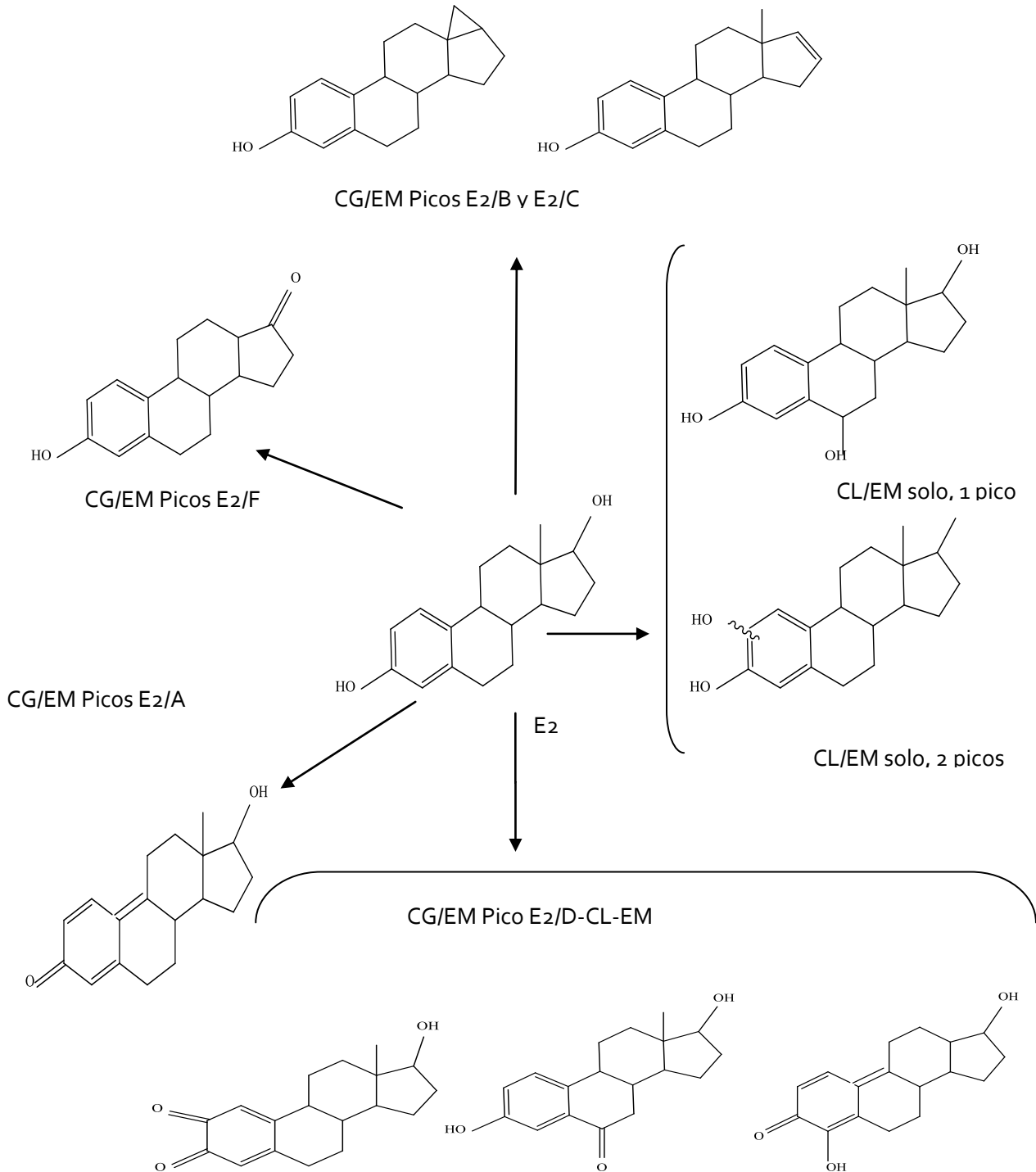


Figura 2. Resumen de la fotodegradación de E2 tras la excitación de UV. Etiquetas de pico referido al cromatograma de CG/EM (Mazellier *et al.*, 2008).

2.6 Contaminación hospitalaria

A pesar de la creciente preocupación por la gestión de residuos hospitalarios, se ha prestado poca atención a las aguas residuales generadas por hospitales, laboratorios de investigación médica y las instituciones de salud. Los hospitales consumen una cantidad considerable de agua en un día, que va desde 400 a 1200 L/día cama (Gautam *et al.*, 2007).

Estos contienen una gran variedad de microcontaminantes, resultado por un lado del diagnóstico, laboratorio y de las actividades de investigación y por otro de la excreción de medicamentos por los pacientes, estos incluyen principios activos de medicamentos y sus metabolitos, productos químicos, metales pesados, desinfectantes y esterilizantes, detergentes específicos para endoscopios y otros instrumentos, marcadores radiactivos y medios de contraste yodados (Verlicchi *et al.*, 2010).

Las aguas residuales de los hospitales contienen contaminantes que son peligrosos y requieren de tratamiento in situ para evitar la contaminación del sistema de alcantarillado de la ciudad y los ríos.

Fármacos sin metabolizar se excretan por los pacientes y los desinfectantes empleados en los hospitales pueden entrar a las aguas residuales; y estas sustancias al no ser biodegradables, pueden incorporarse a las aguas superficiales (Gautam *et al.*, 2007).

2.7 Métodos de extracción de hormonas en agua residual

La preconcentración de compuestos no polares y polares a menudo está basada en la extracción en fase sólida para muestras acuosas y una variedad de procedimientos de extracción para muestras sólidas (por ejemplo, extracción Soxhlet, extracción líquido presurizado, asistida por microondas de extracción, por ultrasonido disolvente extracción, etc.) (Gomes *et al.*, 2003).

Las matrices de aguas residuales o sedimentos requieren a menudo de una extracción extensa y de procedimientos de limpieza antes de que la muestra se ajuste para la determinación. Tras la recolección, las muestras acuosas son generalmente filtradas para eliminar las partículas que puedan interferir con el procedimiento de extracción.

El grado de manipulación para aislar el analito de interés a partir de su matriz depende de:

1. Contaminación de la muestra con los coextractivos
2. Cantidad del analito presente en la muestra
3. La herramienta analítica que va a ser utilizada (Zorita *et al.*, 2008).

El procedimiento que se utiliza principalmente para la extracción de hormonas en aguas residuales es mediante extracción en fase sólida (EFS) empleando discos o cartuchos octadecilo (C₁₈)-sílice, o los poliméricos en menor medida (Kuster *et al.*, 2009).

La extracción en fase sólida utiliza un absorbente selectivo que sirve para la separación del analito sobre la superficie a través de la adsorción, la cual una vez que contiene el analito se purifica con una solución de lavado para eliminar los componentes no deseados manteniendo el analito, que finalmente se desorbe de esta fase a través de una elución con un disolvente orgánico específico. El sorbente de la fase sólida puede ser un empacado en forma de tubos o cartuchos y en discos (Xu *et al.*, 2009).

Varios estudios han utilizado sílice octadecilo (C₁₈) unido a un cartucho adsorbente que es común para revertir la extracción en fase no polar a compuestos moderadamente polares, otro absorbente muy utilizado es un copolímero de divinilbenceno y vinilpirrolidona, que ha sido comercializado bajo el nombre comercial de Oasis HLB por Waters. La principal razón del amplio uso de este tipo de cartucho es debido a la extracción simultánea de una amplia gama de compuestos con pH (ácido, neutro y básico) (Hamid y Eskicioglu, 2012, Weigel *et al.*, 2004) por un solo adsorbente; comunmente se utiliza para extraer estos compuestos a partir de muestras acuosas, que ha logrado los mejores recobros, además de una buena repetibilidad (Aufartova *et al.*, 2011).

Algunos estudios informaron el uso de sílice aminopropilo (LC-NH₂) o de intercambio anionico para la limpieza de las muestras después de la extracción. La selección de los disolventes de elución para la limpieza y concentración de los analitos debe realizarse con cuidado, debido a la variación de la polaridad de estrógenos, compuestos más polares, como E₃ y estrógenos

conjugados se unen fuertemente con la fase estacionaria por lo cual se requiere de disolventes polares para un recobro completo (Hamid y Eskicioglu, 2012, Chiu *et al.*, 2009).

Las métodos convencionales de extracción tales como la extracción líquido-líquido están todavía en uso, un método alternativo es la extracción en fase sólida que se ha desarrollado para cuantificar hormonas en medio acuoso, también se ha utilizado la microextracción en fase sólida (SPME) (Kuruto-Niwa *et al.*, 2007) , columnas C18/NH₂, cromatografía en columna de gel sílice, columnas de permeación en gel en Biobeads SX-3, cromatografía de líquidos de fraccionamiento o una combinación de todos estos métodos (Koh *et al.*, 2007).

En la tabla 2 se muestran los métodos de extracción en fase sólida de hormonas mas utilizados en muestras acuosas.

Tabla 2. Extracción en fase sólida en muestras acuosas

MATRIZ	MÉTODO DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA	HORMONA	REFERENCIA
Efluentes y afluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales	(SPE) Oasis HLB Acondicionamiento : 6mL de acetato de etilo , 6 mL de acetonitrilo y 12 mL de agua. 70 mL de influente, 200 mL de efluente, 2 L de agua de rio. Lavado:10 mL de agua destilada Secado: corriente de nitrógeno Elución: 15 mL de acetato de etilo Reconstitución: 2 mL de acetato de etilo y 1.8 mL de hexano .	androsterona, epiandrosterona acetato de megestrol, noretindrona, acetato de medroxiprogesterona progesterona: hidroxiprogesterona,17 α hidroxiprogesterona	(Chang <i>et al.</i> , 2011)
Ríos	(SPE) Oasis HLB Acondicionamiento: 6 mL de metanol y 6 mL de agua y 0.2 L de agua residual Elución : 3 mL de metanol Secado: Corriente de nitrógeno Reconstitución: 0.2 mL en una solución de 0.1 % de amonio y una solución de hidróxido en agua : metanol , 70:30 (v / v)	estrona, 17 β -estradiol, el estriol, 17 α -etinilestradiol	(Sodré <i>et al.</i> , 2010)
Ríos	(SPE)LiChrolut RP-18 500 Acondicionamiento: 5 mL de agua destilada y 5 mL de metanol Lavado: 5 de agua y 500 μ L de hexano Elución :5 mL de metanol y 5 mL de metanol (2% de NH ₄ OH) Secado: Corriente de nitrógeno Reconstitución: 250 μ L de metanol	estrógenos sintéticos (estradiol, estrona, estriol, etinilestradiol y dietilestilbestrol), 6 estrógenos conjugados (sulfato y derivados de glucurónido de estradiol, estrona y estriol), progestágenos: progesterona, noretindrona y el	(Kuster <i>et al.</i> , 2009)

		levonorgestrel	
Ríos	(SPE) Oasis HLB Acondicionamiento: 100 mL y 1000 mL de muestra de agua Lavado: 10 mL de agua doblemente destilada y agua desionizada Elución :5 mL de acetonitrilo y 2 mL de diclorometano Secado: Corriente de nitrógeno Reconstitución: mezcla de agua y metanol (50:50, v/ v) y el volumen final se ajustó a 0.25 mL	seis corticoides (triamcinolona, cortisol, dexametasona, flumetasona, prednisolona, triamcinolona,acetónido), cuatro andrógenos (boldenona, epitestosterona, metiltestosterona, nortestosterona), y la progesterona	(Tolgyesi <i>et al.</i> , 2010)
Ríos y plantas de tratamiento de aguas residuales	Bakerbond PolarPlus C18 Speedisks Acondicionamiento: 10 mL de 50 % metanol/50 % diclorometano (v: v) , metanol y agua Milli-Q y 1 L de muestra Lavado: 20 mL de agua Milli- Q y 10 ml de 40 % agua metanol/60 % (v: v) Elución: 5 mL 50 % de metanol/50 % diclorometano Secado: Con un sistema de vacío Reconstitución:20 µL de metanol	estrone (E1), estriol (E3), 17β-estradiol (E2), y 17α-etinilestradiol	(Chen <i>et al.</i> , 2007)

2.8 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución

En cromatografía de líquidos, los componentes a separar se distribuyen entre dos fases: una fase estacionaria y una fase móvil. Los componentes se separan debido a la diferencia de migración entre la fase estacionaria y la fase móvil. La fase móvil introduce los analitos en la columna y a través del sistema. Como fase móvil se utilizan líquidos.

- Componentes

Disolventes, bomba, sistema de Introducción de la muestra, columna, detector y adquisición de datos

Para el análisis de distintos compuestos, un método alternativo y eficaz para satisfacer actualmente estas demandas , es a través de un sistema totalmente automatizado como lo es la cromatografía. Entre los diversos enfoques cromatográficos, se encuentra la Cromatografía

de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), este sistema tiene ventajas evidentes sobre otros métodos, como la cromatografía de gases. El análisis por CLAR requiere un sencillo pretratamiento debido a que los disruptores endocrinos contienen una fase líquida, mientras que por cromatografía de gases se requiere de una complicada vaporización para el pretratamiento de la muestra (Watabe *et al.*, 2006).

La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución se ha convertido en una herramienta de gran importancia en muchas áreas de aplicación como farmacéutica, toxicológica y análisis clínico, donde es importante considerar aumentar el rendimiento y reducir los costos de análisis. El modo más simple para acortar la serie de análisis es mediante el acortamiento de la longitud de la columna. Sin embargo, puede ser arriesgado, porque si existe una mezcla compleja de compuestos pueden no separarse lo suficientemente bien.

Los detectores DAD y UV son los más utilizados para CLAR debido a su facilidad de uso y aplicación a compuestos cromóforos. Los detectores UV son simples y económicos en su uso y mantenimiento además de ser los más recomendados para la mayoría de los laboratorios analíticos; estos han demostrado la capacidad para proporcionar límites de detección en o por debajo de $\mu\text{g/L}$.

El Método EFS-CL con detección de fuente de diodos se describe en un estudio de estrógenos y progestágenos en agua en el año 2001, en el cual es deseable una completa automatización para mejorar el rendimiento de la muestra, economía, eficiencia, simplicidad, sensibilidad y reproducibilidad (LaFleur y Schug, 2011).

Su uso se ha incrementado en los últimos cuatro años empleándose técnicas acopladas en forma de cromatografía de líquidos y espectrometría de masas con ionización de electrospray, cromatografía líquida en tándem y espectrometría de masas, cuadrupolo tiempo de vuelo espectrometría de masas (Novakova y Solich, 2005).

2.9 Identidad de 17β-estradiol

2.9.1 Espectroscopia de infrarrojo

La región del infrarrojo, es una determinada zona de la radiación electromagnética situada más allá de la parte roja de la región visible.

Como toda radiación electromagnética, la radiación infrarroja es un movimiento ondulatorio; formado por un campo eléctrico oscilante perpendicular a la dirección de propagación, y un campo magnético oscilante con la misma frecuencia y perpendicular al campo eléctrico. Por lo tanto, la radiación infrarroja como cualquier radiación electromagnética, puede caracterizarse por la Frecuencia de Oscilación (ν) y por la longitud de onda (λ). La frecuencia (ν) de la radiación infrarroja alcanza números muy grandes, y para caracterizar la radiación infrarroja, se utilizan normalmente el número de onda (ν'), que se expresa en cm^{-1} (inverso de la longitud de onda), por lo tanto es el número de ondas de la radiación contenidas en un centímetro.

$$\nu (\text{cm}^{-1}) = 1 / \lambda(\text{cm}) = 10^4 / \lambda (\mu\text{m})$$

En el lenguaje espectroscópico corriente al número de onda se le llama frecuencia, por ser proporcional a la verdadera frecuencia

$$\nu = \nu' / C$$

La espectroscopia de infrarrojo es uno de los métodos clásicos para la determinación de la estructura de moléculas pequeñas, debido a su sensibilidad a la composición química y la arquitectura de las moléculas.

Esto es equivalente a correr a partir de la longitud de onda a la pequeña longitud de onda grande como es habitual en espectroscopia ultravioleta-visible. La región infrarroja espectral es adyacente a la región espectral visible y se extiende desde 0.78 μm hasta aproximadamente 1000 μm . Se subdividen en la región del infrarrojo cercano de 780 nm a 2.5 μm , la región del infrarrojo medio de 2.5 μm a 50 μm y la región del infrarrojo lejano de 50 μm a 1000 μm .

micras. El infrarrojo medio rango espectral que se extiende desde 2,5 hasta 50 micras corresponde a $4000-200\text{ cm}^{-1}$.

2.9.2 Espectroscopia de UV

La absorción molecular en la región ultravioleta y visible del espectro depende de la estructura electrónica de una molécula. La absorción de energía se cuantifica y da por resultado la elevación de los electrones desde orbitales en el estado básico a orbitales de mayor energía en un estado excitado. Para muchas estructuras electrónicas, la absorción no ocurre en una porción fácilmente accesible de la región ultravioleta.

Los datos frecuentemente se muestran en forma de gráfica o presentación tabular de la longitud de onda en función de la absorptividad molar o el logaritmo de la absorptividad molar ϵ_{max} o $\log \epsilon_{\text{máx}}$

Las longitudes de onda en la región ultravioleta generalmente se indican en nanómetros ($1\text{ nm}=10^{-7}\text{ cm}$) o angstroms, ($1\text{A}=10^{-8}\text{ cm}$). Ocasionalmente, la absorción se indica en números de onda; nosotros estamos principalmente interesados en la región de ultravioleta que se extiende desde 200 hasta 300 nm.

Las principales características de una banda de absorción son su posición e intensidad. La posición de la absorción corresponde a la longitud de onda de la radiación cuya energía es igual a la requerida para la transición electrónica. La intensidad de la absorción depende principalmente de dos factores: la probabilidad de interacción entre la energía de radiación y el sistema electrónico para elevar el estado básico al estado excitado, así como la polaridad del estado excitado.

La transmitancia T se define como la fracción de la luz incidente que pasa a través de la muestra.

Transmitancia $T=P/P_0$

Por lo tanto, T puede ser de 0 a 1. El porcentaje de transmitancia es simplemente $100T$ y puede valer desde 0 a 100%. La absorbancia se define como

$$\text{Absorbancia } A = \log_{10}(P/P_0) = -\log T$$

Cuando no se absorbe luz, $P=P_0$ y $A=0$. Si se absorbe el 90% de luz se transmite el 10%.

Ley de Lambert-Beer

$$A = \epsilon bc$$

Es el fundamento de la espectrofotometría, donde A la absorbancia es adimensional, la concentración de la muestra c, normalmente viene dada en unidades de mol/L (M), el paso óptico b, normalmente se expresa en centímetros. La cantidad ϵ se llama absorptividad molar y tiene unidades de $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$, y así es el producto ϵbc es adimensional. La absorptividad molar es la característica de una sustancia que nos dice cuanta luz absorbe a una longitud de onda determinada.

La ley de Lambert-Beer afirma que la absorbancia es proporcional a la concentración de la especie absorbente. Esta ley se aplica a la radiación monocromática y es válida exactamente para disoluciones diluidas $\leq 0.01 \text{ M}$ de la mayoría de las sustancias.

En disoluciones concentradas, las moléculas de soluto se acercan unas a otras, sus propiedades (entre las que se encuentran la absorptividad molar) cambian algo. A concentraciones muy altas, los solutos se convierten prácticamente en disolvente.

La ley de Beer se cumple para una radiación monocromática que atraviesa una disolución diluida cuando la especie absorbente no participa en un equilibrio que depende de su concentración.

2.10 Técnicas de detección y monitoreo de hormonas

En los últimos años se han propuesto diversos métodos analíticos para mantener el control de estrógenos o progestágenos en el agua y matrices biomédicas, que se centran en ensayos

biológicos o técnicas cromatográficas las cuales se han convertido en los sistemas de elección para su análisis debido a que permiten la identificación de los analitos de interés, estas incluyen la Cromatografía de Gases (CG), Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) con UV-vis o detección con espectrometría de masas, la cual es aceptada como una técnica con amplias ventajas para el monitoreo de hormonas esteroidales en matrices acuosas (Almeida y Nogueira, 2006).

Es importante considerar la matriz de la muestra al emplear cualquiera de las técnicas analíticas mencionadas, debido a que es uno de los problemas más importantes que pueden presentarse en la cuantificación de hormonas, teniendo un impacto en la calidad del análisis, por lo tanto, el tratamiento de la muestra adecuado es esencial para aislar y cuantificar a nivel de trazas.

La cuantificación ultra-traza y nivel de trazas limita los desafíos actuales, particularmente cuando la cantidad de muestra disponible para las pruebas es limitado. Grandes cantidades de muestra son deseables con el fin de disminuir los límites de detección, pero cuanto mayor sea el volumen de la muestra que se pre-concentra, es más probable que la matriz interfiera.

El aislamiento eficaz de un compuesto particular puede complicarse por una matriz de muestra que contiene muchos componentes similares que interfieren. Además, las matrices de muestras también pueden complicar la detección causando un aumento en la señal de fondo, la reducción de las recuperaciones, o la introducción de interferencias cromatográficas que pueden afectar la reproducibilidad y exactitud (LaFleur y Schug, 2011).

De las técnicas analíticas que presenta una adecuada sensibilidad y selectividad para el análisis ultratrazas de hormonas se encuentran las siguientes: cromatografía de líquidos y de gases acoplado a un detector de espectrometría de masas, cuyas siglas son: CL/EM y CG/EM respectivamente. Sus límites de detección son generalmente muy por debajo de ng/L (Zheng *et al.*, 2008).

La cromatografía de gases con espectrometría de masas (CG/EM) ha sido empleada en la determinación de hormonas esteroidales, los límites de detección que se han reportado de este método van en un intervalo de 0.005 a 1 ng/L para CG/EM y de 0.2 a 40 ng/L de CG/EM/EM. Sin embargo, se debe incluir uno o varios pasos de derivatización en este método. La Cromatografía de Líquidos Acoplada a Espectrometría de Masas (CL/EM) ha tenido como ventaja que no requiere de una derivatización previamente al análisis. Los límites de detección que se han informado para CL /EM o CL/EM/EM en análisis de hormonas en agua oscilan entre 0.02 y 1.0 ng/L (Sun *et al.*, 2009).

Respecto a la cromatografía de gases, una de sus características es ser muy versátil y presenta la ventaja de una mayor rapidez en la determinación respecto a la cromatografía de líquidos. Sin embargo presenta el inconveniente de que en muestras de escasa volatilidad requiera de una previa derivatización (Xu *et al.*, 2009).

La Cromatografía de Líquidos Acoplada a Masas-masas CL/EM/EM es una tecnología aplicable a una amplia gama de moléculas y matrices, generalmente se prefiere más que CG/EM, debido a su sensibilidad y especificidad (Ingrand *et al.*, 2003).

Los detectores utilizados para el análisis de hormonas esteroidales han sido de masas y UV, en la literatura se reporta que la Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (GC/EM) y la Cromatografía de Líquidos (CL) acoplada a detectores UV y de fluorescencia, requiere una preparación laboriosa de las muestras. Recientemente, la Cromatografía de Líquidos Acoplada a Espectrometría de Masas con Electrospray/Ionización Química a Presión Atmosférica, sus siglas en inglés (ESI/APCI) permite una buena sensibilidad y selectividad (Tolgyesi *et al.*, 2010).

En los últimos años, la Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas o Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución han sido desarrolladas para ofrecer mejores sistemas de identificación de estas hormonas en el medio ambiente, la Cromatografía de Líquidos Acoplada a Espectrometría de Masas, presenta bajos límites de detección (LD), que permite cuantificar a niveles de traza, siendo una característica valiosa para compuestos que se mantienen biológicamente activos a bajas concentraciones (por ejemplo, el estradiol) (Streck, 2009).

El uso de CL/EM amplía la gama de polaridad en la etapa de identificación de cationes, en comparación con CG/EM, la falta de bibliotecas espectrales para CL/EM significa una difícil identificación de compuestos desconocidos. Los detectores trampa de iones y cuadrupolo en CL/EM proporcionan una resolución similar, generalmente insuficiente para elucidar la estructura molecular (Giger, 2009).

2.11 Validación del método analítico

Para desarrollar un nuevo método analítico debe considerarse la validación la cual debe estar documentada y cumplir con lo que las diferentes instituciones establecen para que éste sea científicamente adecuado; existen diferentes autoridades regulatorias de Europa, Estados Unidos y Japón, como la ICH (International Conference on Harmonization), que establece guías para la validación de métodos analíticos, originalmente existían dos documentos, Q2A y Q2B. Recientemente estas guías fueron revisadas y combinadas en un solo documento, Q2 (R1). El objetivo de la validación de un método analítico es para demostrar que es adecuado para este propósito.

Dentro de los parámetros principales que se incluyen en las guías regulatorias (ICH Q2 (R1). dentro de la validación de métodos analíticos para el desarrollo de su análisis se describen los siguientes:

Exactitud: La exactitud de un procedimiento analítico expresa la cercanía de la aceptación entre el valor que es aceptable como un valor verdadero convencional o un valor de referencia aceptado y el valor encontrado.

Precisión: La precisión de un procedimiento analítico expresa la cercanía de la aceptación entre una serie de mediciones obtenidas de un múltiple muestreo de una misma muestra homogénea bajo condiciones prescritas. La precisión debe ser considerada a tres niveles: repetitividad, precisión intermedia y reproducibilidad. La precisión de un método analítico es usualmente expresada como la varianza, desviación estándar o coeficiente de variación de una serie de variaciones

Repetitividad: La repetitividad expresa la precisión bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo. La repetitividad es también llamada precisión intra-ensayo

Precisión Intermedia: La precisión intermedia expresa las variaciones dentro de laboratorios: diferentes días, diferentes analistas, diferente equipo, etc.

Reproducibilidad: La reproducibilidad expresa la precisión entre laboratorios (estudios colaborativos, usualmente aplicados a la estandarización de la metodología).

Especificidad: La especificidad es la habilidad de asegurar inequívocamente el analito en presencia de componentes que se espera que estén presentes”.

Límite de detección: El límite de detección de un procedimiento analítico individual es la mínima cantidad de analito en una muestra que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada como un valor exacto.

Límite de cuantificación: El límite de cuantificación de un procedimiento analítico individual, es la mínima cantidad de un analito en una muestra que puede ser determinada cuantitativamente con precisión y exactitud.

Linealidad: La linealidad de un procedimiento analítico es la habilidad (dentro de un rango), para obtener resultados que son directamente proporcionales a la concentración (cantidad) del analito en la muestra.

Rango: El rango de un procedimiento analítico es el intervalo entre la concentración mayor y la menor del analito en la muestra (incluyendo estas concentraciones), para las cuales el procedimiento analítico ha demostrado ser preciso, exacto y lineal.

Robustez: La robustez de un procedimiento analítico es la medición de su capacidad de permanecer inafectado por pequeñas pero deliberadas variaciones en parámetros del método y provee una indicación de su confiabilidad durante el uso normal.

2.12 Eliminación y tratamiento

La actividad microbiana en una EDAR puede ser un indicador para predecir la eliminación de hormonas esteroidales del efluente, esta actividad es frecuentemente medida como la demanda bioquímica de carbono oxígeno, que varía en gran medida de acuerdo al tipo de tratamiento (lodo activado, biológicos, filtro de goteo, tratamiento ultravioleta).

El aumento hidráulico y los tiempos de retención de lodos, permiten el tiempo necesario para que las reacciones biológicas se produzcan, además de la temperatura que promueve la degradación microbiana pudiendo aumentar las tasas de eliminación de esteroidales.

Sin embargo, es importante resaltar que a pesar de estas reacciones de degradación en plantas depuradoras, estos contaminantes se siguen detectando en el ambiente acuático natural (Atkinson *et al.*, 2012).

Debido a los restos fenólicos de los estrógenos, la oxidación puede reducir las actividades estrogénicas. Se ha informado que los estrógenos pueden reaccionar más rápidamente con ozonización que con cloración. Estudios han encontrado un aumento de 2,3 veces efecto estrogénico en agua de lago después de su cloración. Mientras que los estrógenos se han removido eficientemente por tratamientos avanzados como carbono activado, óxido de manganeso y ósmosis inversa, no está bien establecido eficientemente como son removidos por procesos convencionales como la coagulación/sedimentación y filtración (Chen *et al.*, 2007).

JUSTIFICACIÓN

3. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años se ha prestado un mayor interés a la investigación de disruptores endocrinos en el medio acuático, debido a la facultad que poseen de alterar el sistema endocrino de los organismos con los que interactúan, siendo las hormonas esteroidales las más relevantes. Respecto a las técnicas analíticas más empleadas en la literatura se ha reportado que la cromatografía de líquidos de alta resolución, es de utilidad para la cuantificación e identificación de este tipo de moléculas en diversas matrices de agua, lodos y sedimentos.

Se ha confirmado la presencia de estrógenos y progestágenos en concentraciones de preocupación toxicológica en el medio acuático, pueden producir alteración de los procesos endocrinos, tales como la disminución de la fertilidad, la feminización y hermafroditismo de los organismos acuáticos (Bulun *et al.*, 2006). Existe una amplia investigación sobre la presencia de estas hormonas en países desarrollados. Sin embargo en México ha sido muy poco estudiado, dentro de las principales fuentes de contaminación están las plantas de tratamiento de aguas residuales, las excreciones provenientes del hombre y animales, los hospitales y la industria farmacéutica.

El beneficio que ofrecerá el presente trabajo de investigación será la cuantificación de 17β -estradiol, la identificación del mismo analizando el agua residual de un hospital de la ciudad de Toluca empleando la técnica analítica (CLAR), además establecer la cinética de degradación de esta molécula mediante la exposición a luz UV.

HIPÓTESIS

4. HIPÓTESIS

La técnica analítica desarrollada por cromatografía de líquidos permite la detección y cuantificación de 17β -estradiol en agua residual proveniente de un hospital

OBJETIVOS

5. OBJETIVOS

5.1 General

Cuantificación de 17β -estradiol provenientes de efluentes hospitalarios mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución y determinación de cinética de degradación.

5.1.1 Específicos

- Optimizar y validar una técnica analítica de cromatografía de líquidos de alta resolución para la detección y cuantificación de 17β -estradiol
- Implementar la técnica para determinar la cantidad de 17β -estradiol presente en el agua residual
- Determinar la cantidad de 17β -estradiol presente en el agua residual
- Establecer la cinética de degradación de 17β -estradiol

METODOLOGÍA

6. METODOLOGÍA

6.1 Metodología analítica

En la Figura 3, se muestra la metodología general desarrollada del presente trabajo de investigación.



Figura 3. Metodología general

6.2 Gestión para el muestreo

La gestión del muestreo del presente trabajo se llevó a cabo con una solicitud para obtener la autorización por parte del hospital de Ginecología y Obstetricia para tener acceso a la planta de tratamiento de agua residual de la ciudad de Toluca frente al Comité de Enseñanza, Aprendizaje e Investigación del IMIEM.

6.3 Caracterización de 17 β -estradiol

La caracterización de 17 β -estradiol en pruebas de identidad, determinando su solubilidad y pH, la identificación de este compuesto fue mediante tres técnicas analíticas, espectrofotometría de infrarrojo, espectrofotometría ultravioleta visible y cromatografía de líquidos de alta resolución.

Con espectrofotometría de infrarrojo se establecieron los grupos funcionales de 17 β -estradiol, por medio de la técnica de la pastilla utilizando el estándar de la marca Sigma Aldrich Estradiol (97-100% de pureza), esta técnica consistió en la preparación de una pastilla compuesta de KBr con el estándar 95%:5%, respectivamente.

Para la determinación de la longitud de máxima absorbancia correspondiente al 17 β -estradiol se utilizó espectrofotometría de UV visible de acuerdo a lo establecido en la Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP), preparando una solución de 10 mg/L; para la determinación del tiempo de retención de 17 β -estradiol se utilizó Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución .

6.4 Condiciones cromatográficas

6.4.1 Tipo de columna

Se empleó para la separación de la hormona la columna Symmetry C18 3.0x250 mmx5 μ m, evaluándose mediante una fase móvil de ACN: H₂O (60:40) con 0.1 % Ac. Fórmico.

6.4.2 Determinación del 17 β -estradiol (tiempo de retención)

- Se preparó una solución de estándar de 17 β -estradiol a una concentración de 10 mg/L, con una mezcla de metanol y agua (90:10).
- La fase móvil fue preparada con una mezcla de ACN:H₂O (60:40) con 0.1% de ácido fórmico; se filtró con acrodiscos de 0.45 μ m y desgacificó en el sonicador durante 15 minutos para la eliminación del posible gas disuelto. El cromatógrafo de líquidos se acondicionó esperando aproximadamente 40 minutos para obtener una línea base adecuada.
- Se inyectó la muestra microfiltrada en el cromatógrafo de líquidos.
- En la Tabla 3 se presentan las condiciones cromatográficas para la determinación del 17 β -estradiol.

Tabla 3. Condiciones cromatográficas para la determinación de 17 β -estradiol

Equipo	Fase móvil	Columna	Tiempo de corrida	Flujo	Volumen de inyección	Longitud de onda	Tiempo de retención
Cromatógrafo de líquidos Waters Detector 2487 (abs dual) Bomba 515 (modo isocrático)	ACN:H ₂ O 60:40 con 0.1 %Ac. fórmico	Symmetry C18 3.0x250 mmx5 μ m	7 min.	1 mL/min	25 μ L	280 nm	2.1 min

6.5 Extracción de la muestra en fase sólida

Para el proceso de extracción en fase sólida como pretratamiento previo de la muestra, se empleó el cartucho Oasis HLB; que fue elegido por su amplio uso en base a lo reportado en la literatura, con la finalidad de obtener los recobros del afluyente y efluente de las muestras de agua residual. En la Tabla 4 se muestran las condiciones para la extracción en fase sólida de la muestra.

Tabla 4. Extracción de la muestra en fase sólida

Operación	Extracción en fase sólida fuera de línea
Acondicionamiento	5 mL de agua desionizada y 5 mL de metanol
Carga de muestra	200 mL de muestra flujo de 10 mL/min, dejar secar durante 20 min.
Lavado	5 mL de agua desionizada flujo de 8 mL/min
Elución	10mL de metanol (5%) acetonitrilo flujo 8 mL/min
Reconstitución	Aforar con 10 mL de metanol

6.6 Validación del método analítico

La validación del método para la identificación y cuantificación 17β -estradiol se utilizó el estándar de la marca Sigma Aldrich (97-100% de pureza), evaluando los siguientes parámetros: límite de detección y de cuantificación, linealidad, precisión (repetitividad del sistema), exactitud del sistema, precisión intermedia y robustez, de acuerdo a la ICH. En la Figura 4, se presenta un esquema general de la validación del método analítico con cada uno de sus parámetros evaluados.

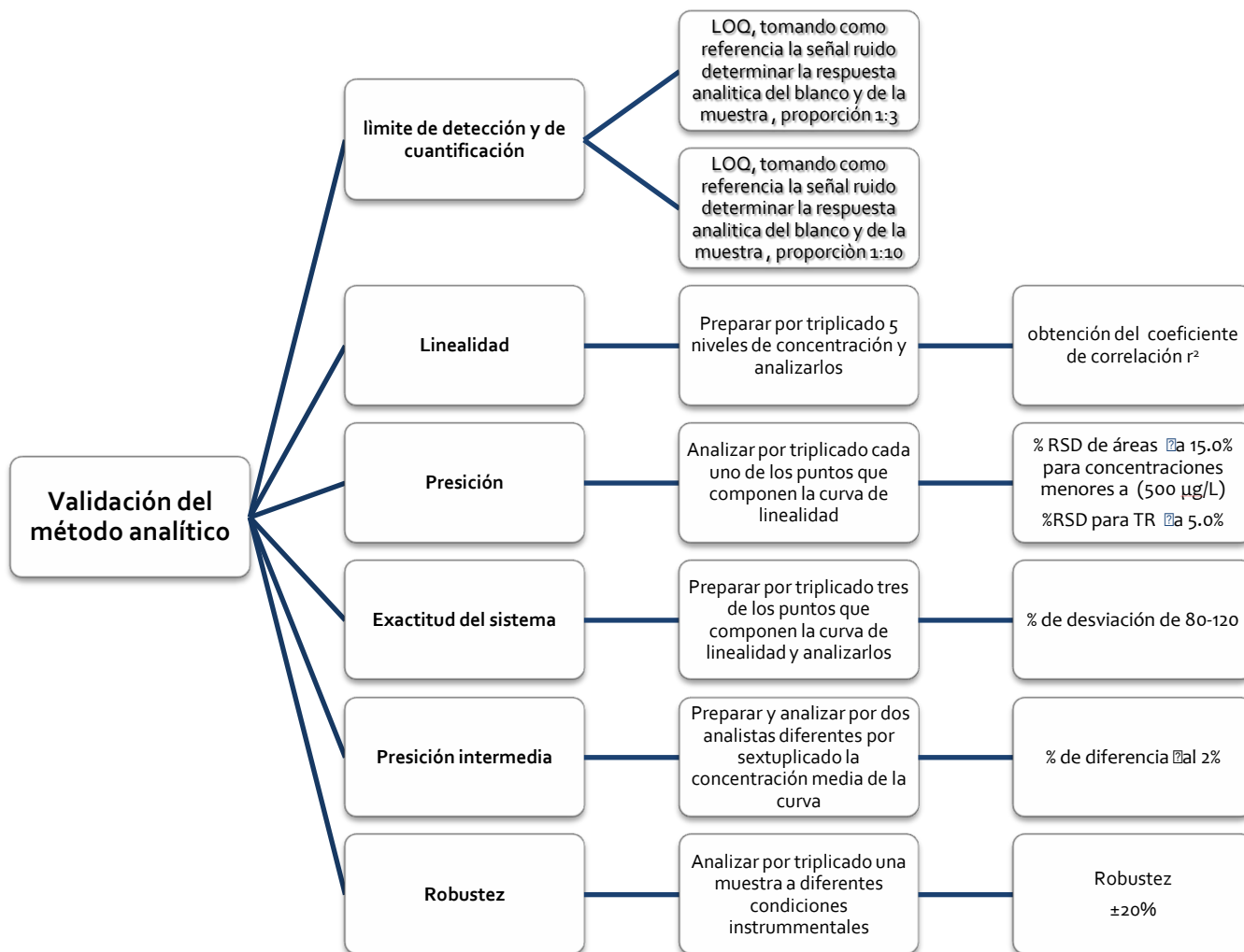


Figura 4. Validación del método analítico

6.7 Muestreo de agua residual

Tomando como referencia aspectos importantes de la norma NMX-AA-003-1980 AGUAS RESIDUALES-MUESTREO, la toma de muestra se realizó en muestras simples provenientes de la descarga de agua residual del hospital en distintos momentos, las cuales fueron colocadas en recipientes individuales. Los puntos de muestreo de la planta de tratamiento fueron localizados en el efluente y afluente.

Los recipientes empleados para el muestreo fueron frascos ámbar de vidrio, los cuales fueron previamente tratados con HCl diluido con la finalidad de eliminar las trazas de metales.

El recipiente muestreador se enjuagó dos veces antes de efectuar el muestreo, posteriormente se realizó lo siguiente:

- El recipiente se colocó en los puntos de descarga de la planta de tratamiento (afluente y efluente).
- La muestra de agua residual fue de aproximadamente 1 litro, la cual fue transferida a un frasco ámbar con la ayuda de un embudo para facilitar su llenado.
- El cierre del recipiente se fijó de tal forma para evitar el derrame de la muestra.
- Las muestras se preservaron durante su transporte por medio de un baño de hielo, conservándose a una temperatura de 4°C, con un intervalo de tiempo entre la extracción de la muestra y su análisis menor a una semana.

En la Figura 5, se muestra la planta de tratamiento de agua residual del hospital de Ginecología y Obstetricia



Figura 5. Planta de tratamiento de agua residual del Hospital de Ginecología y Obstetricia

6.8 Degradación de 17β-estradiol

La degradación del 17β-estradiol se realizó con una solución de 17β-estradiol preparada a una concentración de 10 mg/L con una proporción 9:1 metanol en agua, se tomaron alícuotas de 50 mL de esta solución por triplicado, las cuales se expusieron a luz solar y a luz UV con 2 lámparas de 15 watts de Hg a una longitud de onda de 254 nm, finalmente se determinó su degradación por medio de la disminución de la concentración de la hormona tomando en distintos tiempos muestras irradiadas por luz UV y luz solar las cuales fueron analizadas mediante cromatografía de líquidos de alta resolución.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presenta el artículo de investigación generado a partir de la presente investigación en el cuál se interpretan los resultados analíticos obtenidos de la determinación de 17β -estradiol por cromatografía de líquidos en agua residual.

Se describe la metodología utilizada para llevar a cabo el desarrollo y validación del método y su aplicación en muestras de agua residual de un hospital así como la cinética de degradación de 17β -estradiol mediante luz UV y luz solar.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Artículo científico

7.1.1 Correo electrónico de confirmación de la recepción del artículo

De: ees.stoten.o.25b2of.697cbofc@eesmail.elsevier.com
[ees.stoten.o.25b2of.697cbofc@eesmail.elsevier.com] En nombre de Science of the Total Environment [editorsupport@elsevier.com]

Enviado el: miércoles, 04 de diciembre de 2013 09:20 p.m.

Para: Jorge Javier Ramírez García; jjrg1311@yahoo.com.mx

Asunto: Submission Confirmation

Dear JORGE,

Your manuscript entitled "DETERMINATION OF 17 β -ESTRADIOL PRESENT IN A TREATMENT PLANT GINECOLOGY HOSPITAL OF TOLUCA, MEXICO AND THE PHOTODEGRADATION KINETICS STUDY" has been successfully submitted and is now being reviewed for possible publication in Science of the Total Environment (STOTEN). You will be informed of the outcome of the review process as soon as we get comments back from the referees. This should normally take 6-10 weeks. Meanwhile, if you have any questions regarding your paper, please feel free to contact me. Thank you.

With kind regards,

Science of the Total Environment

7.1.2 Manuscrito enviado

DETERMINATION OF 17β -ESTRADIOL PRESENT IN A TREATMENT PLANT GINECOLOGY HOSPITAL OF TOLUCA, MEXICO AND THE PHOTODEGRADATION KINETICS STUDY

A. Nieto-Hernández¹, J.J. Ramírez-García^{1*}, JL Gallegos-Perez² and A. Colin-Cruz³.

¹Laboratorio de Análisis Instrumental, Facultad de Química UAEM. Toluca, Estado de México, 50120, México.

² Department of Neurobiology and Behavior, University of California, Irvine, CA 92697, USA

³ Laboratorio de Química Ambiental, Facultad de Química UAEM, Toluca, Estado de México, 50120, México.

Correspondence: J. J. Ramírez-García, Laboratorio de Análisis Instrumental, Facultad de Química UAEM, Paseo Colon esq. Paseo Tollocan, Toluca, Estado de México, 50120, México.

E-mail: jjramirezg@uaemex.mx

Phone/Fax: +52 (722) 217-3890

ABSTRACT

Hospital wastewaters contain a variety of toxic or pollutants substances that affect the balance of the aquatic environment such as 17β -estradiol (E₂), this compound was considered as an emerging contaminant; which are quite often unregulated contaminants in which including endocrine disruptors . In this paper, a specific, sensitive and rapid analytical method was developed for the determination of 17β -estradiol (E₂) in hospital wastewater treatment plant (HWTP) and determination of kinetics degradation. 17β -estradiol (E₂) was extracted from the wastewater samples through cartridges Oasis HLB solid-phase extraction (SPE). Then the hormone was identified and quantified by standard addition using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The quantification limit (LOQ) was 100 $\mu\text{g/L}$ and detection limit (LOD) was 50 $\mu\text{g/L}$ for 200 mL. 17β -estradiol (E₂) was detected at concentrations ranging from 18.81- 60.57 $\mu\text{g/L}$ and 54.63 05.29 $\mu\text{g/L}$ in hospital influent and effluent wastewater samples respectively. Kinetics of degradation was investigated by sunlight and ultraviolet (UV) light. The irradiation experiments were carried out placing a solution of 17β -estradiol 10000 $\mu\text{g/L}$ in direct contact with natural periods of sunlight and ultraviolet (UV) light in a dark chamber equipped with two lamps at radiation source of 15-W each one, Hg (254 nm). Photodegradation for both cases showed first-order kinetics resulting in a half-life of 177.73 hours for sunlight and ultraviolet light 203.86 hours.

Highlights

- HPLC method developed for quantification of 17β -estradiol is rapid, sensitive, and specific.
- Higher degradation rate was observed with solar light in comparison to UV light.
- Influent samples recoveries of E₂ were 81.41 -104.52% with DER from 11.19%.
- Effluent samples recoveries of E₂ were 86.93-99.25% with DER from 6.15%.

Keywords: 17β -estradiol, Hospital wastewater, Kinetics degradation, solid-phase extraction, HPLC

1. Introduction

Over the last years there has been an increasing interest in incorporation of emerging contaminants in wastewaters, surface waters and ground waters. Emerging contaminants are unregulated contaminants that can be candidates for future regulation depending on the results of research regarding their potential health effects. These contaminants include surfactants, pharmaceuticals, personal care products (PPCPs), illicit drugs, gasoline additives, other groups of compounds and endocrine disruptors (EDCs) (Verlicchi *et al.*, 2010). EDCs correspond to natural and synthetic compounds which produce interference in the normal function of the endocrine system in humans and animals when they are present in the environment above a certain concentration causing adverse health effects in wildlife (Hansen *et al.*, 1998, Tyler *et al.*, 2005, Hamid and Eskicioglu, 2012).

Problems caused by endocrine disruptors include reduction in male fertility, abnormalities in the reproductive organs of females, precocious puberty and increase in breast, ovarian and prostate cancer. These compounds are widely distributed in the environment; some are persistent and can be transported over long distances, crossing borders and have been found in all regions of the world (Gutierrez-Espindola, 2009).

In aquatic ecosystems the main source of estrogen is incomplete removal during wastewater treatment.

Numerous studies performed in different countries showed presence of these substances in influents and effluents of wastewater treatment and receiving waters (Silva *et al.*, 2012). In effluent waters, the presence of natural estrogen steroids such as 17 β -estradiol (E₂), estrone (E₁) and 17 α -ethinylestradiol (EE₂) have been found. Several authors indicate that they are the most potent estrogenic substances (Desbrow *et al.*, 1998, Routledge *et al.*, 1998, Thorpe *et al.*, 2003, Xu *et al.*, 2012).

Hospital effluents, despite of their very specific nature, are quite often considered to have the same pollutant load as Urban Wastewaters (UWWs). They are discharged into the public sewer networks, and are then collected into a wastewater treatment plant WWTP and co-treated

with UWWs. Co-treatment of wastewater treatment plant (WWTP) is not considered the most suitable because it is based on dilution of different discharges and does not provide segregation/separation of emerging pollutants and toxic substances from the liquid phase, which is to be discharged into the environment (Verlicchi *et al.*, 2010).

Degradation of chemical compounds can occur in the organic matter in aquatic environments by direct or indirect photolysis. Direct photolysis is the result of light absorption by molecular contaminants causing their degradation. All steroidal estrogens have considerable sunlight absorbance at the ultraviolet and blue region (290-360 nm) (Rosenfeldt and Linden, 2004). This type of photolysis is crucial for photodegradation of steroidal estrogens in aquatic environments (Chowdhury *et al.*, 2010). For indirect photolysis, NO_3^- , Fe^{3+} and humic substances play crucial roles. They are ubiquitous in surface water and absorb solar radiation to reach an excited state, subsequently generating free radicals comprised of reactive oxygen species (ROS), hydroxyl radicals ($\text{OH}\cdot$), peroxy radicals ($\text{ROO}\cdot$), and singlet oxygen (O_2) and other non-ROS transients (Chowdhury *et al.*, 2011). Irradiation with UV light has been studied using monochromatic mercury lamp of 254 nm low pressure mercury lamp or medium-pressure polychromatic (Liu *et al.*, 2003, Liu and Liu, 2004, Rosenfeldt and Linden, 2004, Zuo *et al.*, 2006, Mazellier *et al.*, 2008), steroid hormones are known to degrade rapidly in the presence of high intensity (254 nm).

The aims of this study were: to optimize the chromatographic analysis to determine the incidence of hormone 17β -estradiol in influent and effluent of a Gynecology Hospital wastewater treatment plant and to evaluate its degradation in aqueous medium induced by ultraviolet light and sunlight to determine the kinetics of 17β -estradiol degradation by UV-visible light.

2. Methods

2.1 Reagents

Methanol and acetonitrile grade HPLC were purchased from Fermont, (Monterrey, NNL, México). Formic acid 84.4% (w/w), 17 β -estradiol (97-100 % w/w) were purchased from Sigma Aldrich (Saint Louis Mo, USA). Ultrapure water was obtained from a Milli-Q RC equipment.

2.2 HPLC method optimization and analysis

Two different columns were compared for the HPLC method optimization: a Symmetry C18 (5 μ m particle size, 3.0 x 250 mm Waters) and μ Bondapak C18 (3.9 x 300 mm Waters).

Under isocratic conditions, two solvent mixtures of acetonitrile: water (v/v) were tested, 60:40 with 0.1% formic acid and 45:55 with 0.1% formic acid. A Waters HPLC equipment configured as follows was used: isocratic HPLC Pump (Waters model 1515), UV-Visible Dual Absorbance detector (Waters model 2487). Injection volume was 20 μ L, and all isocratic experiments were programmed at a flow rate of 1 mL/min.

Stock solution of 10 mg/mL of 17 β -estradiol was made in a mixture of methanol/water (9:1 v/v). Working standard solutions for calibration were prepared from the stock solution at concentrations: 100, 500, 1000, 2500 and 5000 μ g/L, sequentially filtered through out Whatman No. 40 filter paper and 0.45 μ m-pore size acrodisk (Pall, Port Washington, NY) to remove solid particles and then degassed for 15 minutes to remove dissolved gas. All solutions were stored at 4 °C and protected from light.

2.3 Validation

Validation was conducted based on the International Conference on Harmonization (ICH), the parameters evaluated were: limit of detection and quantification, linearity, precision, system accuracy, intermediate precision (Guideline, 2005).

Linearity was studied by analyzing preparations ($n = 7$) containing standard solution of 17β -estradiol at concentrations between (50-5000 $\mu\text{g/L}$). Linear concentration range was estimated on the basis of a linear regression curve ($y = mx + b$) and correlation coefficient (R^2).

Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were calculated from the injection of a standard solution made up several dilutions to a concentration level corresponding to a signal to noise ratio of 3 and 10, respectively.

Precision was determined as the repeatability of the analytical procedure in a laboratory over a short period of time using the same analyst and the same equipment. System repeatability was determined by three preparations at five concentrations of the calibration curve with 3 replicate injections of each concentration, calculating relative standard deviation (RSD). Method repeatability was tested by six preparation of the standard of 17β -estradiol at one concentration of 2500 $\mu\text{g/L}$. Inter-day precision was demonstrated analyzing by duplicate three samples of influent wastewater in two different days and by two different analysts expressing it as percent of RSD.

Extraction recoveries were determined in influent and effluent of hospital wastewater using spiked samples at four concentrations levels: 250, 500, 750 and 1000 $\mu\text{g/L}$.

Accuracy was defined as (concentration value/added concentration value) $\times 100\%$.

All influent and effluent samples were analyzed by triplicate and their 17β -estradiol concentrations were calculated by external standard addition.

2.4 Sample collection

One liter samples were collected weekly for a period of three months (March-May 2013) from influent and effluents of a hospital wastewater treatment plant located in Toluca city, Edo. of Mex. , Mexico. The treatment process of the plant is through a solid separation activated sludge biological disks, clarification and chlorination. All samples were collected in glass amber bottles (1000 mL), and then stored immediately in ice packed containers; and transported to the laboratory for further analysis. Upon arrival, samples were immediately passed through 1 - μm glass microfiber filter from Ahlstrom Finland and then stored at 4° C until analysis. Extraction and HPLC analysis were performed the next day after sampling.

2.5 Sample extraction

Sample preparation was performed using solid phase extraction (SPE) Oasis HLB cartridges (1 g, Waters, Massachusetts, USA). Cartridges were preconditioned with 10 mL of Milli-Q water/methanol (1:1, v/v) solution methanol on and SPE manifold: A volume of 200 mL of the water sample was passed through the HLB-cartridge at a flow rate of ca. 4-6 mL/min. After extraction was completed, the cartridge was washed with 10 mL of water and then air-dried under vacuum for 20 min. Trapped analytes were eluted from the cartridge using 10 mL of 5% acetonitrile in methanol. Extract was diluted up to 10 mL with distilled water in a volumetric flask and analyzed by HPLC.

2.6 Degradation of 17 β -estradiol through sunlight and UV light

Working solutions of 17 β -estradiol were prepared by diluting the 100 mg/L stock solution with methanol. Two aliquots of 2.5 mL were diluted up to a volume of 25 mL with Milli-Q water. One solution was irradiated with two UV lamps (15W, λ_{\max} = 254 nm) and other one was irradiated with sunlight alternating periods of light and darkness of 12 h each. Irradiation was performed in glass tubes of 20 cm long and 2 cm of internal diameter. Irradiation time was over a period of ten days and at different time intervals 17 β -estradiol concentration were determined by HPLC

3. Results and discussion

3.1 HPLC method optimization and analysis

First, the mobile phase was optimized to achieve a fast separation. Thus: two mixtures of acetonitrile: water were evaluated. Mixture A 60:40 (v/v) and mixture B 45:55 (v/v) with 0.1% formic acid for both. It was found that using mixture A the retention time of 17 β -estradiol was 2.1 min in comparison of the 4.2 min with the mobile phase B. All of these experiments were carried out with the Symmetry C18 column. For the μ Bondapack C18 column tested; the retention time was about 50% shorter than the obtained with the Symmetry column. Thus, the final chromatographic conditions chosen were: Symmetry C-18 analytical column, mobile phase A, flow rate 1 mL/min with the UV detector set at 280 nm.

Fig. 1 shows the chromatogram of 17 β -estradiol with a retention time of 2.14 min. Under these experimental conditions hospital wastewater samples were injected to verify possible interferences.

3.2 Validation

The regression equation was linear in the interval of 100-5000 µg/L with a correlation coefficient of 0.9997 for 17 β -estradiol quantification. LOD was 50 µg/L and LOQ of 100 µg/L.

Precision of the method is presented in Table 1. For all concentrations tested, the % RSD was lower than 2. So, the repeatability of standard and sample are suitable for its intended use according to the followed guidelines.

Accuracy of the method was assessed by triplicate analysis of the hospital wastewater samples spiked with 17 β -estradiol standard solution at four different concentrations, recoveries and standard deviation are shown in Table 2.

Specificity (selectivity) of the developed method is demonstrated by a representative chromatogram from hormone-free influent wastewater sample (blank) and the same sample spiked with 17 β -estradiol at 750 µg/L. In Fig. 2, chromatograms are overlapped and it is observed that there is not a significant chromatographic peak interfering with the estradiol signal, which shows the ability of the method to detect the hormone in the presence of others components present in this type of water samples. Therefore, it was concluded that experimental conditions for the separation were appropriated.

We investigated the analytical characteristics of the developed method, such as its linear response range, precision, accuracy and limit of detection and quantification to estimate the efficiency of approach and feasibility of applying it to the analysis of environmental samples.

3.3 Sample Extraction

Analyte recoveries were evaluated by adding 17 β -estradiol standard to the wastewater samples from both the influent and effluent that did not contain the analyte. Recoveries of three replicates of the enriched samples were analyzed to optimize the SPE extraction. Hormone recoveries ranged between 81.41%-104.52% in the influent and from 86.93 – 99.25 % in the effluent. Recoveries showed a small variation between influent and effluent the statistics analysis indicates a standard deviation of 10.13 and %RSD of 11.19 for influent and a deviation standard of 5.74 and %RSD of 6.15 for effluent, which indicates that recoveries in the influent had a higher variability due to the sample complexity and composition.

3.4 Determination of 17 β -estradiol in wastewater samples

The 11 samples analyzed were treated by standard addition of 750 $\mu\text{g/L}$ because the elevated recovery percentage shown. The influent concentration range was from 18.81 to 60.57 $\mu\text{g/L}$ and from 54.63 to 5.29 $\mu\text{g/L}$ for the effluent. The hospital treatment plant of this study is located outdoors, the final process of treatment plant is chlorination which is not a very effective method for removing contaminants, the chlorination leads to effects in endocrine disruptors which degradation is possible through oxidation processes (Hu *et al.*, 2003, Deborde *et al.*, 2004, Lee *et al.*, 2004, Schiliro *et al.*, 2009).

Chlorine (Cl_2) is used as a strong oxidizer disinfectant; this oxidation occurs under water treatment as HOCl^\cdot and OCl^\cdot , it is capable of reacting with organic and inorganic chemicals (Xu *et al.*, 2012). However, under certain circumstances, the oxidants can induce the formation of

potentially harmful products due to their reactivity with components in the water matrix (Deborde and von Gunten, 2008).

Concentrations found in our study are higher than concentrations reported in the literature because these studies were carried out in general hospitals and ours was conducted in a Gynecology Hospital where it is more common for prescription and administration of 17β -estradiol. The concentration levels of 17β -estradiol detected in analyzed wastewater after completing the extractions are summarized in Table 3.

Table 4 shows concentrations of 17β -estradiol in HWWs of several countries compared with concentrations determined in this study. Sim et al conducted sampling in hospital wastewater twice within the months of June and September 2011, another study developed in Korea reported that sampling period was carried out from December to January, a compilation of other studies by Verlicchi et al in 2010 about the found concentration of 17β -estradiol in a hospital wastewater indicates a lower concentration than in our research. This difference in effluent concentrations may be due the number of samples and period of sampling, the analytical quantification methodology, and, mainly because our studies were conducted in a developing country while the other ones were conducted in developed countries where treatment plants might have better contaminant removal processes.

3.5 Degradation of 17β -estradiol by UV light and sunlight

It was observed that during UV and sunlight irradiation in aqueous medium there was degradation of E₂.

The experiment showed more degradation of 17 β -estradiol with sunlight irradiation in comparison with exposure to UV light at 254 nm. Concentration profiles of E2 solutions during irradiation with both light sources are shown in Fig. 3.

Thus, sunlight irradiation produced a more efficient degradation of 17 β -estradiol than the evaluated period of nine days of exposure to UV/Vis, despite the fact that sunlight was not continuous because of the light-dark periods of 12 hours. Half-life for degradation in sunlight, was calculated from the equation $t^{1/2} = \ln 2/k$ corresponding to first order for kinetics of degradation where the value of K was 0.0039, resulting in a half-life of 165.035 hours.

Solar degradation of estrone (E1) in water has been reported elsewhere, however environmental photodegradation of 17 β -estradiol, the most potent natural estrogen has not been thoroughly investigated (Chowdhury et al., 2011). Several laboratory studies which have simulated day, light indicate that both E2 and EE2 were photodegraded in river water with a half-life of at least 10 days under 12 hours of sunlight per day (Jurgens *et al.*, 2002, Mazellier *et al.*, 2008). For the 17 β -estradiol exposed to UV light, the kinetics degradation was calculated from the equation $t^{1/2} = \ln k/2$ (corresponding to the first order, where K is calculated from the equation $y = mx + b$ being $K = m$), with a K value of 0.0034 resulting in an average life of 198.042 hours.

We applied one way analysis of variance (ANOVA) with a two factor model using SPSS Statistics software (significance $p \leq 0.05$) to determine if significant differences exist between UV light and sunlight results. The entered data in the program were by triplicate for each hormone concentration, considering concentration as dependent variable and independent

factors to the two types of radiation and the time analyzing the influence of the type of radiation and the time in the decrease of the concentration of the hormone. Results showed that time of exposure of hormone to sunlight and UV light is statistically significant with a value of $p \leq 0.05$.

4. Conclusions

The HPLC method optimized and validated in this report is rapid, sensitive and specific. Accuracy and precision of the method are within the parameters recommended by tripartite harmonized ICH Guideline (Guideline I.C.H., 2005).

This technique is simple, economic, and with high sensitivity which makes it a good choice for the quantification and identification of 17 β -estradiol in hospital wastewaters.

This method can also be easily used for daily control analysis for monitoring of 17 β -estradiol in wastewater treatment plants.

Degradation experiment indicated that this hormone is easily degraded when it is exposed to UV/Vis or sunlight radiation being more sensitive to sunlight which allows this type of radiation an alternative method for treating wastewater.

Table 1. Method precision including system repeatability, method repeatability and intermediate precision.

Concentration (µg/L)	System Repeatability RSD(%) n=3	Method repeatability RSD(%) n=6	Intermediate precision (area)	
			Samples	Difference % (n=2)
100	0.98			
500	1.22		1	0.023
1000	1.71		2	0.161
2500	1.22	0.077	3	0.096
5000	1.55			

RSD (%), % relative standard deviation
n=number of preparations

Table 2. Recoveries of 17β-estradiol in influent and effluent by solid phase extraction followed by HPLC analysis in hospital wastewater samples.

Concentration (µg/L)	% recovery influent	% recovery effluent n=3
250	82.3 (SD 0.25)	89.71 (SD 0.26)
500	104.52 (SD 0.92)	94.7 (SD 1.34)
750	94.57 (SD 2.56)	99.25 (SD 2.65)
1000	82.66 (SD 1.07)	86.57 (SD 0.82)

Table 3. Concentration of 17 β -estradiol in 11 samplings, detected in the influent and effluent treatment plant of a hospital in the city of Toluca

Sample	Influent concentration	Effluent concentration
	$\mu\text{g/L}$	$\mu\text{g/L}$
1	18.8	ND
2	16.52	27.9
3	35.85	52.41
4	56.55	34.15
5	17.95	9.39
6	30.40	18.55
7	52.37	45.42
8	19.14	9.85
9	57.14	44.13
10	60.57	54.63
11	25.89	5.29

Table 4. Comparison of concentrations found of 17 β -estradiol in HWWs of several countries with concentrations determinates in this study

HWWs Influent	HWWs effluent	Country	References
-	0.1-1 $\mu\text{g/L}$	several studies of literature	(Verlicchi et al., 2010)
0.068–0.130 $\mu\text{g/L}$	0.002–0.021 $\mu\text{g/L}$ 0.025 -0.230 ng/L	Korea Korea	(Sim et al., 2011) (Rosenfeldt and Linden, 2004)
18.81-60.57 $\mu\text{g/L}$	5.29-54.63 $\mu\text{g/L}$.	México	In this work

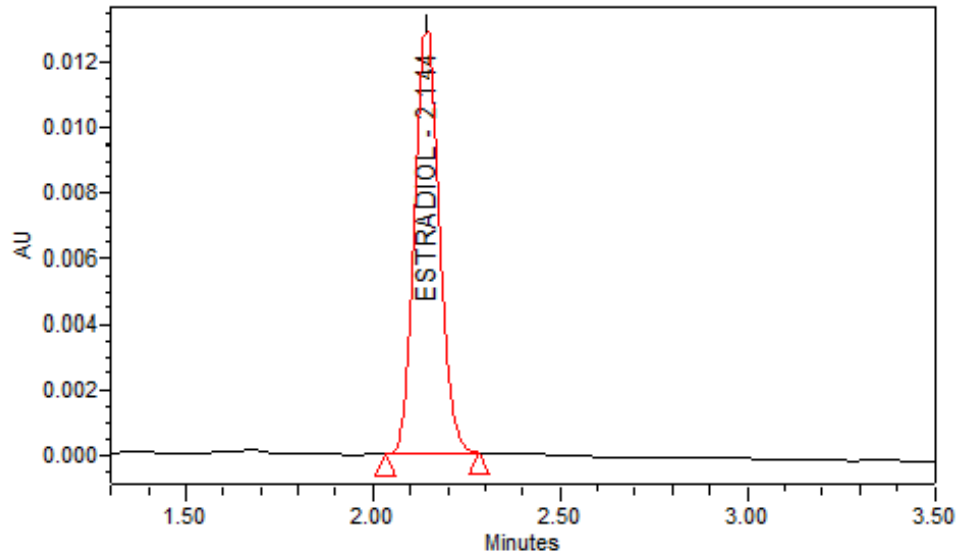


Fig. 1. Chromatogram of 17β-estradiol with retention time of 2.144 min

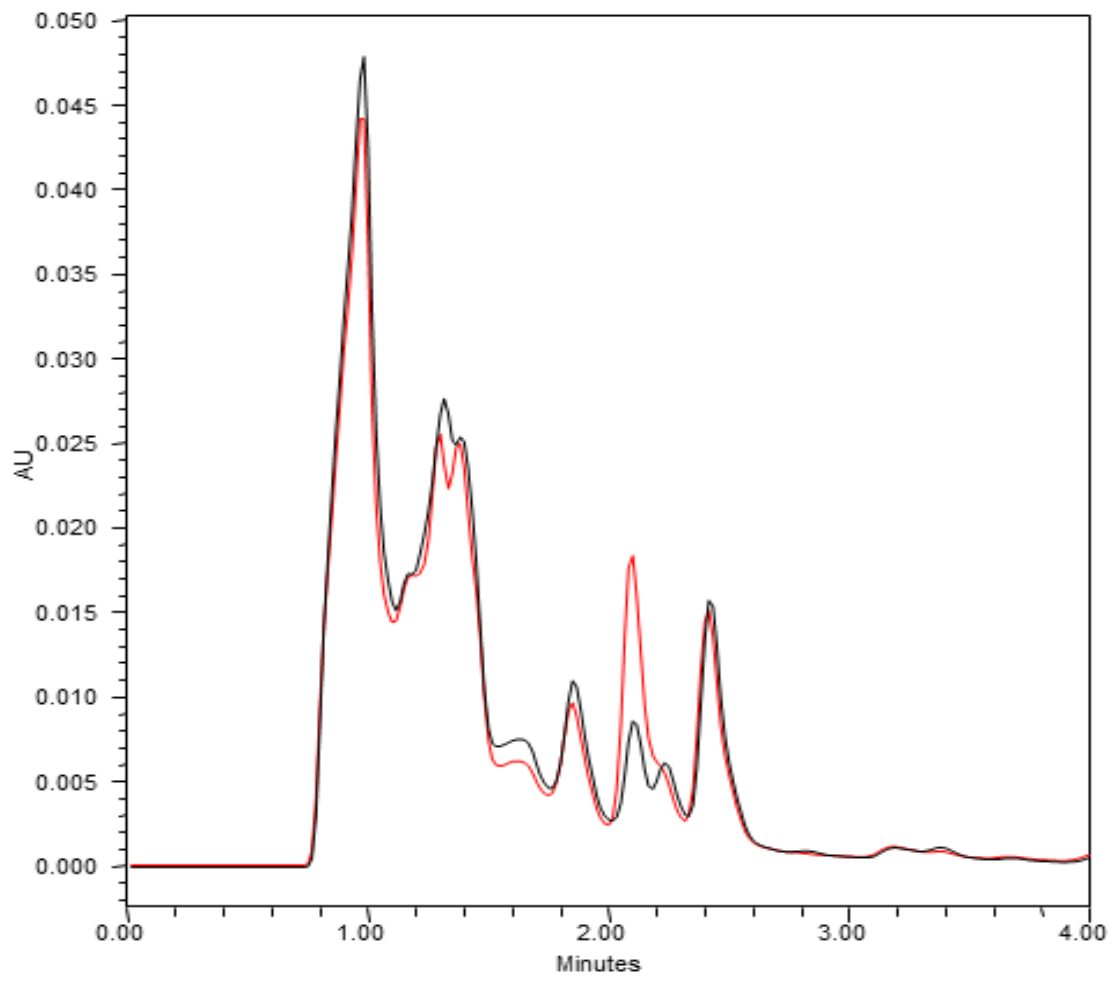


Fig. 2. Superimposed chromatograms of hospital wastewater sample and spiked sample with 17β -estradiol ($750 \mu\text{g/L}$) with retention time 2.11 min.

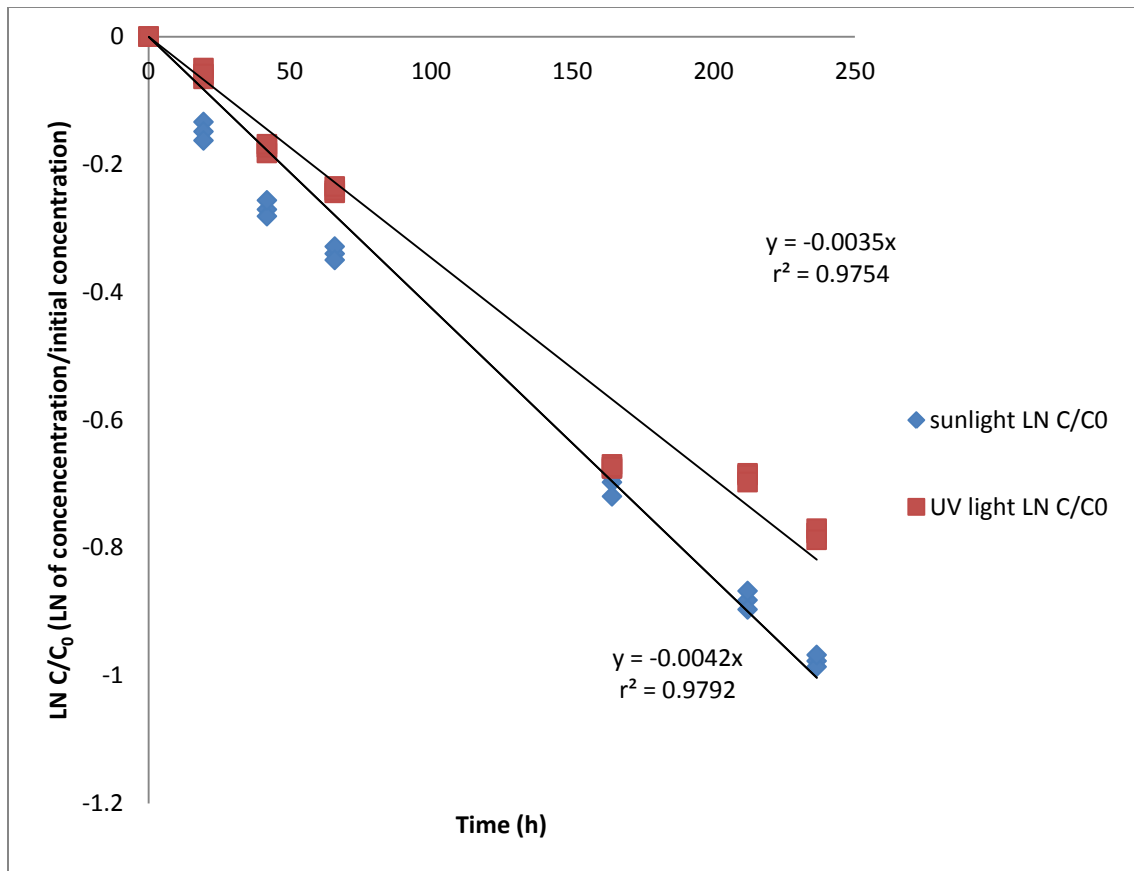


Fig 3. Kinetics of degradation of 17β-estradiol to order one of solutions of 10 mg/ L irradiated with UV disinfection lamps (254nm) and sunlight with periods of light and darkness of 12 hours for both plotting time (hr) vs LN C/Co (LN of concentration/ initial concentration)

References

- CHOWDHURY, R. R., CHARPENTIER, P. & RAY, M. B. 2010. Photodegradation of Estrone in Solar Irradiation. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 49, 6923-6930.
- CHOWDHURY, R. R., CHARPENTIER, P. A. & RAY, M. B. 2011. Photodegradation of 17 β -estradiol in aquatic solution under solar irradiation: Kinetics and influencing water parameters. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 219, 67-75.
- DEBORDE, M., RABOUAN, S., GALLARD, H. & LEGUBE, B. 2004. Aqueous chlorination kinetics of some endocrine disruptors. *Environ Sci Technol*, 38, 5577-83.
- DEBORDE, M. & VON GUNTEN, U. 2008. Reactions of chlorine with inorganic and organic compounds during water treatment-Kinetics and mechanisms: a critical review. *Water Res*, 42, 13-51.
- DESBROW, C., ROUTLEDGE, E. J., BRIGHTY, G. C., SUMPTER, J. P. & WALDOCK, M. 1998. Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 1. Chemical Fractionation and in Vitro Biological Screening. *Environmental Science & Technology*, 32, 1549-1558.
- GUIDELINE, I. C. H. 2005. Q2 (R1): Validation of analytical procedure: text and methodology. *ICH, London*.
- GUTIERREZ-ESPINDOLA, T. 2009. *Proteomic analysis of zebrafish embryos exposed to the endocrine disruptor 17- α -ethinyl-estradiol*. MSc, Autonomous University of Queretaro.
- HAMID, H. & ESKICIOGLU, C. 2012. Fate of estrogenic hormones in wastewater and sludge treatment: A review of properties and analytical detection techniques in sludge matrix. *Water Res*, 46, 5813-5833.
- HANSEN, P. D., DIZER, H., HOCK, B., MARX, A., SHERRY, J., MCMASTER, M. & BLAISE, C. 1998. Vitellogenin – a biomarker for endocrine disruptors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 17, 448-451.
- HU, J., CHENG, S., AIZAWA, T., TERAQ, Y. & KUNIKANE, S. 2003. Products of aqueous chlorination of 17 β -estradiol and their estrogenic activities. *Environ Sci Technol*, 37, 5665-70.
- JURGENS, M. D., HOLTHAUS, K. I., JOHNSON, A. C., SMITH, J. L., HETHERIDGE, M. & WILLIAMS, R. J. 2002. The potential for estradiol and ethinylestradiol degradation in English rivers. *Environ Toxicol Chem*, 21, 480-8.
- LEE, B. C., KAMATA, M., AKATSUKA, Y., TAKEDA, M., OHNO, K., KAMEI, T. & MAGARA, Y. 2004. Effects of chlorine on the decrease of estrogenic chemicals. *Water Res*, 38, 733-9.
- LIU, B. & LIU, X. 2004. Direct photolysis of estrogens in aqueous solutions. *Sci Total Environ*, 320, 269-74.
- LIU, B., WU, F. & DENG, N. S. 2003. UV-light induced photodegradation of 17 α -ethinylestradiol in aqueous solutions. *J Hazard Mater*, 98, 311-6.
- MAZELLIER, P., MEITE, L. & DE LAAT, J. 2008. Photodegradation of the steroid hormones 17 β -estradiol (E₂) and 17 α -ethinylestradiol (EE₂) in dilute aqueous solution. *Chemosphere*, 73, 1216-23.
- ROSENFELDT, E. J. & LINDEN, K. G. 2004. Degradation of endocrine disrupting chemicals bisphenol A, ethinylestradiol, and estradiol during UV photolysis and advanced oxidation processes. *Environ Sci Technol*, 38, 5476-83.

- ROUTLEDGE, E. J., SHEAHAN, D., DESBROW, C., BRIGHTY, G. C., WALDOCK, M. & SUMPTER, J. P. 1998. Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 2. In Vivo Responses in Trout and Roach. *Environmental Science & Technology*, 32, 1559-1565.
- SCHILIRO, T., PIGNATA, C., ROVERE, R., FEA, E. & GILLI, G. 2009. The endocrine disrupting activity of surface waters and of wastewater treatment plant effluents in relation to chlorination. *Chemosphere*, 75, 335-40.
- SILVA, C. P., OTERO, M. & ESTEVES, V. 2012. Processes for the elimination of estrogenic steroid hormones from water: a review. *Environ Pollut*, 165, 38-58.
- SIM, W. J., LEE, J. W., SHIN, S. K., SONG, K. B. & OH, J. E. 2011. Assessment of fates of estrogens in wastewater and sludge from various types of wastewater treatment plants. *Chemosphere*, 82, 1448-53.
- THORPE, K. L., CUMMINGS, R. I., HUTCHINSON, T. H., SCHOLZE, M., BRIGHTY, G., SUMPTER, J. P. & TYLER, C. R. 2003. Relative potencies and combination effects of steroidal estrogens in fish. *Environ Sci Technol*, 37, 1142-9.
- TYLER, C. R., SPARY, C., GIBSON, R., SANTOS, E. M., SHEARS, J. & HILL, E. M. 2005. Accounting for differences in estrogenic responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*: Salmonidae) and roach (*Rutilus rutilus*: Cyprinidae) exposed to effluents from wastewater treatment works. *Environ Sci Technol*, 39, 2599-607.
- VERLICCHI, P., GALLETI, A., PETROVIC, M. & BARCELÓ, D. 2010. Hospital effluents as a source of emerging pollutants: An overview of micropollutants and sustainable treatment options. *Journal of Hydrology*, 389, 416-428.
- XU, N., XU, Y. F., XU, S., LI, J. & TAO, H. C. 2012. Removal of estrogens in municipal wastewater treatment plants: a Chinese perspective. *Environ Pollut*, 165, 215-24.
- ZUO, Y., ZHANG, K. & DENG, Y. 2006. Occurrence and photochemical degradation of 17alpha-ethinylestradiol in Acushnet River Estuary. *Chemosphere*, 63, 1583-90.

RESULTADOS NO PUBLICADOS

7.2 Gestión del muestreo

Como resultado de la gestión del muestreo en la planta de tratamiento de agua residual frente al comité de Enseñanza y Aprendizaje del Hospital de Ginecología y Obstetricia, se emitió un oficio en el cual se otorgó el permiso para realizar el muestreo en dicho hospital; este se muestra a continuación:



Figura 6. Oficio emitido por el Comité de Enseñanza y Aprendizaje del Hospital de Ginecología y Obstetricia

7.3 Caracterización de 17β-estradiol

- **Apariencia**

De acuerdo con la Farmacopea de los Estados Unidos USP, la apariencia del 17β-estradiol es un polvo color blanco.

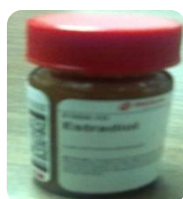
Para la identidad de 17β-estradiol se realizaron las siguientes pruebas analíticas :

- **Determinación de pH**

Se realizó la determinación de pH para el 17β- estradiol en solución acuosa tanto del estándar como del medicamento. En la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 5. Determinación del 17β-estradiol en solución

Medicamento	Estándar
pH 7.6	pH 6
23.7 °C	23.7 °C



- **Espectro de infrarrojo de 17β-estradiol**

Se realizó la técnica de la pastilla, con 5 % de muestra tanto del estándar como del medicamento, con un 95% de KBr en un mortero ágata (cuarzo), posteriormente la muestra se homogenizó y se comprimió en una prensa para formar las pastillas. El equipo empleado fue el espectrofotómetro IR avatar 360.

En la Figura 7, se muestra el espectro de infrarrojo de 17β-estradiol en el que se identificaron los principales grupos funcionales que corresponden a este compuesto.

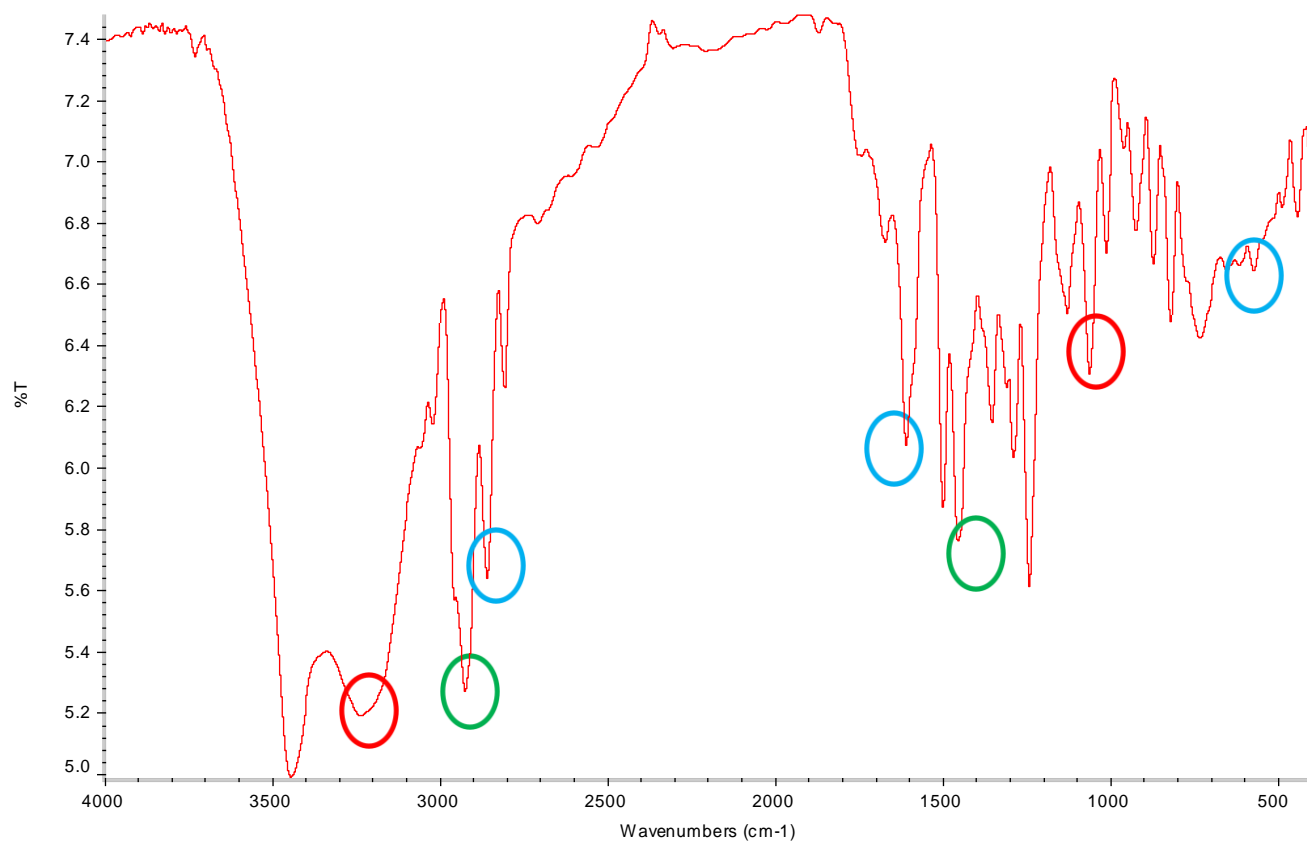


Figura 7. Espectro de infrarrojo de 17β-estradiol

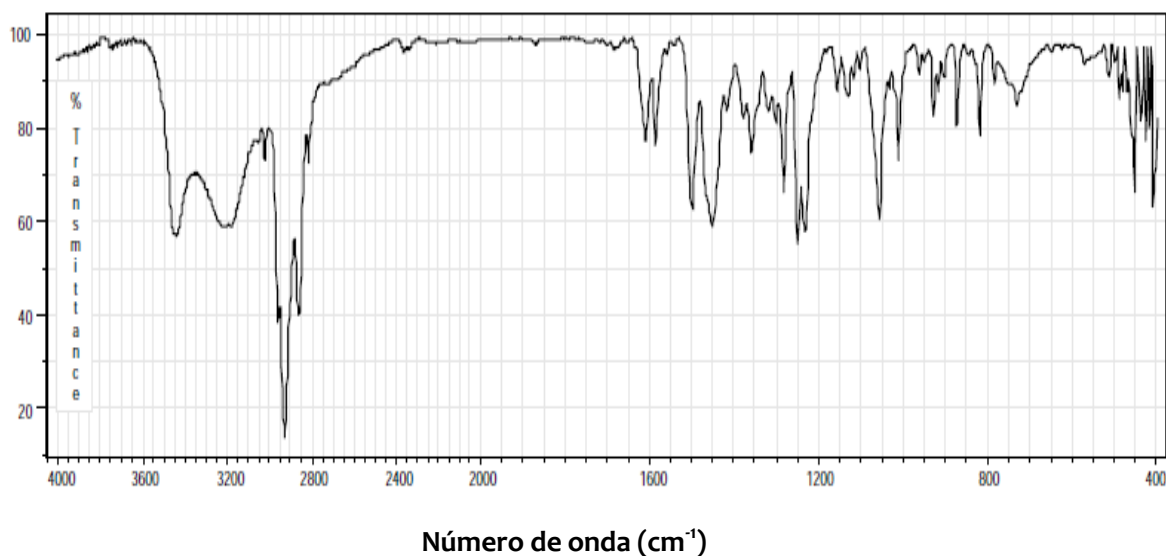
En la Tabla 6, se muestran los grupos funcionales que presenta el 17 β-estradiol en el espectro de infrarrojo, siendo estos el ión hidroxilo (OH), metilos y metilenos (CH₃ y CH₂) y el grupo arilo, los cuales fueron identificados de acuerdo al número de onda característico.

Tabla 6. Grupos funcionales 17β-estradiol

Grupo funcional	λ (nm)
OH	3750-3000 1200-1100
Arilo	3300-2900 1675-1500 1000-650
CH ₃ y CH ₂	3000-2700 1400-1380

- **Espectro de infrarrojo documentado en Sigma Aldrich**

Se encontró en la literatura el espectro de infrarrojo reportado por Sigma Aldrich, con la finalidad de compararlo con el obtenido experimentalmente, lo cual nos indica debido a la información proporcionada por las bandas de absorción la presencia de grupos funcionales OH, CH₃ y CH₂ y el grupo arilo de este compuesto, lo cual comprueba que corresponde a el 17β-estradiol.



7.4 Espectro de UV-visible de 17β-estradiol

La Figura 8, muestra el espectro de 17β-estradiol a una concentración de 10 mg/L obtenido mediante espectrofotometría de UV-visible, en el se observa que la longitud de onda que tiene la máxima absorbancia para esta hormona, se localiza en 280 nm, indica que corresponde a esta hormona, de acuerdo a lo establecido en la literatura.

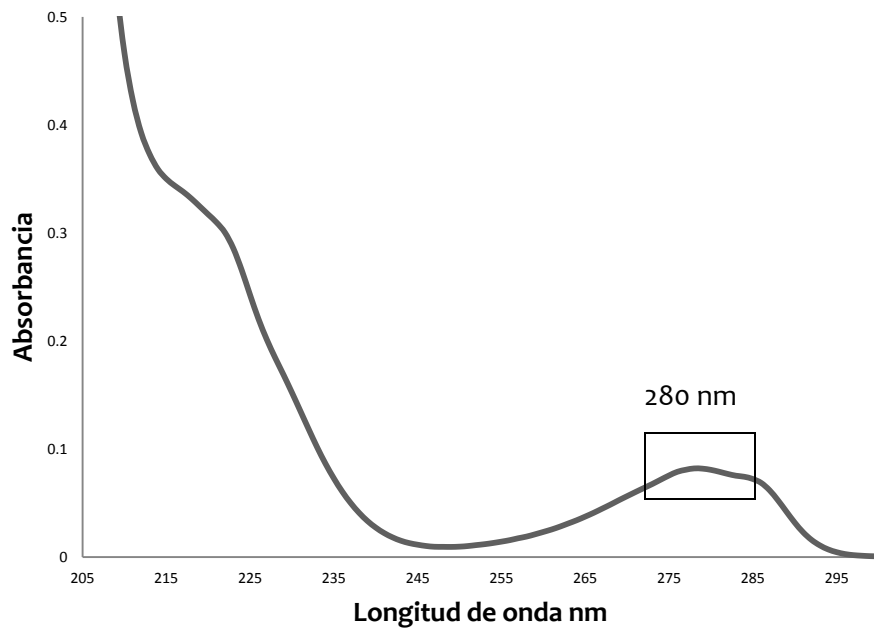
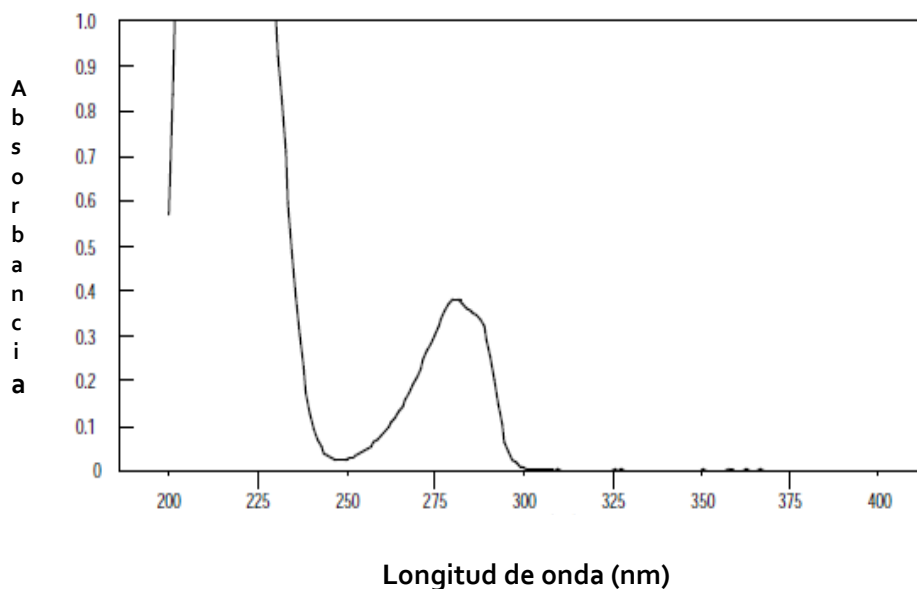


Figura 8. Espectro de 17β -estradiol UV-visible

- **Espectro de UV-visible documentado en Sigma Aldrich**

Se muestra el espectro de UV-visible de 17β -estradiol proporcionado por Sigma Aldrich, el cual brinda información útil para conocer en qué longitud de onda esta hormona presenta la máxima absorbancia, el resultado del espectro obtenido experimentalmente es muy semejante, con una longitud de máxima absorbancia en 280 nm, solo se observa la modificación de la escala de absorbancia debido a que la concentración evaluada fue diferente a la de este estudio.



7.5 Adecuabilidad del sistema, evaluación de columnas

Se optimizaron las condiciones de separación cromatográfica evaluando dos columnas: Symmetry C₁₈ 5µm 3.0x 250mm Waters y µBondapack C₁₈ 5µm 4.6x 250mm, utilizando dos fases móviles, la fase A: agua y la fase B: ácido fórmico 0.1 % + agua y acetonitrilo, en ambas se modificaron las proporciones, para mejorar la separación. Se inyectó la muestra por triplicado para obtener los parámetros cromatográficos: tiempo de retención, número de platos teóricos (N), factor de capacidad (k'). A continuación se presentan los parámetros obtenidos.

Tabla 7. Parámetros cromatográficos para la adecuabilidad de la columna

Columna	tr	N	k'	α
µBondapack C ₁₈ 5µm 4.6x250mm	4.88	6080.560	1.72	0.521
	4.91	5900.542	1.83	0.645
	4.925	6190.456	1.92	0.531
Promedio		6057.186	1.823	0.565
Desviación estándar		146.363	0.100	0.068
% DER		2.416	5.493	12.17
Symmetry C ₁₈ 5µm 3.0x250mm	2.03	6170.447	3.74	2.057
	1.98	6270.309	3.8	2.181
	2.11	6520.213	3.9	2.112
Promedio		6320.323	3.813	2.116
Desviación estándar		180.166	0.080	0.062
% DER		2.85	2.119	2.935

Se utilizaron dos tipos de columna µBondapack C₁₈ 5µm 4.6x250mm y Symmetry C₁₈ 5µm 3.0x250mm para llevar a cabo la adecuabilidad de la columna y poder determinar cuál de las dos columnas presentaba los valores idóneos.

- **Conclusión**

Los parámetros evaluados: respuesta, N , k' , α , mostraron lo siguiente, la columna Symmetry C₁₈ 3.0x250mmx5 μ m tuvo un promedio de platos teóricos (N) de 6320.323, un factor de capacidad (k') de 3.813 y un factor de selectividad (α) de 2.116; para la columna μ Bondapak C₁₈ 5 μ m 4.6x250mm el promedio de platos teóricos (N) fue de 6057.818, un factor de capacidad (k') de 1.823 y un factor de selectividad (α) de 0.565, considerando estos resultados se decidió elegir la primera columna, los valores aceptados para α están entre 1 y 2, lo cual indica que hay una buena separación entre los picos y para k' mayor a 2, para determinar la retención del analito, el número de platos teóricos que representa la eficiencia de la columna fue muy similar para ambos casos.

7.6 Validación del sistema analítico

Se evaluó la linealidad del método, a continuación se muestran los resultados del estudio, los cuales cumplen con los criterios de aceptación de acuerdo a "The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use ICH, la guía Q2 (R) Validation of Analytical Procedures: Methodology" para la relación de cantidad adicionada vs cantidad recuperada utilizando el método de estimación de mínimos cuadrados, con una r^2 mayor a 0.990 y un %DER de porcentaje de recobro, no mayor al 2%. La Figura 9 muestra el cromatograma de 17 β -estradiol con un tiempo de retención de 2.144 minutos.

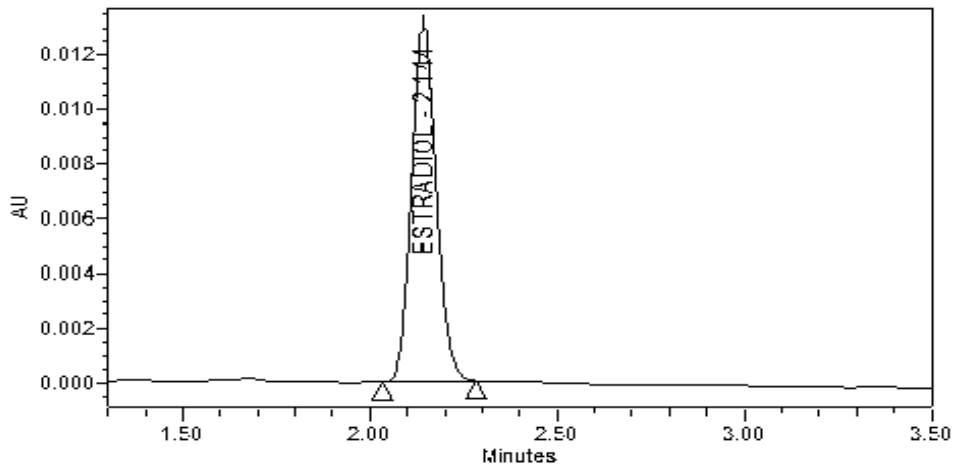


Figura 9. Cromatograma de 17β-estradiol con tiempo de retención 2.144

- **Linealidad del sistema de 17β-estradiol**

Se evaluó la linealidad del método para el 17β-estradiol, mediante un análisis de 5 soluciones estándar en un rango de concentración de (100-5000 µg/L) preparadas de la solución stock, en la Tabla 8 se muestran los resultados de este parámetro, los cuales cumplen con los criterios de aceptación de la ICH, que incluye la guía Q2 (R) y en la Figura 10, se muestra la gráfica de linealidad del sistema, donde se graficó concentración vs área.

Tabla 8. Linealidad del sistema analítico

Concentración de la muestra µg/L)	Área
100	668.33
500	3635.33
1000	7662
2500	17671
5000	35816.22

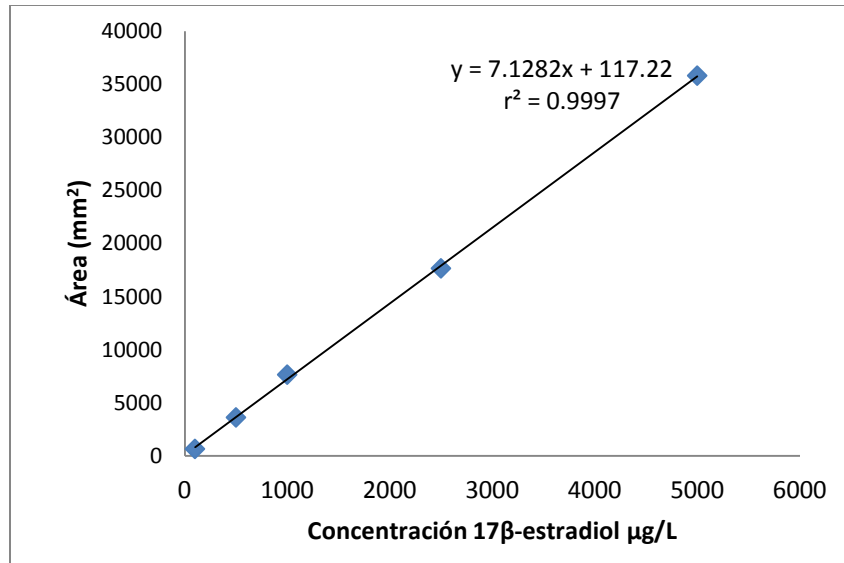


Figura 10. Representación de la concentración vs área (linealidad)

- **Conclusión**

La curva de la linealidad mostro una r^2 de $0.9997 > 0.990$ como criterio aceptable, con una ecuación de la recta $y=7128.2+117.22$. Con un valor de pendiente $m=7128.2$ y b , la ordenada al origen de 117.22.

- **Verificación del límite de detección y de cuantificación**

Se prepararon soluciones en forma de mayor a menor concentración con la finalidad de conocer la concentración que proporcione una relación señal/ruido (S/R) alrededor de 3 para el LD y de 10 para el LC.

Tabla 9. Verificación del límite de detección y límite de cuantificación

Inyección	LC 17β-estradiol S/R	Inyección	LD 17-βestradiol S/R
1	14.0	1	4.0
2	12.6	2	3.2
3	11	3	6.2
4	12.25		
5	10.5		
6	8.0		

- **Conclusión**

Se calculó la S/R encontrándose en un rango de valor de 3-6 para el LD y de 8-14 para el LC, que está alrededor de 3 y 10 de acuerdo a lo establecido en la ICH.

- **Verificación de límite de cuantificación de la linealidad del sistema de 17β-estradiol**

Para la verificación de la linealidad se realizaron 6 inyecciones de 17β-estradiol a una concentración de 100 µg/L, donde se calculó un porcentaje de desviación que se mantuvo en un intervalo de 129.6-116.94%. En la tabla 10 se muestran estos resultados.

Tabla 10. Verificación de la linealidad del sistema

Inyección	Área	Concentración (µg/L)	Concentración calculada (µg/L)	% de desviación
1	771	100	129	129.615
2	708	100	121	121.303
3	675	100	116	116.949
4	711	100	121	121.699
5	752	100	127	127.108
6	749	100	126	126.712
Promedio	727.666			
Desviación estándar	35.674			
%DER	4.902			

- **Conclusión**

Se obtuvo un porcentaje de desviación entre 116.949-129.615 % que entra dentro del intervalo establecido en la ICH de 70-130% (calculada con exactitud) y un porcentaje de desviación estandar relativa de 4.902, que es $\leq 15\%$ para concentraciones menores a 500 µg/L.

- **Exactitud del sistema de 17β-estradiol**

Desviación de la linealidad

Los resultados de las pruebas de desviación de la linealidad fueron preparadas nueve soluciones estándar a tres niveles de concentración (500 µg/L, 2500µg/L y 5000 µg/L); se calculó la concentración experimental conforme a la ecuación de la regresión lineal ($y=7128.2+117.22$).

Cada desviación se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

% Desviación = Concentración calculada * 100/ concentración teórica

- **Conclusión**

El porcentaje de desviación estuvo en un intervalo entre 116.949 -129.615 %, que se encuentra dentro del aceptable por la ICH siendo este de 80-120%.

Tabla 11. Evaluación de la exactitud del sistema analítico

Inyección	Área	concentración (µg/L)	Concentración calculada	% desviación
1	3351	505	470	93.074
2	3533	505	494	97.829
3	3422	505	559	110.693
Promedio	3435.333			100.532
Desviación estándar	91.729			
%DER	2.670			
1	17466	252.5	233.2	92.372
2	17898	252.5	238.9	94.629
3	17649	252.5	235.7	93.328
Promedio	17671			93.443
Desviación estándar	216.83			
%DER	1.227			
1	37719	505	500.5	99.101
2	35765	505	474.7	93.996
3	33965	505	450.9	89.293
PROMEDIO	35816.333			94.130
Desviación estándar	1877.526			
%DER	5.242			

- **Conclusión**

Los resultados para la exactitud (desviación de la linealidad) obtenidos mostraron un porcentaje de desviación que estuvo en un intervalo de $80-120\% \leq 20.0\%$, por lo tanto la exactitud del método es aceptable para las tres concentraciones de 17β -estradiol probadas.

- **Robustez del sistema de 17β -estradiol**

La robustez es una medida de la capacidad para mantenerse sin afectaciones por pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método durante el uso normal.

Se evaluó la robustez del sistema, modificando la composición de la fase móvil 50:50 (acetonitrilo: agua) comparada con la condición normal de 60:40 (acetonitrilo:agua). Además se cambió la columna Symmetry C18 $3.0 \times 250 \text{ mm} \times 5 \mu\text{m}$ por la columna Agilent Eclipse XDB-C18 $5 \mu\text{m} \times 4.6 \times 250 \text{ mm}$. En cada condición se analizó la misma muestra por triplicado.

A continuación se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 12. Robustez del sistema analítico

Prueba	Variable	Condición original	Condición modificada
1	Fase Móvil	Acetonitrilo: Agua (60:40) v/v	Acetonitrilo: Agua (50:50) v/v Acetonitrilo : Agua (65:35) v/v
2	Flujo	1.0 mL/min	0.8 0.7

- **Resultados de las condiciones originales 60:40 (Acetonitrilo: agua) con flujo de 1 mL/min**

Inyección	Área	Tiempo de retención	T
1	17543	2.12	1.60
2	17530	2.086	1.54
3	17796	2.052	1.50

- Resultados con las condiciones modificadas de fase móvil 50:50 (Acetonitrilo: agua)

Inyección	Área	Tiempo de retención (min)	T
1	17543	4.2	1.53
2	17530	4.1	1.55
3	17796	4.15	1.60

- Resultados con las condiciones modificadas de fase móvil 65:35 (Acetonitrilo: agua)

Inyección	Área	Tiempo de retención(min)	T
1	17568	1.6	1.82
2	17632	1.50	1.76
3	17631	1.6	1.72

- Resultados con las condiciones modificadas de la columna con un flujo de 0.8 mL/min

Inyección	Área	Tiempo de retención (min)	T
1	17066	2.52	1.65
2	17369	2.6	1.68
3	17016	2.57	1.71

- Resultados con las condiciones modificadas con la columna con un flujo de 0.9 mL/min

Inyección	Área	Tiempo de retención (min)	T
1	17076	2.3	1.45
2	17653	2.35	1.36
3	17016	2.4	1.38

- **Conclusión**

Con la modificación de la fase móvil original (60: 40) acetonitrilo: agua, por la fase móvil con una proporción (65:35) y (50:50) respectivamente, se observó una alteración del tiempo de retención del analito, con una mayor cantidad de fase acuosa el tiempo de retención aumenta, lo cual indica que el analito tarda mayor tiempo en eluir de la columna por su menor afinidad por el agua, contrario si se adiciona una cantidad mayor de acetonitrilo. El tiempo de retención de 17 β -estradiol obtenido en el cambio de proporción de fase móvil es mayor \pm 20% comparado con el obtenido bajo condiciones originales, por lo tanto no es robusto este cambio.

El tiempo de retención de 17 β -estradiol obtenido cuando se modificó el flujo fue de \pm 20% comparado con el obtenido bajo condiciones originales. Con base en lo anterior el método es robusto al modificar el flujo.

- **Precisión del sistema de 17 β -estradiol**

- ✚ Repetitividad del sistema

Se evaluó la precisión del sistema, inyectando la muestra 6 veces a una concentración de 100 μ g/L, se calculó la desviación estándar (DE) y la DER empleando todos los resultados obtenidos, cumpliendo con los criterios de aceptación. A continuación se muestran los resultados.

Tabla 13. Precisión del sistema 17 β -estradiol


Inyección	Área	RT
1	7400	2.082
2	7465	1.98
3	7221	2.05
	7327	2.11
	7421	2.114
	7328	2.09
Promedio	7360.333	2.071
Desviación estándar	86.924	0.050
%DER	1.180	2.421

- **Conclusión**

El % DER de áreas es menor a 15.0% para concentraciones menores a 0.05 % (500 µg/L)

El %DER para TR es menor a 5.0%

- **Precisión intermedia**

-  **Reproducibilidad**

La reproducibilidad del sistema se realizó mediante un análisis, con seis soluciones diferentes de estándar de 17β-estradiol a una concentración de 2500 µg/L. La prueba se realizó en dos días diferentes y con dos analistas distintos. Los resultados fueron los siguientes:

Tabla 14. Precisión intermedia del sistema cromatográfico 17β-estradiol

Inyección	Área Día 1	Área Día 2	% Diferencia
1	18503	17898	0.033
2	19583	16860	0.161
3	19157	17466	0.096
4	19458	17649	0.102
5	18691	17934	0.042
6	18840	18225	0.033

- **Conclusión**

La diferencia entre las áreas del análisis de precisión intermedia de 17β-estradiol indicó un porcentaje de diferencia □ al 2%, lo cual indica que es aceptable.

7.7 Degradación de 17β-estradiol por luz UV y luz solar por cromatografía de líquidos de alta resolución

La determinación de la degradación de 17β-estradiol se realizó con una solución de ésta hormona a una concentración de 10 mg/L mediante luz UV y luz solar en un periodo de 9 días, la cual se muestra en las Figuras 11 y 12 donde se grafico concentración (mg/L)vs tiempo (h).

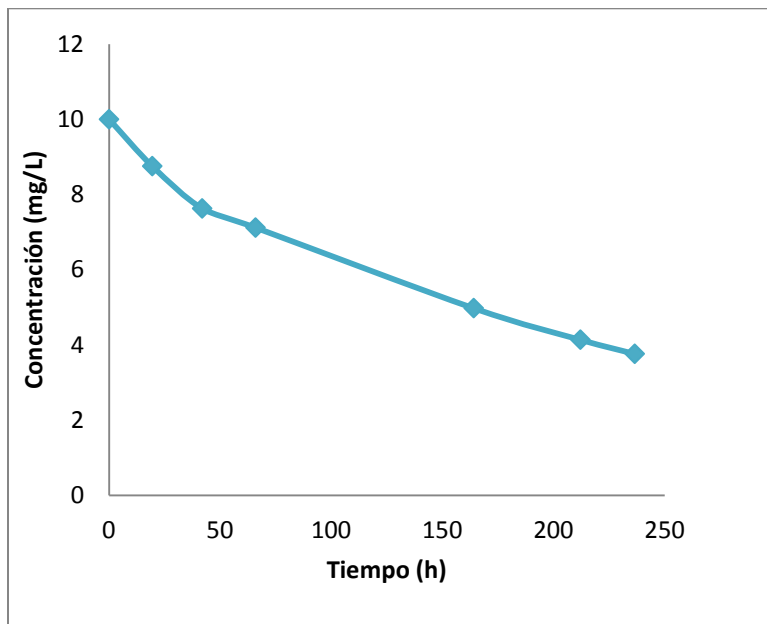


Figura 11. Degradación de 17β-estradiol por luz solar.

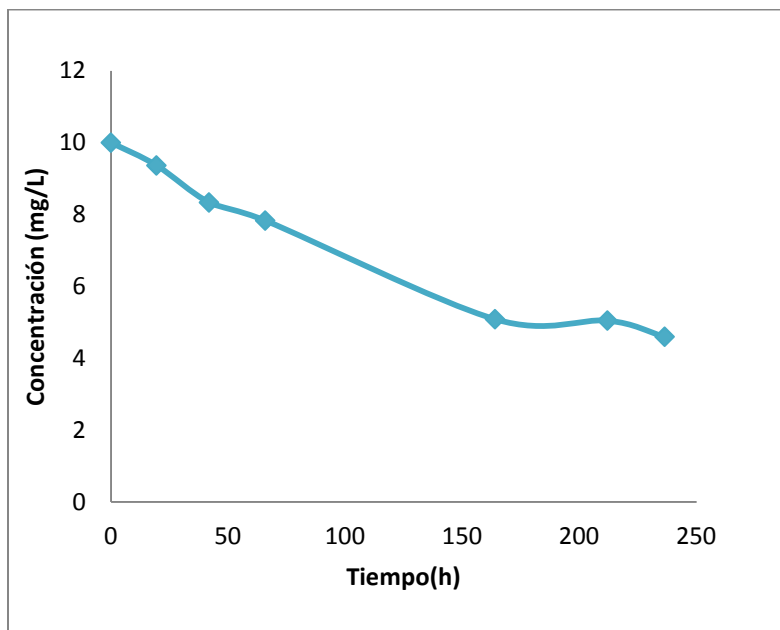


Figura 12. Degradación de 17β-estradiol por luz UV.

En las siguientes gráficas se puede observar una mayor disminución de la concentración de la hormona con luz solar que con luz ultravioleta, lo cual puede deberse al resultado que el primer tipo de radiación comprende el espectro electromagnético además de generar calor.

7.8 Recobro por extracción en fase sólida en muestras de agua desionizada

La exactitud del método se evaluó por medio de recobros a diferentes concentraciones de 17β -estradiol comprendidas dentro del intervalo estudiado. Se prepararon soluciones con agua desionizada por triplicado de las concentraciones (250, 500, 750 y 1000 $\mu\text{g/L}$) probadas para los recobros.

En la Tabla 15, se muestra el porcentaje de recobro de muestras de agua desionizada con 17β -estradiol adicionado determinando los recobros mediante extracción en fase sólida utilizando cartuchos Oasis HLB.

Tabla 15. Porcentaje de recobro en muestras de agua desionizada a diferentes concentraciones de 17β -estradiol

% de recobro	Concentración ($\mu\text{g/L}$)			
	250	500	750	1000
	95.94	105.77	100.56	113.02
	91.41	102.39	100.83	108.49
	95.94	103.23	103.83	111.43
Promedio	94.43	103.79	101.74	110.98
Desviación estándar	0.026	1.75	1.82	2.29
% DER	2.76	1.69	1.79	2.07

Los resultados promedio de los porcentajes de recobros obtenidos fueron para 250 $\mu\text{g/L}$ de 94.43%, 500 $\mu\text{g/L}$ de 103.79%, 750 $\mu\text{g/L}$ de 101.74% y 1000 $\mu\text{g/L}$ de 110.98%, los cuales indicaron resultados adecuados para una buena retención del analito. Para las cuatro concentraciones de recobros probados el promedio se encuentra entre 94.43-110.98%, que entra en un intervalo de 80-120 %.

7.9 Porcentaje de recobro de muestras de agua residual mediante extracción en fase sólida

En la Tabla 16. Se muestra el porcentaje de recobro obtenido de la extracción en fase sólida, realizada empleando cartuchos Oasis HLB, de muestras de agua residual enriquecidas con diferentes concentraciones de 17 β -estradiol (250 μ g/L, 500 μ g/L, 750 μ g/L y 1000 μ g/L).

Tabla 16. Porcentaje de recobro en muestras de agua residual mediante extracción en fase sólida

200 mL de muestra	Afluyente	Efluente	Afluyente	Efluente	Afluyente	Efluente	Afluyente	Efluente
	250 μ g/L		500 μ g/L		750 μ g/L		1000 μ g/L	
% de recobro	82.1	89.94	103.74	96.02	96.19	102.07	82.82	83.35
	82.52	89.43	106.94	100.14	91.61	98.86	81.02	87.36
	82.3	89.75	102.87	95.61	95.90	96.81	82.02	90.09
Promedio	82.306	89.71	104.52	97.25	94.57	99.25	82.05	86.93
Desviación estándar	0.21	0.26	2.13	2.50	2.56	2.65	0.93	3.39
%DER	0.25	0.28	2.04	2.57	2.71	2.67	1.13	3.90

La evaluación de recobros en muestras de agua residual con la adición de la hormona mostró una variación de recobros del analito con diferentes concentraciones probadas tanto del afluyente como del efluente, con un porcentaje de recobro de 82.3-89.7, para una concentración de 250 μ g/L de 104.52-97.25%, para una concentración de 500 μ g/L, de 94.57-99.25 % para 750 μ g/L y de 82.05-86.93% para 1000 μ g/L, la variación se debió a que la muestra presenta interferencias al ser muy compleja la matriz ,afectando la variación del recobro del analito, si se compara estos porcentajes de recobro con los obtenidos de muestras de agua desionizada se observa que es mayor al obtenido con muestras de agua residual.

7.10 Cromatogramas de muestras de agua residual de la planta de tratamiento del Hospital de Ginecología y Obstetricia enriquecidas con 17β -estradiol

En las Figuras 13 y 14 se muestran los cromatogramas de las muestras de agua residual adicionadas con 17β -estradiol ($750 \mu\text{g/L}$) del efluente y afluente de la planta de tratamiento del Hospital de Ginecología y Obstetricia de la Ciudad de Toluca.

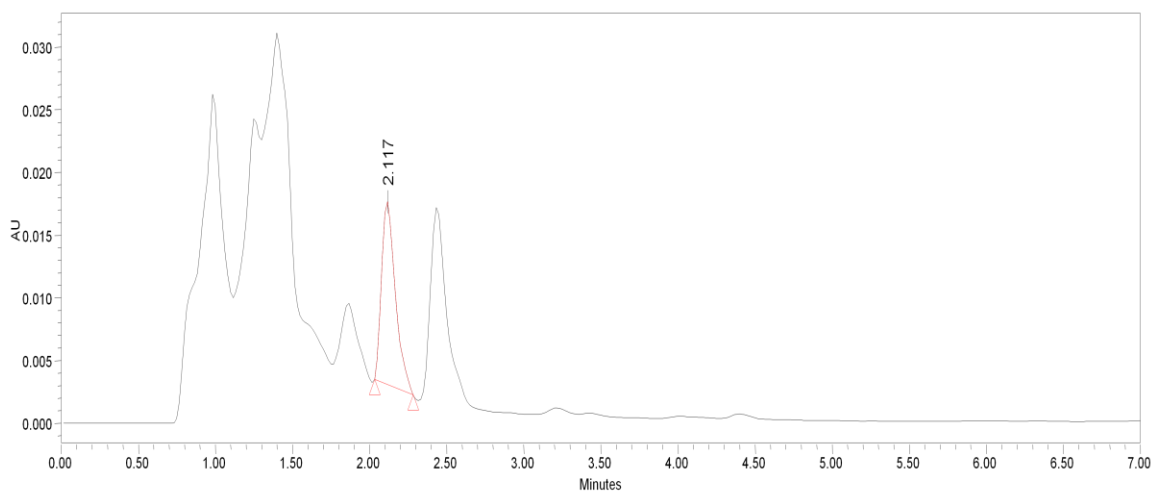


Figura 13. Cromatograma del efluente adicionado con el estándar de 17β -estradiol con un tiempo de retención de 2.117

En los cromatogramas de las Figuras 13 y 14 se muestra la presencia de 17β -estradiol con un tiempo de retención de aproximadamente de 2.11. Además se observa la presencia de otros contaminantes que no llegan a interferir en la cuantificación.

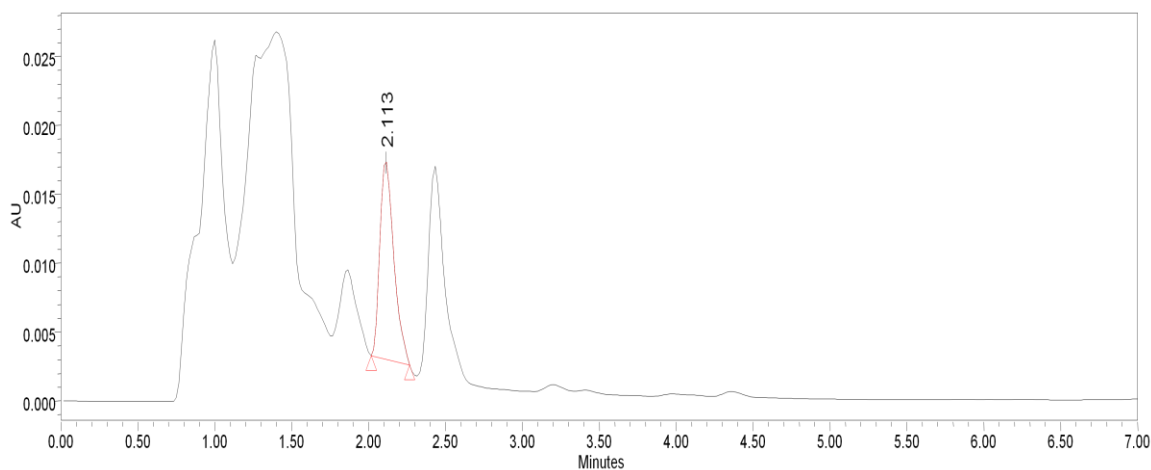


Figura 14. Cromatograma del afluente adicionado con el estándar de 17β -estradiol con un tiempo de retención de 2.113 min.

7.11 Comparación de los resultados obtenidos con los reportados en la literatura

En la Tabla 17, se muestra las concentraciones del efluente y afluente de agua residual de tres hospitales reportados en la literatura y el obtenido experimentalmente en este trabajo.

Tabla 17. Concentraciones de afluente y efluente de agua residual de un hospital

HWWs Afluente (concentración)	HWWs efluente (concentración)	País	Referencias
-	0.1-1 µg/L	Diferentes estudios de la literatura	(Verlicchi <i>et al.</i> , 2010)
0.068–0.130 µg/L	0.002–0.021 µg/L	Korea	(Sim <i>et al.</i> , 2011)
	0.025 -0.230 ng/L	Korea	(Rosenfeldt y Linden, 2004)
18.81-60.57 µg /L	5.29-54.63 µg/L.	México	En este trabajo

Como se puede observar el valor determinado de este trabajo es más alto que los reportados en la literatura, esto se puede atribuir a que es un hospital que atiende a pacientes del sexo femenino y este tipo de hormona es producida de forma natural en las mujeres. Por lo tanto, las concentraciones de esta hormona se ven incrementadas en las aguas residuales del hospital.

7.11 Análisis estadístico (ANOVA)

El análisis de varianza de dos factores, se utiliza con datos separados en categorías formadas de acuerdo con dos factores. Primero se realiza una prueba de interacción entre los dos factores, después se realiza una prueba para determinar si el factor renglón (bloques) tiene algún efecto y también para determinar si el factor columna (tratamientos) tiene algún efecto. Existe una interacción entre los dos factores, si uno de los dos factores cambia en las diferentes categorías del otro factor. Para evaluar estadísticamente la degradación de 17β-estradiol mediante luz UV y luz solar se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) con un modelo de dos factores con el programa SPSS versión 17 presentando diferencia significativa respecto a los resultados obtenidos, con un nivel de confianza de 95%, el valor de P, asociado a (Sig),

obtenido menor a 0.05 indica que el tiempo interfiere en la degradación de 17β -estradiol por luz UV y luz solar, los resultados obtenidos se presentan a continuación:

Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Concentración de la hormona

Fuente		Tipo III Suma de Cuadrado	df	Cuadrados medios	F	(Sig.)
Intercepto	Hipótesis	2002.519	1.000	2002.519	56.290	0.000
	Error	243.347	6.840	35.575 ^a		
Radiación	Hipótesis	3.738	1	3.738	18.921	0.005
	Error	01.185	6	0.198 ^b		
Tiempo	Hipótesis	192.205	6	32.034	162.144	0.000
	Error	01.185	6	0.198 ^b		
Radiación * Tiempo	Hipótesis	01.185	6	0.198	49.658	0.000
	Error	0.111	28	0.004 ^c		

a. $MS(\text{Radiación}) + MS(\text{Tiempo}) - MS(\text{Radiación} * \text{Tiempo})$

b. $MS(\text{Radiación} * \text{Tiempo})$

c. MS error

- **Gráfica de cajas y bigotes**

En la Figura 15, se muestran las gráficas de cajas y bigotes del análisis de datos de los tipos de radiación utilizados, luz solar y luz UV con la disminución de la concentración de 17β -estradiol.

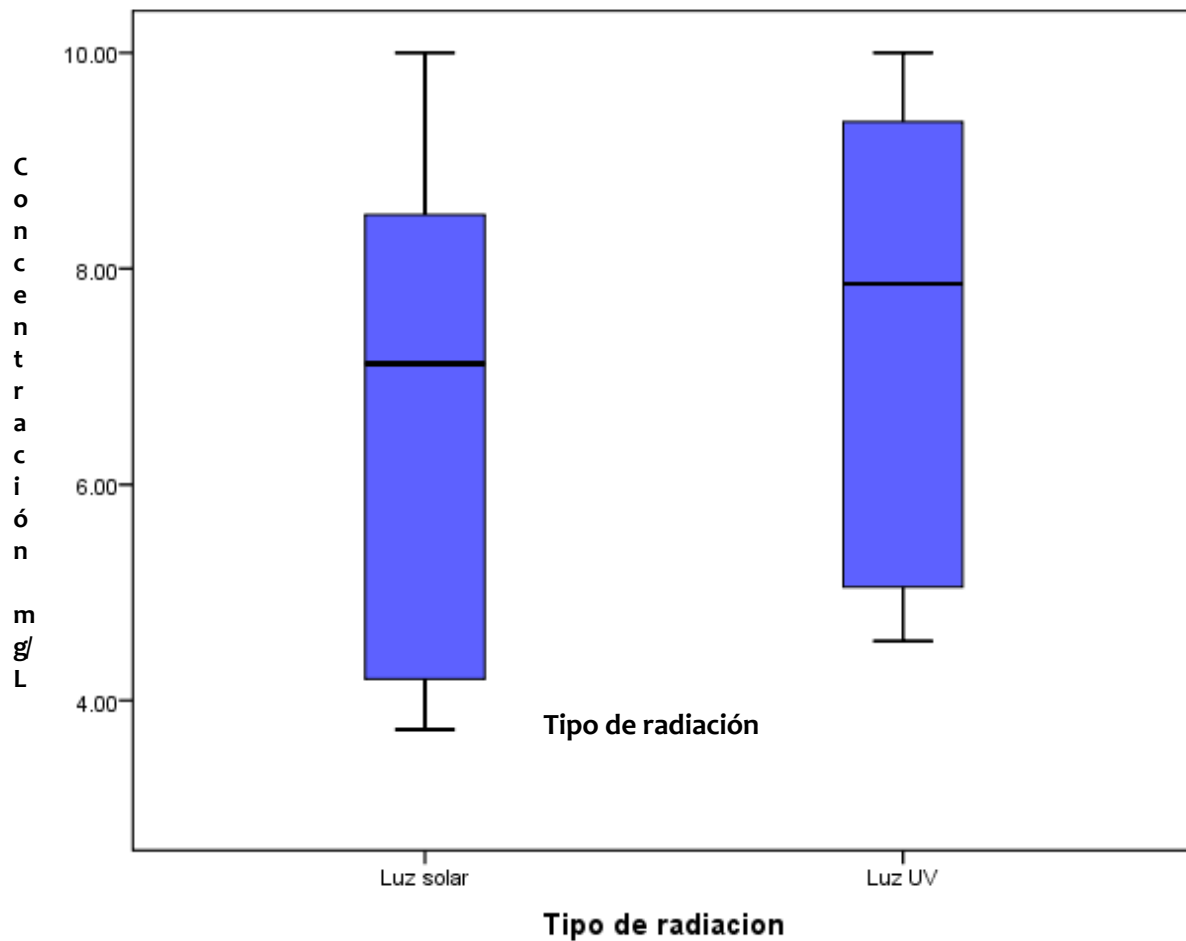


Figura 15. Gráfica de cajas y bigotes comparando luz UV y luz solar

Se muestran las gráficas de cajas y bigotes de los dos tipos de radiación luz solar y luz UV a las que fue expuesta la hormona (17β -estradiol) respecto a su concentración en las que se puede observar que existe una mayor eficiencia de la radiación por medio de luz solar debido a que hay una disminución mayor de la concentración de esta. En la gráfica de luz solar se muestran valores más dispersos, después de la mediana y la gráfica de luz UV indica una mayor simetría entre los datos obtenidos a este tipo de exposición.

- **Gráfica de barras de error**

En la Figura 16, se muestra la gráfica de barras de error comparando los dos tipos de radiación solar y ultravioleta respecto a la disminución del % de concentración de la hormona.

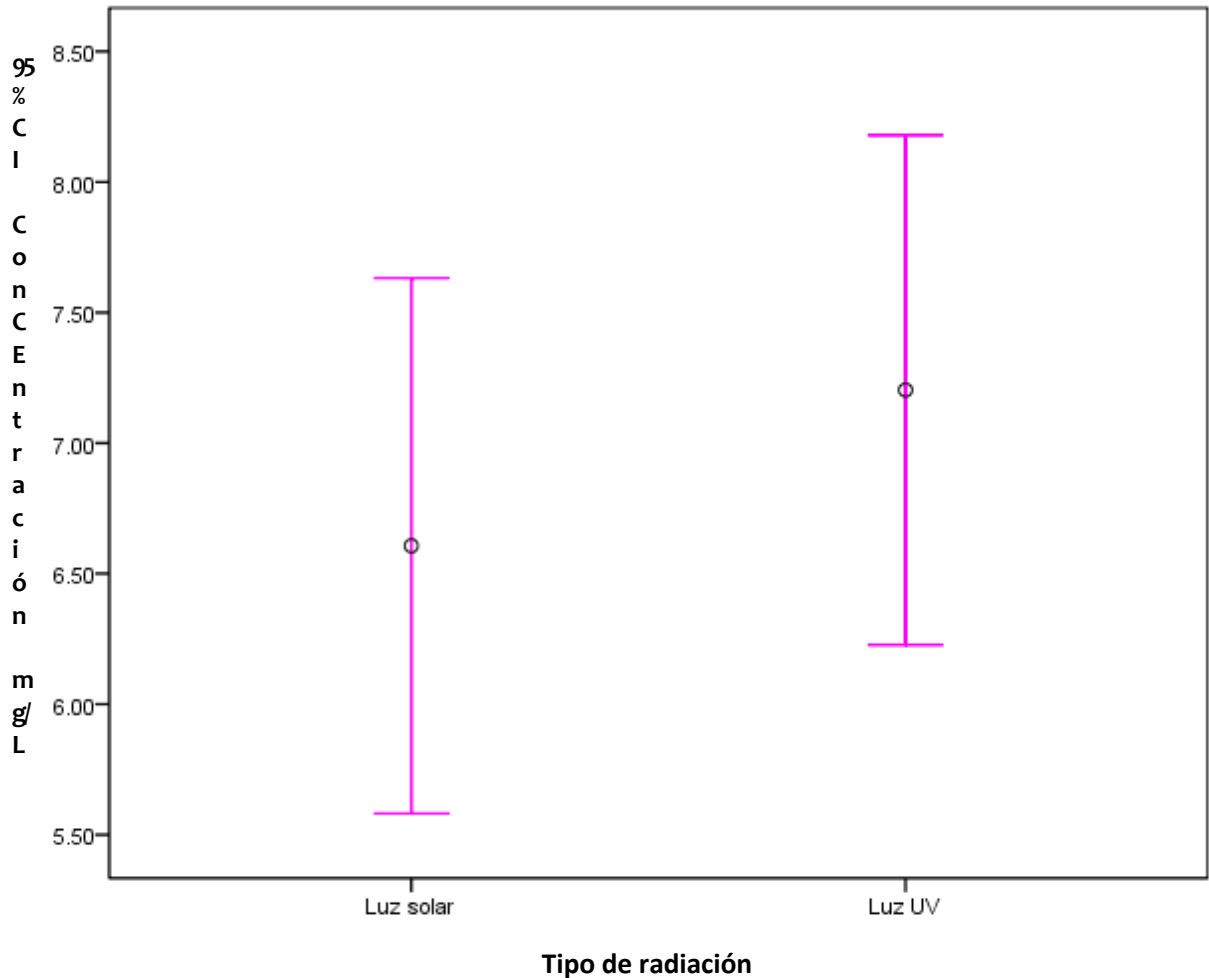


Figura 16. Gráfica de barras de error de la degradación de 17β-estradiol comparando la luz solar y luz UV

Se muestran las gráficas de barras de error de dos tipos de radiación luz UV y luz solar respecto a la concentración de la hormona (17β-estradiol) con un intervalo de confianza del 95 %, las cuales indican las medias de la concentración de cada tipo de radiación indicando que los datos se encuentran dispersos, en la luz solar la media se mantuvo presente cerca de una concentración de 6.6 mg/L y de luz UV a una concentración de 7.3 mg/L, en las que se observa que existe una diferencia significativa entre los dos tipos de radiación, considerando una importante variación entre el tipo de radiación empleado con la degradación de la hormona.

8. CONCLUSIONES

La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución es un método analítico sensible para la cuantificación e identificación de 17β -estradiol, la validación presentó parámetros adecuados de exactitud, precisión, repetitividad y linealidad en un rango de 100-5000 $\mu\text{g/L}$. De acuerdo con la ICH las (guías Q2A y Q2B), entra dentro de las especificaciones.

A continuación se presenta la Tabla 18, con los resultados obtenidos de los parámetros de validación evaluados.

Tabla 18. Parámetros de validación evaluados

Límite de detección y límite de cuantificación	Precisión del sistema	Precisión intermedia del sistema	Robustez del sistema	Exactitud del sistema
LOD 50 $\mu\text{g/L}$ LOQ 100 $\mu\text{g/L}$	El % DER de áreas es menor a 15.0% para concentraciones menores a 0.05% (500 $\mu\text{g/L}$) El %DER para TR es menor a 5.0%	La diferencia entre las áreas del análisis de precisión intermedia de 17β -estradiol indico un porcentaje de diferencia $\leq 2\%$, lo cual indica que es aceptable.	Al evaluar la robustez se observó que hay un cambio en el tiempo de retención al modificar la composición de la fase móvil y el flujo	El porcentaje de desviación en un intervalo de entre 116.949 -129.615 %

La degradación de 17β -estradiol mediante luz solar y luz UV, permitió determinar el tiempo de vida media de esta hormona, además de observó que con luz solar presentó mayor degradación que con luz ultravioleta. Esto fue comprobado con un análisis estadístico ANOVA, el cual indicó que existen diferencias significativas en los dos métodos de degradación utilizados.

REFERENCIAS

- ALMEIDA, C. & NOGUEIRA, J. M. 2006. Determination of steroid sex hormones in water and urine matrices by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with diode array detection. *J Pharm Biomed Anal*, 41, 1303-11.
- ATKINSON, S. K., MARLATT, V. L., KIMPE, L. E., LEAN, D. R., TRUDEAU, V. L. & BLAIS, J. M. 2012. The occurrence of steroidal estrogens in south-eastern Ontario wastewater treatment plants. *Sci Total Environ*, 430, 119-25.
- AUFARTOVA, J., MAHUGO-SANTANA, C., SOSA-FERRERA, Z., SANTANA-RODRIGUEZ, J. J., NOVAKOVA, L. & SOLICH, P. 2011. Determination of steroid hormones in biological and environmental samples using green microextraction techniques: an overview. *Anal Chim Acta*, 704, 33-46.
- AURIOL, M., FILALI-MEKNASSI, Y., ADAMS, C. D., TYAGI, R. D., NOGUEROL, T. N. & PINA, B. 2008. Removal of estrogenic activity of natural and synthetic hormones from a municipal wastewater: efficiency of horseradish peroxidase and laccase from *Trametes versicolor*. *Chemosphere*, 70, 445-52.
- BECK, I. C., BRUHN, R., GANDRASS, J. & RUCK, W. 2005. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of estrogenic compounds in coastal surface water of the Baltic Sea. *J Chromatogr A*, 1090, 98-106.
- BECK, J., TOTSCHKE, K. U. & KOGEL-KNABNER, I. 2008. A rapid and efficient determination of natural estrogens in soils by pressurised liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Chemosphere*, 71, 954-60.
- BODZEK, M. & DUDZIAK, M. 2006. Elimination of steroidal sex hormones by conventional water treatment and membrane processes. *Desalination*, 198, 24-32.
- BULUN, S. E., CHENG, Y. H., YIN, P., IMIR, G., UTSUNOMIYA, H., ATTAR, E., INNES, J. & JULIE KIM, J. 2006. Progesterone resistance in endometriosis: link to failure to metabolize estradiol. *Mol Cell Endocrinol*, 248, 94-103.
- COMBALBERT, S., BELLET, V., DABERT, P., BERNET, N., BALAGUER, P. & HERNANDEZ-RAQUET, G. 2012. Fate of steroid hormones and endocrine activities in swine manure disposal and treatment facilities. *Water Res*, 46, 895-906.
- CHANG, H., WAN, Y., WU, S., FAN, Z. & HU, J. 2011. Occurrence of androgens and progestogens in wastewater treatment plants and receiving river waters: comparison to estrogens. *Water Res*, 45, 732-40.
- CHEN, C. Y., WEN, T. Y., WANG, G. S., CHENG, H. W., LIN, Y. H. & LIEN, G. W. 2007. Determining estrogenic steroids in Taipei waters and removal in drinking water treatment using high-flow solid-phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Sci Total Environ*, 378, 352-65.
- CHEN, X. & HU, J. 2009. Degradation of 17 β -estradiol and its conjugates: Effects of initial concentration and MLSS concentration. *Process Biochemistry*, 44, 1330-1334.
- CHIU, T. Y., KOH, Y. K., PATERAKIS, N., BOOBIS, A. R., CARTMELL, E., RICHARDS, K. H., LESTER, J. N. & SCRIMSHAW, M. D. 2009. The significance of sample mass in the analysis of steroid estrogens in sewage sludges and the derivation of partition coefficients in wastewaters. *J Chromatogr A*, 1216, 4923-6.

- CHOWDHURY, R. R., CHARPENTIER, P. A. & RAY, M. B. 2011. Photodegradation of 17 β -estradiol in aquatic solution under solar irradiation: Kinetics and influencing water parameters. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 219, 67-75.
- ESPERANZA, M., SUIDAN, M. T., MARFIL-VEGA, R., GONZALEZ, C., SORIAL, G. A., MCCAULEY, P. & BRENNER, R. 2007. Fate of sex hormones in two pilot-scale municipal wastewater treatment plants: conventional treatment. *Chemosphere*, 66, 1535-44.
- GAÑÁN, J., PÉREZ-QUINTANILLA, D., MORANTE-ZARCERO, S. & SIERRA, I. 2013. Comparison of different mesoporous silicas for off-line solid phase extraction of 17 β -estradiol from waters and its determination by HPLC-DAD. *Journal of Hazardous Materials*, 260, 609-617.
- GAUTAM, A. K., KUMAR, S. & SABUMON, P. C. 2007. Preliminary study of physico-chemical treatment options for hospital wastewater. *J Environ Manage*, 83, 298-306.
- GIGER, W. 2009. Hydrophilic and amphiphilic water pollutants: using advanced analytical methods for classic and emerging contaminants. *Anal Bioanal Chem*, 393, 37-44.
- GOMES, R. L., SCRIMSHAW, M. D. & LESTER, J. N. 2003. Determination of endocrine disrupters in sewage treatment and receiving waters. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22, 697-707.
- HAMID, H. & ESKICIOGLU, C. 2012. Fate of estrogenic hormones in wastewater and sludge treatment: A review of properties and analytical detection techniques in sludge matrix. *Water Res*, 46, 5813-33.
- HAVLIKOVA, L., NOVAKOVA, L., MATYSOVA, L., SICHA, J. & SOLICH, P. 2006. Determination of estradiol and its degradation products by liquid chromatography. *J Chromatogr A*, 1119, 216-23.
- HUTCHINS, S. R., WHITE, M. V., HUDSON, F. M. & FINE, D. D. 2007. Analysis of lagoon samples from different concentrated animal feeding operations for estrogens and estrogen conjugates. *Environ Sci Technol*, 41, 738-44.
- INGRAND, V., HERRY, G., BEAUSSE, J. & DE ROUBIN, M. R. 2003. Analysis of steroid hormones in effluents of wastewater treatment plants by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1020, 99-104.
- JANEX-HABIBI, M. L., HUYARD, A., ESPERANZA, M. & BRUCHET, A. 2009. Reduction of endocrine disruptor emissions in the environment: the benefit of wastewater treatment. *Water Res*, 43, 1565-76.
- KHANAL, S. K., XIE, B., THOMPSON, M. L., SUNG, S., ONG, S.-K. & VAN LEEUWEN, J. 2006. Fate, Transport, and Biodegradation of Natural Estrogens in the Environment and Engineered Systems. *Environmental Science & Technology*, 40, 6537-6546.
- KOH, Y. K., CHIU, T. Y., BOOBIS, A., CARTMELL, E., LESTER, J. N. & SCRIMSHAW, M. D. 2007. Determination of steroid estrogens in wastewater by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1173, 81-7.
- KURUTO-NIWA, R., ITO, T., GOTO, H., NAKAMURA, H., NOZAWA, R. & TERAQ, Y. 2007. Estrogenic activity of the chlorinated derivatives of estrogens and flavonoids using a GFP expression system. *Environ Toxicol Pharmacol*, 23, 121-8.
- KUSTER, M., AZEVEDO, D. A., LOPEZ DE ALDA, M. J., AQUINO NETO, F. R. & BARCELO, D. 2009. Analysis of phytoestrogens, progestogens and estrogens in environmental waters from Rio de Janeiro (Brazil). *Environ Int*, 35, 997-1003.

- KUSTER, M., JOSÉ LÓPEZ DE ALDA, M. & BARCELÓ, D. 2004. Analysis and distribution of estrogens and progestogens in sewage sludge, soils and sediments. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 23, 790-798.
- LAFLEUR, A. D. & SCHUG, K. A. 2011. A review of separation methods for the determination of estrogens and plastics-derived estrogen mimics from aqueous systems. *Anal Chim Acta*, 696, 6-26.
- LIU, S., YING, G. G., ZHAO, J. L., CHEN, F., YANG, B., ZHOU, L. J. & LAI, H. J. 2011. Trace analysis of 28 steroids in surface water, wastewater and sludge samples by rapid resolution liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1218, 1367-78.
- MAZELLIER, P., MEITE, L. & DE LAAT, J. 2008. Photodegradation of the steroid hormones 17beta-estradiol (E2) and 17alpha-ethinylestradiol (EE2) in dilute aqueous solution. *Chemosphere*, 73, 1216-23.
- NOVAKOVA, L. & SOLICH, P. 2005. A comparison of performance of various analytical columns in pharmaceutical analysis: conventional C18 and high throughput C18 zorbax columns. *J Chromatogr A*, 1088, 24-31.
- PEREIRA, R. O., POSTIGO, C., DE ALDA, M. L., DANIEL, L. A. & BARCELO, D. 2011. Removal of estrogens through water disinfection processes and formation of by-products. *Chemosphere*, 82, 789-99.
- SILVA, C. P., OTERO, M. & ESTEVES, V. 2012. Processes for the elimination of estrogenic steroid hormones from water: a review. *Environ Pollut*, 165, 38-58.
- SODRÉ, F. F., PESCARA, I. C., MONTAGNER, C. C. & JARDIM, W. F. 2010. Assessing selected estrogens and xenoestrogens in Brazilian surface waters by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Microchemical Journal*, 96, 92-98.
- STRECK, G. 2009. Chemical and biological analysis of estrogenic, progestagenic and androgenic steroids in the environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 28, 635-652.
- SUN, L., YONG, W., CHU, X. & LIN, J. M. 2009. Simultaneous determination of 15 steroidal oral contraceptives in water using solid-phase disk extraction followed by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1216, 5416-23.
- TOLGYESI, A., VEREBEY, Z., SHARMA, V. K., KOVACSICS, L. & FEKETE, J. 2010. Simultaneous determination of corticosteroids, androgens, and progesterone in river water by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chemosphere*, 78, 972-9.
- TRINH, T., HARDEN, N. B., COLEMAN, H. M. & KHAN, S. J. 2011. Simultaneous determination of estrogenic and androgenic hormones in water by isotope dilution gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1218, 1668-76.
- VERLICCHI, P., GALLETTI, A., PETROVIC, M. & BARCELÓ, D. 2010. Hospital effluents as a source of emerging pollutants: An overview of micropollutants and sustainable treatment options. *Journal of Hydrology*, 389, 416-428.
- WATABE, Y., KUBO, T., NISHIKAWA, T., FUJITA, T., KAYA, K. & HOSOYA, K. 2006. Fully automated liquid chromatography-mass spectrometry determination of 17beta-estradiol in river water. *J Chromatogr A*, 1120, 252-9.
- WEIGEL, S., BERGER, U., JENSEN, E., KALLENBORN, R., THORESEN, H. & HUHNERFUSS, H. 2004. Determination of selected pharmaceuticals and caffeine in sewage and seawater

- from Tromso/Norway with emphasis on ibuprofen and its metabolites. *Chemosphere*, 56, 583-92.
- XU, N., XU, Y. F., XU, S., LI, J. & TAO, H. C. 2012. Removal of estrogens in municipal wastewater treatment plants: a Chinese perspective. *Environ Pollut*, 165, 215-24.
- XU, Z., CHEN, S., HUANG, W., FANG, G., PINGZHU, H. & WANG, S. 2009. Study on an on-line molecularly imprinted solid-phase extraction coupled to high-performance liquid chromatography for separation and determination of trace estrone in environment. *Anal Bioanal Chem*, 393, 1273-9.
- XUAN, R., BLASSENGALE, A. A. & WANG, Q. 2008. Degradation of estrogenic hormones in a silt loam soil. *J Agric Food Chem*, 56, 9152-8.
- YIN, G. G., KOOKANA, R. S. & RU, Y. J. 2002. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environ Int*, 28, 545-51.
- ZHENG, W., YATES, S. R. & BRADFORD, S. A. 2008. Analysis of steroid hormones in a typical dairy waste disposal system. *Environ Sci Technol*, 42, 530-5.
- ZORITA, S., HALLGREN, P. & MATHIASSEN, L. 2008. Steroid hormone determination in water using an environmentally friendly membrane based extraction technique. *J Chromatogr A*, 1192, 1-8.
- ZWIENER, C. & RICHARDSON, S. D. 2005. Analysis of disinfection by-products in drinking water by LC-MS and related MS techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 24, 613-621.