



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS (CIQ)

***“Distribución de Fármacos y Compuestos Disruptores Endocrinos
entre Agua Natural Superficial y Sedimento”***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

José Gustavo Ronderos Lara

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Hugo A. Saldarriaga Noreña

CUERNAVACA, MORELOS.

Enero 2022

Este trabajo fue realizado en laboratorio 313 del Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (CIQ-UAEM) bajo la dirección del Dr. Hugo A. Saldarriaga Noreña, y con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca 664801.

Comité tutorial

Dr. Mario A. Murillo Tovar

Dr. Jorge Antonio Guerrero Álvarez

Dr. Hugo A. Saldarriaga Noreña (director de tesis)

Jurado revisor de tesis

Presidente Dra. María del Refugio Trejo Hernández

Secretario Dr. Jorge Antonio Guerrero Álvarez

Vocal Dra. Patricia Mussali Galante

Vocal Dra. Araceli Patricia Peña Álvarez

Vocal Dra. Minerva Villanueva Rodríguez

Suplente Dra. Josefina Vergara Sánchez

Suplente Dra. Constanza Machín Ramírez

DR. JEAN MICHEL GRÉVY MACQUART
COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS
PRESENTE

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada “Distribución de Fármacos y Compuestos Disruptores Endocrinos entre Agua Natural Superficial y Sedimento”, que presenta el alumno José Gustavo Ronderos Lara (5620151201) para obtener el título de Doctor en Ciencias.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dra. María del Refugio Trejo Hernández CEIB-UAEM	APROBADO	
Dr. Jorge Antonio Guerrero Alvarez CIQ-UAEM	APROBADO	
Dra. Patricia Mussali Galante CEIB-UAEM	APROBADO	
Dra. Araceli Patricia Peña Álvarez FQ-UNAM	APROBADO	
Dra. Minerva Villanueva Rodríguez FQ-UNAM	APROBADO	
Dra. Josefina Vergara Sánchez EESX-UAEM	APROBADO	
Dra. Constanza Machin Ramírez FCQel-UAEM	APROBADO	



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

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

Sello electrónico

JOSEFINA VERGARA SANCHEZ | Fecha:2021-09-13 19:27:12 | Firmante
 hRaQ8y2FuCWfR3sj4FDuCNZCB1lxomVXRamOipOkcG8fHC/R3QIVduXcB8ABV3Zn2eRS3i58fko/q8qhksunS8l89nyzAST9F1cFXNpTWS8/ZAlkyWqjPDYCRz2VLjXTJpeGD
 pgaQzBUTwzr6FkQY9pBOPOvCBRDwlLuAtzTPD08tHYDA2K6WwYAwNELXb8gsZm1IErLM7imiOGg7dYjmsFvIh0SN+2VmEsCdo+r0kuqTqNEjUVOPdXgFVNOoaw6CalEu
 CZgu2O8HgbQ/Ssyns3YaNsX8Dxg7CdBOv1TDKBfPM8PoE9Glez84N18RQH0ebPEv5ju0lyktw---

JORGE ANTONIO GUERRERO ALVAREZ | Fecha:2021-09-16 11:31:18 | Firmante
 YNp/8W6Y3yVaEEnhaIZXs7L8Tvt7qWNox5Y86T3vordZfRoNRWw4c78zbTouJtuJaz4JPNZJfPNyNKQlnReOxJog95dkKPNwM6GQIMcafk38h1PhrTs+5xNKBGiSNPzpmL2jL
 S+G3DRHjaOazgws3thAY4vc9W5UbPqGFQwKzOhB3cc8PyY1548SfULZ3GobxDfZKZChrendUnLVURNUL4DtsbVY0700GT9jFT/EW0kdqTsjmEfmSooZeT7KLZ3gKzP6J7
 vGuYTA/DN711CWVqKzYfexug+ocFR0622pTHDyVhsSf83L6ikabgcoQRzXPo249M9sA---

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



8UZhrs

<https://firma.uaem.mx/noRepudio/3Zlydkg9kjd4OmN7n1HN1bLjnaF0MK>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
 2017-2023



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

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

Sello electrónico

CONSTANZA MACHIN RAMIREZ | Fecha: 2021-10-04 15:45:57 | Firmante
qAAZ35LZ8sZmsDmK0HFUhfOFLUCaUwvDAU4dL39pkRegSndWZggIKtzoo+TahodKGL7vshHozW8GjdsJp1oYMYigUjGlykyO65Y7vB0oRgM+M+HWJQV04lmyY8K8
WmFyBAPlllrEaKSaaz9f0L7UJPD82q4KjGwzFvAwDY9wv2r8BP60UsY70K+fwWJFz7UWQ34E6bSrsCxtit1T3z3LF3Z3x0k2pG8kGGJhocVKA8885vGvmP76PAP8NagUd/
VuQsk34Jtv9kkU2XBLCe9F1OFTbpuNFQsM8cazXvZrhtq9PTnWkUKoPovjRRDzXxSw--

PATRICIA MUSSALI GALANTE | Fecha: 2021-10-06 12:16:54 | Firmante
Wn3kwXUmeCMK39wQIUls8vqS5yK7zocR7dIDZOP5eGHZP1+L9h+RNeKkQawInSSM:UMS8atvfmUOGT+KJ4R+2h168m8hJhpq+4BO4BUW5OVGZSL7OoDAAqGvNz
W6s9vOZY37sEusAbTUsZguk1zLgX2886Q8wq8BxLXvZTTKgs+Q4KOuToUcB+Rko2T9jYlyvNBry3TjnalhQo43ZyL7fMMUHUA8kBJMpd9RdQz5CkruDJacR8e9YmK4n
mFZBh0La1N64koV0Ni+8p9R7LHfRL1jHSxszhbEAPAszy1Gtasvz14BdJ-VuxrC0D1GEaDQ--

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



dZQlpDjs6

<https://firma.uaem.mx/noRepudio/4YpZCHKFnZcYaPE2CBKsOv3OoHwIM>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



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

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

Sello electrónico

MARIA DEL REFUGIO TREJO HERNANDEZ | Fecha:2021-10-12 17:26:12 | Firmante
cNz55GGkzvR0F13GFUQkispv2oyqv0WXiBSDwaoE9UJAHHzs57TwkWmKpTbKGNjdAuoBtHXBGUimtgQAJumR0N6Rwyt4eIMUqFuk/0wGhw2QcGDdyBtBN0IDb9FwUvUoUjyN.N8ieALGO1gKisyGsel1K0AluwCeOSY6Q7kEsLXuggFkdZbGqLx0lAbdP2gtR2SS5s+9YvFcdtjdf8Sv8A+jadow0CFjHGsTpgulB7dSnt5WWE0V7Uf8Wj1XQ0NjDwRmNxbDfCbQdZEJqDFHJM2WvyHMzUBSE0vgOTKcjo9ZxRjGRwZucRNkHMLNTIP9KXa--

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



703U0mzqZ

<https://firma.uaem.mx/NoRepudio/UQq4UwlgdOiscB5RKub6B83p83YMb3>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



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

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

Sello electrónico

MINERVA VILLANUEVA RODRIGUEZ | Fecha: 2021-10-26 13:58:02 | Firmante
ZbR7RodNIM1V1LDCEo71GJG1VqDGIMKWhFSAWYKbFYhC+Qqz5mjhxDNwOytz18E8y5mlbt8qr1915z458ADIMtc9bwKgru.9rgVPyaRbdITbqmCAaUw5EYF4MGmMzFPub3
UQofMcYeEnj6ZUB72nKIX3ic4w5Tx8wtedya3P1dPLU2ZIXX7XN7jOL37Byl8E03nzE6CqOSQOI7jNwS2XX+Gaww1Ln1gCpQabAAh4vNdCZCe5Nb6PZUEY11IGKTGWSdUwtr
veekEVuZbhqcmIu4dqZ12q1Jh+JOFMeIqL9rabu8NTP415yU+z8HLnZz5N0qjGQ1qVgN1eFHw==

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



XCe0P8G4

<https://efirma.uaem.mx/noRepudolo/SaCabDINNA8mSKpzqQTBSFHQL1K112F>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023

Agradecimientos

Gracias a mi mamá y a mi papá por su dedicación y porque siempre me han enseñaron el valor del esfuerzo, la honestidad y el respeto hacia todas las personas, sin excepciones.

Gracias al Dr. Hugo A. Saldarriaga Noreña y al Dr. Mario Murillo por sus enseñanzas y consejos durante toda esta aventura del posgrado.

Gracias a mis amigos y compañeros de laboratorio y del CIQ, quienes compartieron su conocimiento conmigo y al menos una ocasión me brindaron un momento de risa y alegría,

Agradezco a Dios por darme esta vida, permitirme disfrutarla y ayudarme a descubrir que los fundamentos básicos de la ciencia pueden ser aplicados a la vida cotidiana para vivir con mayor comodidad.

Publicaciones surgidas a partir de este trabajo de tesis (Autor principal)

Artículo científico: Optimization and Application of a GC-MS Method for the Determination of Endocrine Disruptor Compounds in Natural Water. **Separations** **2018**, 5, 33; DOI:10.3390/separations5020033.

Capítulo de libro: Emerging Compounds in Mexico: Challenges for Their identification and Elimination in Wastewater. **2020** DOI: **0.5772/intechopen.93909**.

Artículo científico: Distribution and Estrogenic Risk of Alkylphenolic Compounds, Hormones and Drugs Contained in Water and Natural Surface Sediments, Morelos, Mexico. **Separations** **2022**, 9,19, DOI: **10.3390/separations9010019**.

Colaboraciones realizadas (Co-Autor)

Artículo científico: Chemical Characterization of N-Hexane Extract Obtained from Lignocellulose Residual Contained in Agro-industrial Wastes. **Journal of Agricultural Chemistry and Environment**, **2018**, 7, 94-104; DOI: **10.4236/jacen.2018.72009**.

Artículo científico: Occurrence and Risk Assessment of Steroidal Hormones and Phenolic Endocrine Disrupting Compounds in Surface Water in Cuautla River, Mexico. **Water** **2019**, 11, 2628; DOI:10.3390/w11122628.

Artículo científico: Spectral characteristics related to chemical substructures and structures indicative of organic precursors from fulvic acids in sediments by NMR and HPLC-ESI-MS. **Molecules** **2021**, 26 (13), 4051; DOI: **10.3390/molecules26134051**.

Resumen

Los contaminantes emergentes son compuestos químicos que, debido a su gran uso, constantemente están siendo introducidos a las distintas matrices ambientales. Algunos estudios han demostrado que la acumulación de estos compuestos en el ambiente puede ser perjudicial tanto para el hombre, como para los organismos acuáticos que habitan los mantos freáticos, ocasionando principalmente, alteraciones negativas en el sistema endocrino.

En este trabajo de tesis, fue determinada la distribución en el ambiente (agua y sedimentos) de 6 compuestos emergentes; naproxeno (NPX), ibuprofeno (IBU), 4-nonilfenol (4NP), bisfenol A (BPA), 17 β -estradiol (E2) y 17 α -etinilestradiol (EE2). Así mismo, mediante el cálculo del coeficiente de partición ($\log K_d$) entre sedimento y agua, se realizó una estimación del destino en el ambiente de los compuestos analizados. Adicionalmente fueron determinados los niveles de estrogenicidad (EEQ_{E2}) provocados por la presencia de los compuestos disruptores endocrinos (CDEs) 4NP, BPA, E2 y EE2 en muestras de agua y sedimentos obtenidas de los sitios Chapultepec (CPTPC), Tetela (TTL), Temixco 1 (TMC1), Temixco 2 (TMC2) y Jiutepec (JTPC).

Los compuestos de interés detectados en muestras de agua y sedimentos fueron obtenidos mediante extracción en fase sólida y extracción asistida por ultrasonido, respectivamente. Estos métodos fueron optimizados y validados en forma previa a la extracción de muestras naturales. Para la matriz de agua, los mayores porcentajes de recuperación fueron obtenidos a pH neutro, utilizando una mezcla acetona – metanol (3:2) en la elución de los compuestos, obteniéndose porcentajes de recuperación en el rango de 54 (4NP) – 89 (EE2) %. Por otro lado, para la optimización de la extracción en la matriz de sedimentos, muestras de sedimentos naturales fueron enriquecidas con los estándares de interés y extraídas con diferentes disolventes. Los mayores porcentajes de extracción fueron obtenidos con acetona – metanol 3:2, obteniéndose porcentajes de extracción en el intervalo de 52 (4NP) – 71 (EE2) %.

La cuantificación de los compuestos presentes en agua y sedimento fue realizada mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, el método instrumental demostró ser selectivo y lineal en el rango de concentración de 0 a 320 ng/mL para 4NP, BPA, NPX y EE2, y de 0 a 240 ng/mL para IBU y E2. Entre tanto, el límite de detección para todos los compuestos osciló en el rango 0.03 – 13.73 ng/mL, mientras que el límite de cuantificación osciló en el rango 0.09 – 45.75 ng/mL (E2 e IBU respectivamente).

Las concentraciones de los compuestos determinadas en agua oscilaron en el rango no detectado (ND) – 51.93 ng/L para IBU, menor al límite de detección (< LDD) – 11.08 ng/L para 4NP, ND – 86.40 ng/L para NPX, < LDD – 65.21 ng/L para BPA, < LDD – 5.37 ng/L para E2 y ND – 16.06 ng/L para EE2. Las concentraciones de los compuestos determinadas en sedimento oscilaron en el rango ND – 0.72

ng/g para IBU, < LDD – 0.70 ng/g para 4NP, ND – 0.85 ng/g para NPX, < LDD – 3.97 ng/g para BPA, 0.01 – 0.85 ng/g para E2 y ND – 0.46 ng/g para EE2.

A partir de la concentración ambiental determinada entre agua y sedimento para los compuestos de interés, se determinó el coeficiente de distribución ($\log K_d$) para cada compuesto. Los valores $\log K_d$ obtenidos fueron 1.43 ± 0.26 , 1.35 ± 0.37 , 1.05 ± 0.17 , 1.24 ± 0.59 , 1.91 ± 0.56 y 1.41 ± 0.13 L/Kg para IBU, 4NP, NPX, BPA, E2 y EE2 respectivamente. Lo que indica que los compuestos en el ambiente se encuentran en mayor concentración en sedimentos. Esto se debe principalmente a las interacciones hidrofóbicas que presentan los compuestos analizados.

Mediante un análisis de correlación de Spearman, fueron determinadas correlaciones significativas entre los compuestos presentes en ambas matrices y los parámetros fisicoquímicos determinados para las muestras analizadas. En este sentido, a un nivel de probabilidad de $p \leq 0.05$, en la matriz de agua fueron determinadas correlaciones (r) significativas entre los parámetros fisicoquímicos y los compuestos analizados, tales como carbono orgánico total (COT), demanda biológica de oxígeno (DBO_5) y demanda química de oxígeno (DQO) con IBU (0.8499, 0.8369 y 0.8628 respectivamente), BPA (0.8503, 0.9272 y 0.9446 respectivamente) y EE2 (0.8423, 0.9027 y 0.9552 respectivamente). Mientras que en la matriz de sedimentos fueron encontradas correlaciones significativas de los parámetros COT, DBO_5 , DQO con BPA (0.9246, 0.9158 y 0.9880 respectivamente) y EE2 (0.8376, 0.8990 y 0.9524 respectivamente).

Por otra parte, de acuerdo con criterios de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América (USEPA por sus siglas en inglés) y de la Unión Europea (EU por sus siglas en inglés), fue determinado el nivel de estrogenicidad. El cual es determinado como el equivalente estrogénico a la hormona E2 (EEQ_{E2}), y es útil para establecer posibles alteraciones endocrinas al sistema nervioso central. Como resultado, los sitios 4 de los 5 sitios muestreados presentaron valores de $\text{EEQ}_{\text{E2}} > 1$ ng/L para 4NP, BPA, E2 y EE2. Lo que indica que los organismos acuáticos endémicos del Estado de Morelos que habitan en la microcuenca del río Apatlaco están expuestos a posibles alteraciones negativas al sistema endocrino.

En el análisis de la calidad del agua de los sitios muestreados, la calidad del agua fue clasificada como “excelente” en Chapultepec (CPTPC), “aceptable” en Tetela (TTL), Temixco 1 (TMC1), Temixco 2 (TMC2) y “contaminada” en el sitio de Jiutepec (JTTC).

Abstract

Emerging pollutants are chemical compounds that, due to their high demand, are constantly being introduced to the different environmental matrices. Some studies have demonstrated that the accumulation of these compounds in the environment can be harmful both for man and for the aquatic organisms that inhabit the water bodies, mainly causing negative alterations in the endocrine system.

In this thesis work, the distribution in the environment (water and sediments) of 6 emerging compounds was determined: naproxen (NPX), ibuprofen (IBU), 4-nonylphenol (4NP), bisphenol A (BPA), 17 β -estradiol (E2) and 17 α -ethinyl estradiol (EE2). Likewise, by calculating the partition coefficient ($\text{Log } K_d$) between sediment and water, an estimate of the fate in the environment of the analyzed compounds was made. Additionally, estrogenicity levels (EEQ_{E2}) caused by the presence of endocrine disrupting compounds (CDEs) 4NP, BPA, E2 and EE2 were determined in water and sediment samples obtained from the Chapultepec (CPTPC), Tetela (TTL), Temixco 1 (TMC1), Temixco 2 (TMC2) and Jiutepec (JTPC) sites.

The compounds of interest detected in water and sediment samples were obtained by solid phase extraction and ultrasound-assisted extraction, respectively. These methods were optimized and validated prior to the extraction of natural samples. For the water matrix, the highest percentages of recovery were obtained at neutral pH, using an acetone-methanol mixture (3:2) in the elution of the compounds, obtaining recovery percentages in the range of 54 (4NP) – 89 (EE2) %. On the other hand, for the optimization of extraction in the sediment matrix, samples of natural sediments were enriched with the standards of interest and extracted with different solvents. The highest percentages of extraction were obtained with acetone – methanol 3:2, extraction percentages obtained were in the range of 52 (4NP) – 71 (EE2) %.

The quantification of the compounds present in water and sediment was performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry, the instrumental method proved to be selective and linear in the concentration range of 0 to 320 ng/mL for 4NP, BPA, NPX and EE2, and from 0 to 240 ng/mL for IBU and E2. Meanwhile, limit of detection for all compounds oscillated in the range 0.03 – 13.73 ng/mL, while the limit of quantification oscillated in the range 0.09 – 45.75 ng/mL (E2 and IBU respectively).

The concentrations of determined compounds in water ranged in the undetected range (ND) – 51.93 ng/L for IBU, lower than the limit of detection (< LDD) – 11.08 ng/L for 4NP, ND – 86.40 ng/L for NPX, < LDD – 65.21 ng/L for BPA, < LDD – 5.37 ng/L for E2 and ND – 16.06 ng/L for EE2. Concentrations of determined compounds in sediments oscillated in the range ND – 0.72 ng/g for IBU, < LDD – 0.70 ng/g for 4NP, ND – 0.85 ng/g for NPX, < LDD – 3.97 ng/g for BPA, 0.01 – 0.85 ng/g for E2 and ND – 0.46 ng/g for EE2.

From the environmental concentration determined between water and sediment for the compounds of interest, the distribution coefficient ($\text{Log } K_d$) for each compound was determined. The $\text{Log } K_d$ values obtained were 1.43 ± 0.26 , 1.35 ± 0.37 , 1.05 ± 0.17 , 1.24 ± 0.59 , 1.91 ± 0.56 and 1.41 ± 0.13 L/Kg for IBU, 4NP, NPX, BPA, E2 and EE2 respectively. This indicates that the compounds in the environment are found in higher concentration in sediments. This is mainly due to the hydrophobic interactions presented by the analyzed compounds.

By means of a Spearman correlation analysis, significant correlations were determined between compounds present in both matrices and the physicochemical parameters determined for the samples analyzed. In this sense, at a probability level of $p \leq 0.05$, significant correlations (r) were determined in the water matrix between the physicochemical parameters and the compounds analyzed, such as total organic carbon (TOC), biological oxygen demand (BOD_5) and chemical oxygen demand (COD) with IBU (0.8499, 0.8369 and 0.8628 respectively), BPA (0.8503, 0.9272 and 0.9446 respectively) and EE2 (0.8423, 0.9027 and 0.9552 respectively). While in the sediment matrix were found significant correlations of the parameters COT, BOD_5 , COD with BPA (0.9246, 0.9158 and 0.9880 respectively) and EE2 (0.8376, 0.8990 and 0.9524 respectively).

On the other hand, according to criteria of the Environmental Protection Agency of United State of America (USEPA) and the European Union (EU), the level of estrogenicity was determined. Which is determined as the estrogenic equivalent to the hormone E2 (EEQ_{E2}) and is useful for establishing possible endocrine alterations to the central nervous system. As a result, sites 4 of the 5 sites sampled presented EEQ_{E2} values > 1 ng/L for 4NP, BPA, E2 and EE2. This indicates that the endemic aquatic organisms of the State of Morelos that inhabit the micro-basin of the Apatlaco River are exposed to possible negative alterations to the endocrine system.

In the analysis of the water quality of the sampled sites, the water quality was classified as "excellent" in Chapultepec (CPTPC), "acceptable" in Tetela (TTL), Temixco 1 (TMC1), Temixco 2 (TMC2) and "contaminated" at Jiutepec site (JTPC)

Índice

Capítulo 1.....	23
Introducción	23
Capítulo 2.....	25
Estado del arte.....	25
2.1 Compuestos emergentes (CE)	25
2.2 Legislación ambiental	27
2.3 Presencia de fármacos y CDEs en México	28
2.4 Tratamiento y técnicas de extracción para muestras de agua y sedimento para el análisis de CDEs y fármacos.....	29
2.5 Preparación de muestras ambientales	31
2.6 Análisis de muestras ambientales mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.....	34
2.7 Presencia de contaminantes emergentes en diferentes partes del mundo.....	38
Capítulo 3.....	41
Justificación, objetivos e hipótesis	41
Capítulo 4.....	44
Parte experimental.....	44
4.10.1 Selección del disolvente de extracción.....	54
Capítulo 5.....	66
Resultados y discusión.....	66
5.1 Identificación de los compuestos en cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).....	66
5.2 Identificación de los estándares mediante espectrometría de masas	67
5.3 Eficiencia de derivatización y efecto de la respuesta analítica de los derivados disueltos en diferentes disolventes.....	70
5.4 Validación del método instrumental.....	72
5.4.1 Linealidad y rango lineal	72
5.4.2 Límite de detección y límite de cuantificación; determinación de la heterocedasticidad en las rectas de calibrado.....	72
5.5 Optimización de los métodos de extracción	75
5.5.1 Extracción en fase sólida para muestras de agua natural	75
5.5.1.1 Efecto de diferentes disolventes en el condicionamiento de la fase estacionaria y elución de los compuestos retenidos	75

5.5.1.2	Influencia del pH de la muestra de agua para en la eficiencia de recuperación	77
5.5.2	Extracción asistida por ultrasonido para muestras de sedimento	79
5.5.2.1	Selección del disolvente de extracción	79
5.6	Validación de los métodos de extracción: robustez, repetibilidad y reproducibilidad de los métodos de extracción en muestras naturales.	80
5.7	Control de calidad.....	83
5.8	Aplicación de los métodos validados a muestras ambientales.....	84
5.9	Comparación de los niveles de concentración con otros ríos alrededor del mundo	86
5.10	Distribución (<i>Log K_d</i>) de CDEs y fármacos entre agua y sedimento	88
5.11	Relación entre las condiciones ambientales y la concentración de fármacos y CDEs determinadas en agua y sedimento	90
5.12	Estrogenicidad en el ambiente acuático del río Apatlaco.....	91
5.13	Comparación del riesgo estrogénico en la cuenca del río Apatlaco y ríos de otras partes del mundo	94
5.14	Riesgo ecológico	96
5.15	Calidad del agua en los cuerpos acuáticos estudiados	99
5.16	Impacto en los cuerpos de agua muestreados.....	100
Capítulo 6.....		102
Conclusiones.....		102
Perspectivas.....		104
Apéndice A.....		105
Apéndice B.....		109
Apéndice C.....		111
Apéndice D		112

Índice de Tablas

<i>Tabla 1 Estudios realizados en México para determinar la concentración de fármacos y CDEs presentes en agua superficial y/o sedimentos</i>	29
<i>Tabla 2 Técnicas de extracción utilizadas para la extracción de fármacos y CDEs</i>	30
<i>Tabla 3 Agentes derivatizantes comercialmente disponibles</i>	36
<i>Tabla 4 Identificación de los estándares de interés mediante CG-EM</i>	47
<i>Tabla 5 Niveles de concentración utilizados para la calibración</i>	48
<i>Tabla 6 Proporción de disolventes utilizada para el acondicionamiento</i>	54
<i>Tabla 7 Disolventes empleados en la optimización</i>	55
<i>Tabla 8 Coordenadas de los sitios de muestreo</i>	58
<i>Tabla 9 Ecuación lineal ponderada, coeficiente de correlación y rango lineal determinados para los compuestos analizados</i>	72
<i>Tabla 10 Límite de detección (ng/mL) y cuantificación (ng/mL) obtenido para cada compuesto y comparación con otros estudios (Obtenidos mediante CG-EM)</i>	74
<i>Tabla 11 Comparación de los límites de detección instrumentales obtenidos en este trabajo y las concentraciones máximas permisibles (CMP) en el ambiente</i>	74
<i>Tabla 12 Índice de polaridad de los sistemas de</i>	77
<i>Tabla 13 pKa de los compuestos de interés</i>	77
<i>Tabla 14 Porcentaje de recuperación, repetibilidad y reproducibilidad obtenidos en la validación de los métodos de extracción en agua y sedimentos</i>	82
<i>Tabla 15 Comparación de la eficiencia de extracción (%) mediante extracción en fase sólida (agua) y extracción asistida por ultrasonido (sedimento).</i>	83
<i>Tabla 16 Concentraciones determinadas en las muestras de agua (ng/L) y sedimento (ng/g)</i>	85
<i>Tabla 17 Comparación de la concentración de fármacos y CDEs entre el río Apatlaco y otros ríos del mundo</i>	87
<i>Tabla 18 Coeficiente de partición entre sedimentos y agua (Log K_d) para los diferentes compuestos y Log K_d determinado en otros estudios</i>	89
<i>Tabla 19 Correlaciones encontradas en las matrices de agua y sedimentos para los compuestos analizados ($p \leq 0.5$ y $*p \leq 0.1$)</i>	90
<i>Tabla 20 Estrogenicidad en el río Apatlaco y en ríos de diferentes partes del mundo</i>	95
<i>Tabla 21 Parámetros fisicoquímicos de las muestras colectadas y analizadas</i>	99

Índice de Figuras

Figura 1 Clasificación de los contaminantes Emergentes	26
Figura 2 Estructura molecular de las hormonas (a) 17 β – estradiol (E2) Y (b) 17 α – etinilestradiol (EE2)	28
Figura 3 Principales adsorbentes utilizados en separaciones fase normal y fase reversa	33
Figura 4 Estructura molecular de fases estacionarias empleadas en la extracción	34
Figura 5 Mecanismo de reacción general de las diferentes derivatizaciones	37
Figura 6 Efecto del agente derivatizante en las posiciones 3 y 17 en la hormona sintética EE2	38
Figura 7 Procedimiento de la extracción en fase sólida	52
Figura 8 Sitios muestreados	59
Figura 9 Cromatograma obtenido para la separación de la mezcla de los estándares de interés	66
Figura 10 Identificación del derivado IBU–TMS y	67
Figura 11 Identificación del derivado 4NP–TMS y	68
Figura 12 Identificación del derivado NPX–TMS y	68
Figura 13 Identificación del derivado BPA–TMS	69
Figura 14 Identificación del derivado E2–TMS	69
Figura 15 Identificación del derivado EE2–TMS	70
Figura 16 Eficiencia de extracción obtenida (promedio) y %DER (barras de error) con las diferentes proporciones de metanol y acetona (n=3).	76
Figura 17 Eficiencia de extracción (promedio) y %DER (barras de error) obtenida	78
Figura 18 Eficiencia de la extracción (promedio) y %DER (barras de error) obtenidas por ultrasonido obtenida con diferentes disolventes (n=3)	79
Figura 19 Valor total de EEQ (Σ EEQ ng/L) determinado en agua	93
Figura 20 Valor total de EEQ (Σ EEQ ng/L) determinados en sedimento	93
Figura 21 Nivel de riesgo ecológico (RQ) determinado	96
Figura 22 Niveles HI en agua determinados para cada sitio analizado	98
Figura 23 Niveles HI en sedimentos determinados para cada sitio analizado	98

Abreviaturas

%DER	Porcentaje de desviación estándar relativa
°C	Grados centígrados
µg/L	Microgramo por litro
4NP	4-nonilfenol
BPA	Bisfenol A
BSTFA	N,O—bis(trimetilsilil)—trifluoroacetamida
CDEs	Compuestos disruptores endocrinos
CEs	Compuestos emergentes
CG-EM	Cromatografía gases acoplado a espectrometría de masas de cuadrupolo simple
Chry-D ₁₂	Criseno deuterado
CIVAC	Ciudad industrial del valle de Cuernavaca
CMP	Concentración máxima permitida
CONAGUA	Comisión nacional del agua
COT	Carbono orgánico total
CPTPC	Chapultepec
DBO ₅	Demanda bioquímica de oxígeno en 5 días
DQO	Demanda química de oxígeno
E2	17β-estradiol
EE2	17α-etinilestradiol
EEF	Factor de estrogenicidad equivalente a la hormona natural E2
EEQ _{E2}	Estrogenicidad relativa e 17β-estradiol
EFS	Extracción en fase sólida
EU	Unión europea
EAU	Extracción asistida por ultrasonido
eV	Electrón volt
g	Gramo
g/L	Gramo por litro
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HAPs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
HFBA	Anhídrido ácido heptafluorobutírico
HI	Índice de peligro
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
IBU	Ibuprofeno
IE	Impacto electrónico
JTPC	Jiutepec
Kg	Kilogramo
L	Litro
L/Kg	Litro por kilogramo
LDC	Límite de cuantificación
LDD	Límite de detección

<i>Log K_d</i>	Coeficiente de partición agua-sedimento
<i>Log K_{ow}</i>	Coeficiente de partición octanol-agua
MeOH	Metanol
min	Minuto
mL	Mililitro
mL/min	Mililitro por minuto
mm	Milímetro
MSTFA	N–metil–N– (trimetilsilil) –trifluoroacetamida
MTBSTFA	N–tert(butildimetilsilil)–N–metil trifluoroacetamida
N ₂	nitrógeno
NaOH	Hidróxido de sodio
ND	No detectado
ng/g	Nanogramo por gramo
ng/L	Nanogramos por litro
ng/mL	Nanogramos por mililitro
ng/μL	Nanogramo por microlitro
NPX	Naproxeno
O ₂	Oxígeno
OMS	Organización mundial de la salud
<i>p</i>	Nivel de confianza (probabilidad)
PFBBr	Bromuro de pentabencilo
PFPA	Anhídrido ácido pentafluoropropanoico
pH	Potencial hidrónico
pK _a	Constante de disociación
<i>r</i>	Coeficiente de correlación
rpm	Revoluciones por minuto
RQ	Riesgo Ecológico
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, ganadería y pesca
T °C	Temperatura en grados centígrados
TFA	Ácido trifluoroacético
TFAA	Anhídrido ácido trifluoroacético
TMAH	Hidróxido de trimetilamina
TMC1	Temixco 1
TMC2	Temixco 2
TMCS	Trimetilclorosilano
TMS	Trimetilsilano
TTL	Tetela
USEPA	Agencia de protección ambiental de los Estados Unidos de América
μL	Microlitro
μm	Micrómetro

Capítulo 1

Introducción

En las últimas décadas, se ha presentado un crecimiento demográfico significativo en las principales urbes del planeta. Como consecuencia para satisfacer las necesidades de la población, el sector industrial ha incrementado la oferta de productos orientados a mejorar la calidad de vida. Sin embargo, en la elaboración de tales productos, se generan una gran cantidad de residuos, que posteriormente son liberados al ambiente.

Dentro de estos residuos se encuentra una amplia variedad de sustancias químicas orgánicas, entre los que destacan los contaminantes emergentes (CEs) provenientes de productos de uso cotidiano (Tadeo et al. 2012). Estos compuestos son continuamente expulsados a los cuerpos de agua, a través de drenajes domésticos e industriales principalmente. Los CEs pueden dividirse en diferentes subcategorías, tales como fármacos, productos de cuidado personal, retardantes de flama, surfactantes, entre otros (Patel et al. 2020). Dentro de los CEs hay una categoría de compuestos que son capaces de afectar el sistema endocrino, alterando las funciones de desarrollo del sistema nervioso central y favoreciendo así, el desarrollo de ciertas enfermedades en algunos órganos. Por esta razón, estos compuestos son conocidos como compuestos disruptores endocrinos (CDEs) (Monneret 2017).

Los CDEs pueden ser sintéticos (elaborados por el hombre) o de origen natural. Hoy en día, compuestos considerados CDEs son utilizados para elaborar productos que favorecer la calidad de vida del hombre. Sin embargo, durante el uso de estos productos, los CDEs pueden ser desprendidos y absorbidos por el hombre (Tijani et al. 2016). Aunado a esto, la mala disposición de residuos sólidos y productos utilizados para el cuidado personal producidos a partir de estos materiales, son

la causa principal de que estos compuestos sean liberados al medioambiente mediante descargas de drenaje principalmente.

La interacción continua con los CDEs puede ser perjudicial para la salud del hombre y de los organismos acuáticos que interaccionan con estos compuestos en los cuerpos de agua superficial. Algunas alteraciones negativas a la salud del hombre atribuidas a los CDEs son: cáncer de mama, cáncer testicular, deficiencias en la función de la tiroides (problemas de obesidad), criptorquidia, alteraciones negativas en el funcionamiento de los riñones, entre otros (Casals-Casas y Desvergne 2011). Mientras que, en peces, lagartos y ranas la interacción crónica con los CDEs puede causar feminización (Aneck-Hahn et al. 2009)

Desafortunadamente, en México no existen normas que regulen la presencia de CEes en el ambiente. Debido a esto, existe poca información acerca de su presencia en cuerpos de agua superficial, lo que representa un posible riesgo a la salud del hombre, así como a la fauna acuática. Debido a la realización de diferentes actividades socioeconómicas, diversos compuestos considerados CDEs, son liberados al ambiente a través de descargas de drenaje, por lo que, los cuerpos de agua superficial que conforman la vasta red hídrica del estado de Morelos no están exentos de la presencia de estos compuestos.

En este contexto, en este trabajo se explica la validación de un método de extracción en fase sólida (EFS) para determinar la concentración de naproxeno (NPX), ibuprofeno (IBU), 4-nonilfenol (4NP), bisfenol A (BPA), 17β -estradiol (E2) y 17α -etinilestradiol en muestras de agua superficial y un método de extracción asistida por ultrasonido (EAU – EFS) para determinar la concentración de los compuestos de interés en muestras de sedimento, obtenidas de diferentes ríos que confluyen en la microcuenca del río Apatlaco. El cual, debido a su capacidad de volumen de agua y longitud, es el cuerpo de agua más importante del estado de Morelos.

Adicionalmente, el destino en el ambiente, así como el riesgo estrogénico que aporta la presencia de los compuestos de interés en las muestras analizadas, son explicados a partir del coeficiente de distribución $\log K_d$, correlaciones entre las concentraciones detectadas y los parámetros fisicoquímicos de los cuerpos de agua, así como el riesgo estrogénico determinado como estrogenicidad equivalente a la hormona natural E2 (EEQ_{E2})

Capítulo 2

Estado del arte

2.1 Compuestos emergentes (CE)

Los CE son un grupo heterogéneo de compuestos químicos que constantemente son liberados al ambiente a través de drenajes domésticos e industriales principalmente. Estos compuestos suelen clasificarse en diversos grupos (Figura 1). Actualmente la mayoría de los países del mundo no cuentan con regulaciones que establezcan concentraciones de CE seguras en cuerpos de agua superficial (Tadeo et al. 2012).

La preocupación de la comunidad médica y científica por los CE se debe, principalmente, a la amplia presencia de estos compuestos en aguas superficiales y las alteraciones adversas a la salud que pueden ocasionar al hombre y fauna. Algunos de los efectos a la salud que pueden ocasionar este tipo de compuestos incluyen; interferencias en la actividad hormonal, genotoxicidad, cáncer de mama en hombre y mujeres, así como feminización y disturbios en la reproducción a nivel vitalogénesis en peces (Guerrero-Estévez y López-López 2016; Kabir et al. 2015; Patel et al. 2020; Tijani et al. 2016).

Dentro del grupo de CE, hay contaminantes de origen natural o sintético con la capacidad de alterar las funciones o el desarrollo de órganos en el humano y la fauna. Estos contaminantes son denominados compuestos disruptores endocrinos o CDEs (EPA 1997; Monneret 2017).

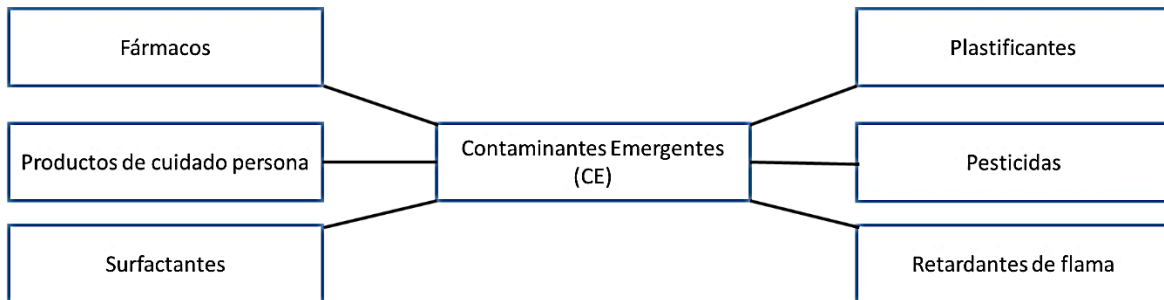


Figura 1 Clasificación de los contaminantes Emergentes

El desarrollo de cáncer de diferentes tipos y embriotoxicidad en el humano, así como alteración del ciclo reproductivo en la fauna, son algunas de las alteraciones atribuidas a los CDEs (Casals-Casas y Desvergne 2011; Kabir et al 2015; Prados et al. 2015; Toppari et al 2002; Vilela et al 2018).

En el hombre, la interacción con los CDEs puede darse de diferentes maneras, siendo las más comunes, la absorción de estos compuestos por el uso cotidiano de diversos productos, tales como utensilios de cocina hechos a partir de plásticos de baja calidad, detergentes, plásticos, protectores solares, pesticidas, productos para el cuidado personal, entre otros (Patel et al. 2020; Rashid H y Alqahtani SS 2020; Yang et al. 2015).

En el ambiente, la absorción de los CDEs puede darse mediante biomagnificación (Ruhí, Acuña, Barceló, Huerta, J.-R. Mor, et al. 2016). Los CDEs pueden ser absorbidos por las plantas a través de sus hojas y raíces (Amos Sibeko et al. 2019; Tasho y Cho 2016), especialmente cuando se acostumbra el uso de fumigantes y riego con agua proveniente de cuerpos hídricos naturales superficiales contaminados.

En la actualidad se ha determinado que estos compuestos ingresan al medio ambiente a través de diferentes fuentes, tales como las aguas residuales domésticas e industriales (Daughton 2004), a partir de residuos de plantas de tratamiento (Kolpin et al. 2002), efluentes hospitalarios (Kummerer 2011), actividades agrícolas, ganaderas (Watanabe et al. 2010) y fosas sépticas, entre otros (Swartz et al. 2006); que se encuentran en diferentes concentraciones en aguas superficiales, cuyos criterios de calidad ambiental aún no han sido especificados (Eggen et al. 2010).

Uno de los principales problemas de este tipo de compuestos, a nivel ambiental, es que no se pueden eliminar por completo de las aguas residuales mediante sistemas de tratamiento convencionales. Los cuales principalmente están diseñados para eliminar materia orgánica y nutrientes en concentraciones muy altas (g/L). Por lo tanto, los contaminantes emergentes están presentes en aguas superficiales, subterráneas y purificadas. Además, la degradación de algunos de estos compuestos en el tratamiento primario de aguas residuales o en el propio medio ambiente, pueden generar compuestos persistentes que incluso pueden ser más peligrosos, y los efectos

sinérgicos incluso pueden ocurrir si los compuestos comparten los mismos mecanismos de acción (Giger et al. 1984).

Desde 1989, la Organización Mundial de la Salud (OMS), ha desarrollado directrices para el uso seguro de las aguas residuales, y sobre esta base, cada país ha establecido su propio marco normativo. En este sentido, México ha implementado una política descentralizada para la gestión de los recursos hídricos. En particular, la Comisión Nacional de Agua (CONAGUA) fue creada, con el objetivo de llevar a cabo la gestión de los recursos hídricos, así mismo, la administración de la gestión de agua legalmente incorporada de los recursos hídricos es responsable de la formulación de políticas públicas para la gestión del agua, con el propósito de promover la participación de las partes interesadas en la coordinación del desarrollo y la gestión de agua, tierra y recursos relacionados (Agarwal et al. 2000). Sin embargo, el tratamiento y la reutilización de aguas residuales aún no se ha implementado adecuadamente en los servicios de saneamiento en términos de gestión integral del agua, esto es en parte debido a que el saneamiento no está definido dentro de la legislación del agua, además de la fragmentación institucional, lo que dificulta el desarrollo de dicha actividad (OECD 2013).

2.2 Legislación ambiental

Dentro de los alcances de la investigación de esta tesis doctoral, no se encontró una legislación oficial mexicana que regule la concentración máxima permisible de los CDEs presentes en agua natural superficial. Sin embargo, es importante mencionar que autoridades reconocidas a nivel mundial como la Agencia de Protección Ambiental de los Estado Unidos de América (ESEPA) y la Unión Europea (UE) sugieren concentraciones máximas permisibles de CDEs en el agua natural superficial para algunos de estos compuestos (EPA 2005; SCHER 2011).

Debido a los diversos efectos a la salud y a la falta de correlación entre efectos y concentración de CDEs es difícil determinar una concentración específica capaz de causar efectos adversos a la salud. Por ejemplo; la hormona sintética 17α – etinilestradiol (EE2), es un compuesto utilizado principalmente para tratamientos post menopausia específicos en mujeres, mientras que la hormona natural 17β – estradiol es un compuesto producido principalmente en órganos de la mujer, y que ayuda a mantener estables características sexuales. A pesar de que ambas hormonas son compuestos similares en estructura química (Figura 2), sus efectos a la salud son expresados en diferente orden de magnitud, por lo que autoridades regulatorias como la UE sugiere para estos compuestos una concentración máxima permitida en cuerpos de agua natural superficial de 0.035 y 0.4 ng/L para EE2 y E2 respectivamente (SCHER 2011a, 2011b). Ambos compuestos son considerados estrogénicos, debido a los efectos que pueden ocasionar en organismos expuestos.

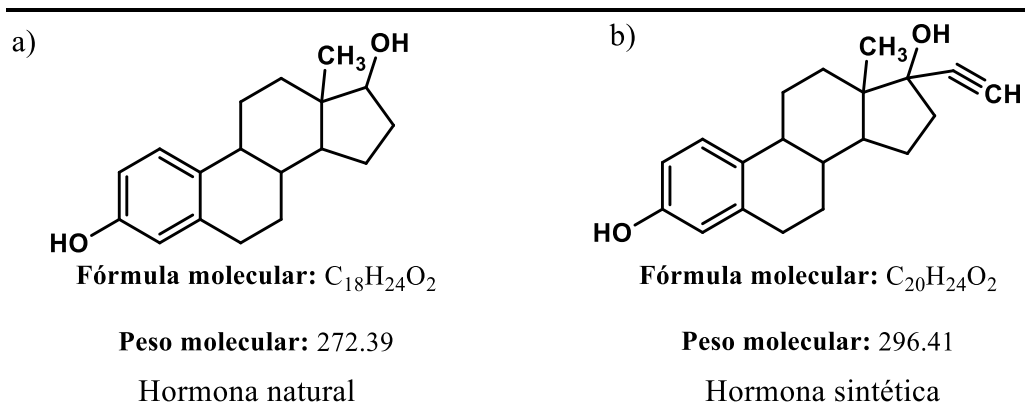


Figura 2 Estructura molecular de las hormonas (a) 17 β – estradiol (E2) Y (b) 17 α – etinilestradiol (EE2)

2.3 Presencia de fármacos y CDEs en México

En México, pocas son las investigaciones que se han realizado con el interés de determinar la concentración de fármacos o CDEs en ríos o aguas superficiales y sedimentos.

En la Tabla 1 se pueden apreciar algunos estudios realizados en aguas superficiales o sedimentos para determinar la presencia de fármacos y CDEs en México. En estos estudios se han detectado concentraciones de fármacos y CDEs que superan las concentraciones máximas recomendadas por la USEPA, así como por la UE.

La detección de este tipo de compuestos en matrices ambientales, requiere de procedimientos de tratamiento de muestras eficientes para concentrar analitos de interés y eliminar interferencias (Agüera, et al. 2013). Las técnicas tradicionales de preparación de muestras, incluyen extracción en fase sólida, microextracción en fase sólida, extracción líquido-líquido, extracción asistida por microondas, microextracción en fase líquida, extracción por sorción con barra de agitación y extracción presurizada de líquidos, entre otros (Dimpe y Nomngongo 2016a). Sin embargo, el acceso a estas técnicas requiere grandes inversiones económicas, así como personal altamente especializado para el desarrollo y validación de metodologías adecuadas. Esta situación no ha permitido realizar diagnósticos de la situación real de la presencia de estos compuestos en los principales cuerpos de agua de la República, ya que los Estados que la conforman no cuentan con los recursos necesarios.

Tabla 1 Estudios realizados en México para determinar la concentración de fármacos y CDEs presentes en agua superficial y/o sedimentos

Estado	Compuestos determinados	Referencia
Ciudad de México	Fármacos, surfactantes, productos de cuidado personal, hormonas, plastificantes, retardantes de flama.	Calderón et al. 2019; Félix-Cañedo et al. 2013; Lesser et al. 2018; Peña-Álvarez y Castillo-Alanís 2015
Guadalajara	Fármacos, hormonas.	Arguello-Pérez et al. 2019
Hidalgo	Fármacos, hormonas, plastificantes, surfactantes, productos de cuidado personal.	Díaz y Peña-Álvarez 2017; Díaz-Torres et al. 2013; Durán-Álvarez et al. 2009; Gibson et al. 2010
Hidalgo	Fármacos, hormonas, plastificantes, surfactantes, productos de cuidado personal.	Díaz y Peña-Álvarez 2017; Díaz-Torres et al. 2013; Durán-Álvarez et al. 2009; Gibson et al. 2010
Morelos	Surfactantes, plastificantes, hormonas, fármacos.	Calderón-Moreno et al. 2019; Rivera-Jaimes et al. 2018; Ronderos-Lara et al. 2018
Nuevo León	Surfactantes, plastificantes, hormonas, fármacos, ftalatos	(Cruz-López et al. 2020; López-Velázquez et al. 2021; Villarreal-Morales et al. 2020)
San Luís Potosí	Surfactantes	(Vargas-Berrones et al. 2020)

En México, existen pocos estudios que hayan determinado las concentraciones de compuestos denominados CE en aguas residuales, aguas subterráneas y aguas superficiales, casi todos han sido realizados en el centro del país (Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Morelos, y ciudad de México). Entre los compuestos reportados se encuentran estradiol, etinilestradiol, 4 – nonilfenol, bisfenol A, 4 – terc – octilfenol, naproxeno, acetaminofén, diclofenaco, bezafibrato, atenolol y carbamazepina, entre otros. Esta situación es preocupante si tenemos en cuenta la gran actividad industrial y agrícola que se desarrolla en gran parte de la República mexicana.

2.4 Tratamiento y técnicas de extracción para muestras de agua y sedimento para el análisis de CDEs y fármacos

El análisis cuantitativo o cualitativo de CDEs contenidos en agua y sedimentos, requiere que la muestra sea tratada antes de su análisis. La preparación de muestras tiene por objetivo “limpiar la muestra” o eliminar compuestos que no son de interés o que pueden interferir en la detección de los compuestos objetivos, los cuales, de no ser eliminados pueden provocar efecto matriz y, por lo tanto, sobreestimar la concentración real del analito en cuestión (Waters 2021).

Generalmente, el tratamiento de la muestra incluye la extracción de los compuestos de interés contenidos en la muestra, seguido de una reducción del volumen de disolvente en el que se encuentran los analitos extraídos.

Los CDEs pueden ser extraídos de agua y sedimento mediante diferentes técnicas de extracción (Tabla 2), con las cuales se obtienen eficiencias de recuperación cercanos al 70 %. Además, son métodos repetibles y reproducibles.

Después del tratamiento de la muestra, para obtener resultados confiables y reproducibles en la cuantificación de los analitos, es necesario validar la metodología de extracción y análisis. Con esto se logra evitar la subestimación o sobreestimación de las concentraciones obtenidas en las muestras reales.

Tabla 2 Técnicas de extracción utilizadas para la extracción de fármacos y CDEs

CE	Técnica de extracción	Matriz	Bibliografía
Fármacos	Extracción en fase sólida (EFS)	Agua	López-Serna et al. 2010; Patrolecco et al. 2013
	Extracción con líquidos presurizados	Tejidos de bivalvos, lodos	Álvarez-Muñoz et al. 2015; Nieto et al. 2010
	Extracción asistida por ultrasonido	Lodos	Gago-Ferrero et al. 2015; Martínez-Moral y Tena 2011
	QuEChERS	Tejidos vegetales	Chuang et al. 2015
	Extracción asistida por microondas	Agua y lodos	Evans et al. 2015
	Extracción con solventes (extracción sólido-líquido)	Alimentos y tejido de peces	Dasenaki y Thomaidis 2015
	Extracción con fluidos supercríticos	Alimentos	Salea et al. 2017
	Micro extracción líquido - líquido dispersiva acoplada a demulcificación con solventes	Agua	Caldas et al. 2016
CDEs	Extracción asistida por ultrasonido	Sedimentos y lodos	Albero et al. 2015
	Extracción en fase sólida (EFS)	Agua	Azzouz y Ballesteros 2014
	Extracción con líquidos presurizados	Biocapa obtenida de agua tratada	Huerta et al. 2016
	Extracción en fase sólida dispersiva	Tejidos vegetales	Mijangos et al. 2015
	Extracción asistida con microondas	Sedimentos	Jiao et al. 2015
	QuEChERS	Alimentos	Xiong et al. 2018
	Micro extracción líquido - líquido dispersiva	Agua de mar	López-Darias et al. 2010

Actualmente, en la literatura se pueden encontrar diferentes metodologías y/o normas que establecen las pautas para realizar la validación de los métodos de extracción y análisis de CDEs contenidos en agua y sedimento. Algunas de las guías oficiales disponibles son Eurachem Guide (Magnusson y Örnemark 2014), emitida por la Unión Europea. USEPA Method Validation (Mishalanie et al. 2016), emitida por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos. Validación de métodos de laboratorio de la IUPAC (Thompson et al. 2002) y la guía de validación de métodos emitida por la Asociación de Química Analítica (AOAC por sus siglas en inglés) (AOAC 2002).

En México, se cuenta con guías certificadas para la validación de métodos de análisis en laboratorios, como es el caso de la guía emitida por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA 2017); que a pesar de ser una guía de validación para pesticidas, puede ser de mucha utilidad como guía para verificar criterios que son requeridos en la validación de métodos analíticos.

2.5 Preparación de muestras ambientales

Una de las etapas más importantes dentro de la caracterización química de una muestra ambiental, es la extracción de los analitos de interés, en este proceso es común que se extraigan otro tipo de sustancias con características químicas similares, que se consideran interferencias.

Las técnicas de preparación de muestras incluyen extracción en fase sólida, microextracción en fase sólida, extracción líquido-líquido, extracción asistida por microondas, técnicas de microextracción en fase líquida, extracción por sorción con barra de agitación y extracción líquida presurizada, entre otras (Dimpe y Nomngongo 2016b). Sin embargo, debido a los objetivos de este trabajo de tesis, solo se profundizó la revisión bibliográfica para la extracción de compuestos mediante extracción en fase sólida (EFS).

Con la extracción en fase sólida es posible concentrar y aislar analitos contenidos en cierto volumen de muestra (el cual depende del tipo de adsorbente), mediante la sorción de los analitos en una fase sólida contenida dentro de un tubo o acrodisco. Dentro de las ventajas que presenta la EFS sobre otras técnicas de extracción de analitos contenidos en solución, es su bajo costo, rapidez y la amplia variedad de fases estacionarias con diferentes propiedades disponibles para la preconcentración de amplio rango de analitos, lo cual, convierte a la EFS en una técnica de amplia versatilidad (Samaras et al. 2011).

Actualmente existen diferentes materiales de adsorción, los cuales cumplen su función de acuerdo con diferentes modos de interacción con los analitos. En este sentido, los materiales más utilizados son los de fase normal y fase reversa. El mecanismo de separación en fase normal es denominado de esta manera debido a que este es el mecanismo estándar en la separación de compuestos. En donde los analitos son adsorbidos en una superficie polar mediante mecanismos de interacción tales como puente de hidrogeno, interacciones dipolo – dipolo e interacciones $\pi - \pi$ entre los grupos funcionales del analito y los sitios polares de la fase estacionaria. Por el contrario, el mecanismo de fase reversa es denominado así debido a que este es lo opuesto al mecanismo de separación de fase normal. En el cual, la adsorción de los analitos se lleva a cabo en una fase estacionaria no polar, la cual está constituida por una fase orgánica unida químicamente a la silica. En este mecanismo de separación la adsorción de los analitos en la fase estacionaria se lleva a cabo mediante interacciones no polares de tipo Vander Walls, fuerzas de dispersión y por partición. En la Figura 3 se muestran

los adsorbentes mayormente utilizadas en la separación de fase normal y fase reversa (Thurman 1998).

En la literatura científica se pueden encontrar métodos en los que diferentes fases estacionarias son utilizadas para extraer analitos contenidos en aguas superficiales (Abdelmonaim Azzouz y Ballesteros 2014b). En donde la fase estacionaria, así como los disolventes de extracción y elución son elegidos de acuerdo con el tipo de analitos que se pretenden extraer, además del tipo de interacciones analito-fase estacionaria (Thurman 1998).

Algunos de los analitos que pueden ser extraídos mediante EFS incluyen hormonas naturales o sintéticas, antidepresivos, reguladores lípidos, fármacos, pesticidas, alquilfenoles, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), así como también analitos liberados al ambiente por el uso y elaboración de productos para el cuidado personal. A continuación, se nombran algunas fases estacionarias empleadas en la extracción de los compuestos a investigar en este proyecto.

De acuerdo con la literatura, los fármacos ibuprofeno y naproxeno presentes en agua natural, son extraídos empleando fases estacionarias basadas en copolímeros de divinil-benceno, tales como Oasis HLB (Azzouz 2010; Gumbi et al. 2017; López-Serna et al. 2010), Hysphere Resine (Azzouz 2010; López-Serna et al. 2010), LiChrolut-EN, RP – C₁₈ (Azzouz 2010) y Envi C₁₈ (Gumbi et al. 2017) obteniendo porcentajes de recuperación entre 85 y 100 %. Entretanto, el bisfenol A y 4-n-nonilfenol son extraídos de matrices ambientales acuosas con porcentajes de recuperación que oscilan entre 74 y 118 %, utilizando fases estacionarias basadas en copolímeros de divinilbenceno como HLB (Xu et al. 2006; Zhao et al. 2009) y Oasis HLB (Pignotti y Dinelli 2018; Wagner y Oehlmann 2011). En la Figura 4 se presenta la estructura molecular de las fases estacionarias antes mencionadas.

En el caso de las hormonas 17 α – etinilestradiol y 17 β – estradiol los porcentajes de recuperación oscilan entre 83 y 100 %, utilizando fases estacionarias basadas en copolímeros, tales como RP – C₁₈ y Oasis HLB (Azzouz 2010).

La eficiencia de extracción de los analitos de interés puede verse afectada por diferentes aspectos, tales como el tipo de fase estacionaria, acondicionamiento previo a la extracción, disolventes involucrados en el acondicionamiento y elución de los analitos adsorbidos en la fase estacionaria, velocidad del flujo de extracción, características fisicoquímicas de los analitos y por la complejidad de la matriz de análisis.

Uno de los aspectos más importantes en la extracción en fase sólida, es la elección de la correcta fase estacionaria, la cual es seleccionada de acuerdo a la afinidad de la fase estacionaria hacia los analitos de interés, así como el origen y volumen de muestra a extraer(Thurman 1998).

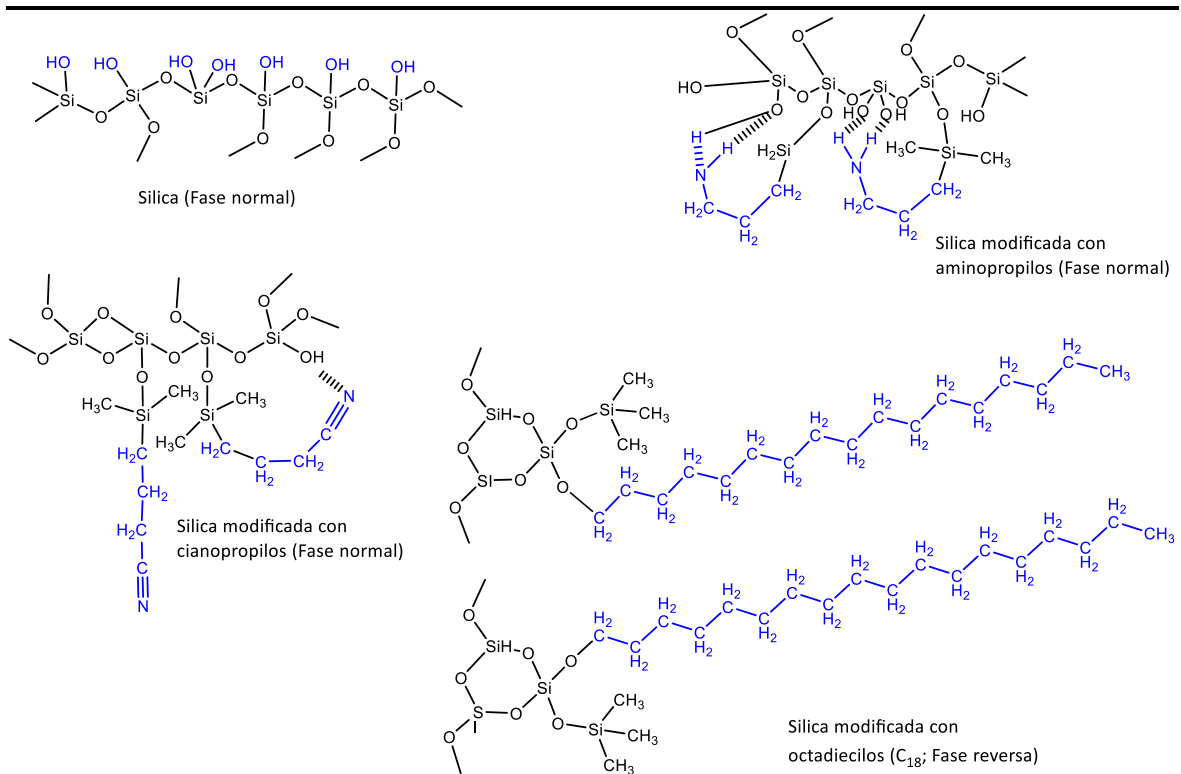


Figura 3 Principales adsorbentes utilizados en separaciones fase normal y fase reversa

Asimismo, el acondicionamiento de la fase estacionaria previo a la extracción es otro de los puntos importantes en la EFS. El acondicionamiento con diferentes disolventes, así como el uso de mezclas de estos, permitirá la solvatación de los grupos funcionales que conforman la fase estacionaria, permitiendo así la adsorción eficiente de los analitos sobre la superficie de la fase estacionaria.

Por otro lado, la elución con disolventes no adecuados de los analitos retenidos puede alterar la eficiencia de recuperación, por dos motivos en específico; la falta de afinidad entre disolvente y analito, así como el arrastre del material adsorbente o analitos que no son de interés y que podrían generar interferencia durante el análisis cromatográfico.

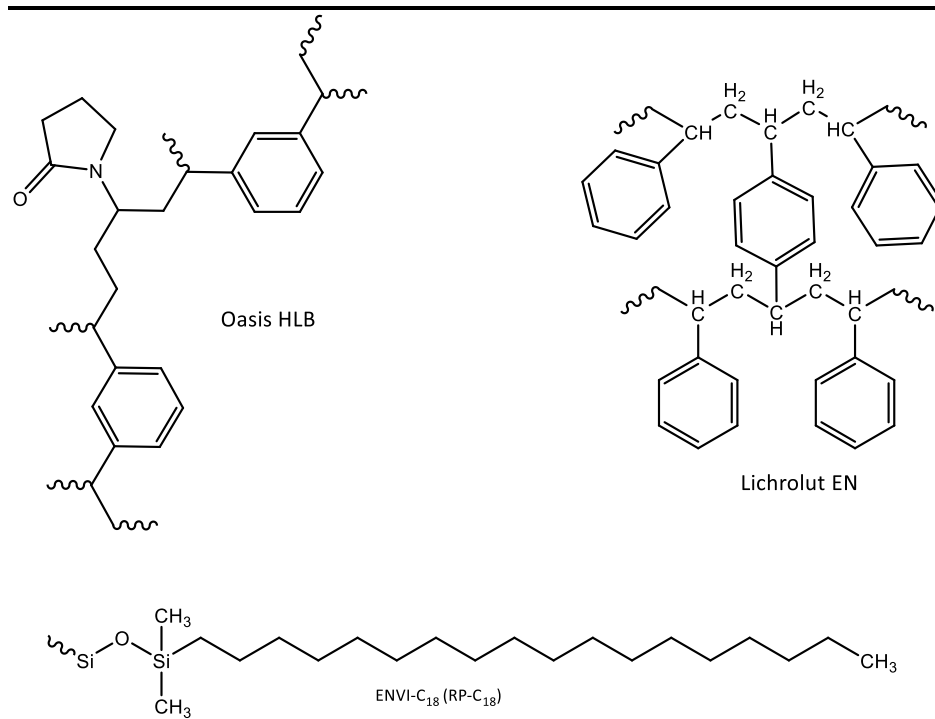


Figura 4 Estructura molecular de fases estacionarias empleadas en la extracción de fármacos y CDEs contenidos en agua

2.6 Análisis de muestras ambientales mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

La determinación de la presencia y la concentración de compuestos emergentes contenidos en muestras de agua o sedimentos es realizada principalmente mediante cromatografía de líquidos o cromatografía de gases (Ohoró et al. 2019). Sin embargo, el método de análisis debe ser seleccionado de acuerdo con las características fisicoquímicas de los compuestos a analizar. Tales como polaridad, peso molecular, estabilidad térmica, temperatura de evaporación, entre otras. El tener en cuenta estas características a la hora del análisis es crucial para la correcta determinación los compuestos de interés.

Como ejemplo pueden considerarse los fármacos naproxeno e ibuprofeno, que debido a su baja evaporación son analizados, principalmente mediante cromatografía de líquidos, de acuerdo con investigaciones recientes, del total de estudios que incluyen naproxeno e ibuprofeno, en el 92 % de los casos las muestras son analizadas mediante cromatografía de líquidos, mientras que solo en el 8 % de los estudios las muestras son analizadas mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (Carmona y Picó 2018).

El principal factor por el cual algunos investigadores prefieren utilizar cromatografía de líquidos en el análisis de muestras ambientales es la facilidad y rapidez en el tratamiento de las muestras (Marsik et al. 2017; Sebok et al. 2008). A pesar del trabajo extra que involucra el análisis mediante cromatografía de gases, algunos autores prefieren esta técnica debido a la mejor separación de compuestos (Helenkár et al. 2010). Debido a que algunos contaminantes emergentes son de baja volatilidad, es necesario modificar las moléculas mediante una reacción de derivatización, la cual es realizada con agentes derivatizantes específicos según los grupos funcionales.

La derivatización es utilizada principalmente para compuestos que, debido a su estructura molecular, no se evaporan en CG y requieren ser analizadas por esta técnica. La derivatización aporta beneficios como el aumento del grado de evaporación y estabilidad térmica, y debido a que es selectiva para grupos funcionales, puede ayudar a mejorar la resolución cromatográfica, evitando la coelución de compuestos o traslape de picos correspondientes a los compuestos (Marsik et al. 2017).

La derivatización consiste en hacer modificaciones estructurales a la molécula. A continuación, se mencionan las tres principales reacciones de derivatización: acetilización, alquilación y sililación. En la Tabla 3 se presentan algunos de los agentes derivatizantes disponibles comercialmente.

La elección del agente derivatizante a utilizar, depende principalmente de la estructura molecular de los compuestos de interés. Los agentes de acetilación reaccionan con compuestos que contienen grupos moleculares altamente polares, como aminas ácidas o carbohidratos. Los agentes alquilantes son utilizados para derivatizar compuestos que en su estructura molecular contienen grupos moleculares como aminas o hidroxilos. Mientras que los agentes de sililación reaccionan con compuestos que contienen átomos de hidrógeno activos ($-OH$). La sililación es quizá la técnica de derivatización más empleada para el análisis de compuestos mediante cromatografía de gases (Halket y Zaikin 2003). En la Figura 5 se presenta el mecanismo general de las reacciones de derivatización.

La importancia de la elección del derivatizante puede apreciarse en el siguiente ejemplo. La hormona sintética 17α -etinilestradiol contiene en su estructura molecular 2 grupos $-OH$ y un grupo etinilo. Por lo tanto, esta molécula puede ser derivatizada con todos los agentes que forman silil derivados (mostrados en la Tabla 3). Sin embargo, debido al impedimento estérico generado por el grupo etinilo ubicado en la posición 17 y al abultamiento de las moléculas derivatizantes, el grupo OH enlazado al carbono de la posición 17 únicamente puede ser derivatizado cuando el agente derivatizante es combinado con TMCS (Figura 6), que, debido a su tamaño molecular, a pesar del impedimento estérico en la posición 17, derivatiza de forma eficiente los grupos $-OH$ en las posiciones 3 y 17 (Shareef et al. 2006).

Aunque la elección del agente derivatizante es crucial para la derivatización de las moléculas a analizar, existen otras condiciones de naturaleza fisicoquímicas a tomar en cuenta, tales como

disolvente (catalizador en la derivatización), temperatura, tiempo de reacción y volumen de agente derivatizante en el medio contra cantidad de material a derivatizar.

Tabla 3 Agentes derivatizantes comercialmente disponibles

Acetilación	Alquilación	Sililación
Anhídrido acético	Tricloruro de boro- metanol 12 %	N,O-bis(trimetilsilil) – acetamida (BSA)
Ácido trifluoroacético (TFA)	Trifluoruro de boro- butanol 10 %	N,O-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA)
Anhídrido ácido trifluoroacético (TFAA)	Bromuro de pentafluorobencilo (PFBBBr)	N,O-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida + trimetilclorosilano (BSTFA + TMCS) 99:1
Anhídrido ácido pentafluoropro- pionico (PFPA)	Hidróxido de trimetilanilina (TMAH)	N-metil-N- (trimetilsilil) – trifluoroacetamida (MSTFA)
Anhídrido ácido heptafluorobutíri co (HFBA)		N-tert(butildimetilsilil)-N-metil trifluoroacetamida (MTBSTFA)

Tomado de: <http://www.sigma-aldrich.com/derivatization>

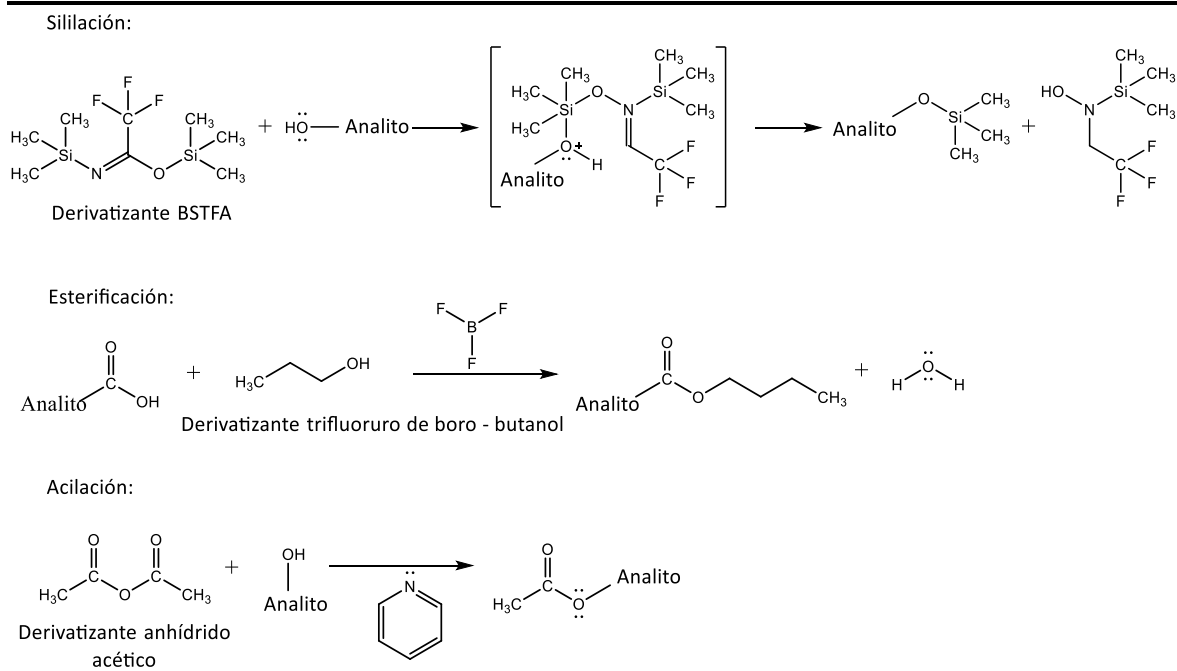


Figura 5 Mecanismo de reacción general de las diferentes derivatizaciones

En la sililación de compuestos que contienen grupos orgánicos ácidos ($-\text{OH}$) en su estructura molecular, usualmente, el metanol es utilizado como disolvente para la derivatización, debido a que los compuestos ácidos son completamente solubles en metanol. Sin embargo, existe evidencia de que, con el uso de metanol en la sililación de compuestos ácidos, el átomo de hidrógeno del grupo $-\text{OH}$ tanto del metanol, así como de las moléculas de interés es sustituido por el átomo de silicio, provocando la aparición de picos adicionales en el cromatograma (Shareef et al. 2006; Verenitch et al. 2006; Zhou et al.2007).

Por otro lado, el tiempo y la temperatura de derivatización son importantes, ya que, un lapso corto y a temperaturas inferiores a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, puede resultar en la sililación incompleta de las especies de interés, mientras que un lapso largo puede originar pérdida de tiempo en el laboratorio. Por lo tanto, en un rango de temperatura de 60 a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante un rango de tiempo de 20 a 60 minutos, son condiciones adecuadas para que la sililación de las especies de interés sea completa, ya que, de acuerdo con algunos estudios, no existen diferencias estadísticamente significativas en la eficiencia de derivatización de moléculas sometidas a estos rangos de tiempo y temperatura (Basaglia y Pietrogrande 2012; Schummer et al. 2009; Yu et al.2007).

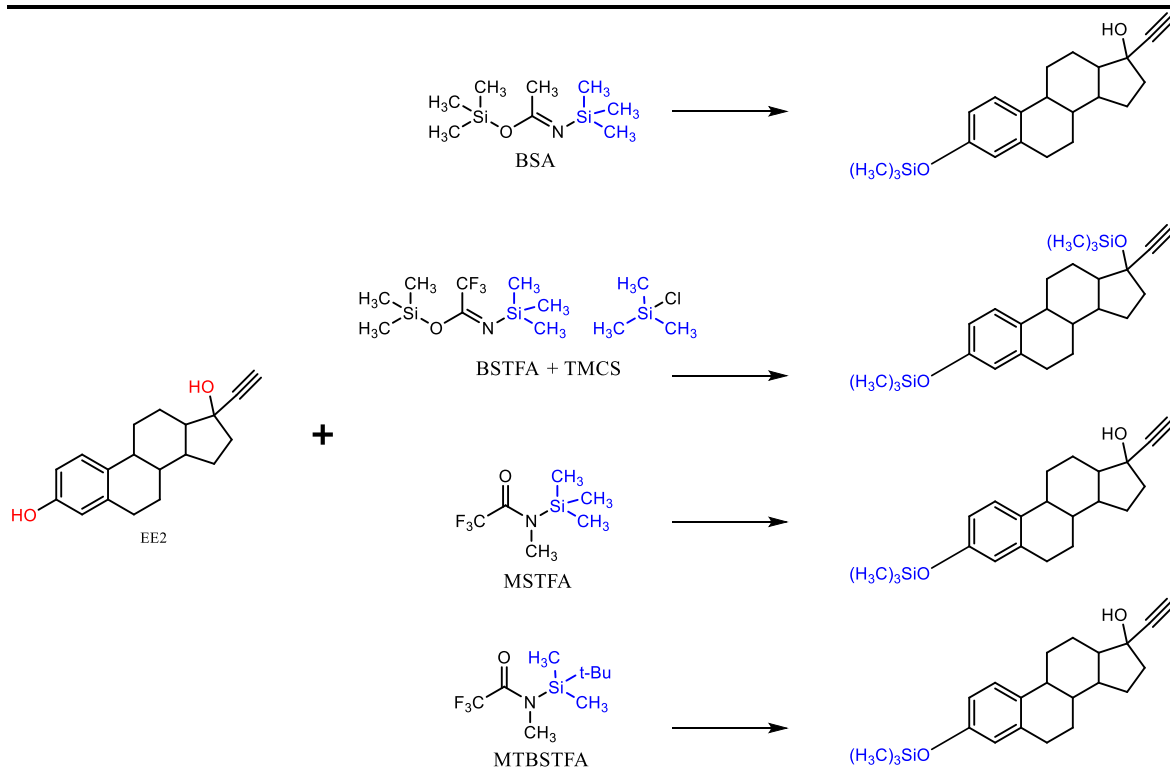


Figura 6 Efecto del agente derivatizante en las posiciones 3 y 17 en la hormona sintética EE2

Otra causa, por la cual la eficiencia de derivatización puede ser afectada, es la cantidad de agente derivatizante adicionada al medio. Ya que de no ser suficiente el volumen del agente derivatizante, parte de los compuestos de interés puede quedar sin reaccionar (Samaras et al. 2011). Desafortunadamente, debido a la complejidad de las matrices ambientales, así como de la cantidad de compuestos que estas contienen, no hay forma de determinar de manera exacta la cantidad de volumen de agente derivatizante requerido para modificar por completo el total de moléculas susceptibles a derivatización que se encuentran en la muestra. Por lo tanto, el volumen de agente derivatizante requerido, dependerá de la cantidad de materia orgánica contenida en la muestra, tomando en cuenta el origen o impacto antrópico de esta.

2.7 Presencia de contaminantes emergentes en diferentes partes del mundo

La presencia de los CE en el ambiente es perjudicial para el desarrollo de la vida de organismos terrestres y acuáticos incluyendo al hombre. En diferentes partes del mundo se han realizado estudios en agua superficial y sedimentos, lográndose detectar sustancias consideradas CDEs en concentraciones traza (ng/L).

Por ejemplo, en Lisboa, Portugal, mediante cromatografía de líquidos (CL) acoplado a espectrometría de masas de triple cuadrupolo se analizaron muestras de agua superficial, subterránea y para consumo humano, obtenidas del río Tagus, de la reserva de Castelo de Bode y de la Empresa Portuguesa de Aguas Libres S.A. (EPAL), con el objetivo de detectar y cuantificar la concentración de 10 CDEs. Únicamente se detectaron en concentraciones de ng/L los compuestos progesterona (0.8 – 1.8), 4-tert-octilfenol (27 - 29), 4NF (2.7 – 5.7) y BPA (2.9 – 4.8) (Henríquez et al. 2010).

Entretanto, en la cuenca del río Guadalupe, ubicado en España, se determinó la concentración de fármacos y productos de cuidado personal en 5 muestras de sedimentos. Las muestras fueron analizadas en cromatografía de líquidos y cuantificadas con espectrometría de masas de triple cuadrupolo. El fármaco ibuprofeno fue encontrado en una concentración de 24.93 ng/g. La acumulación en sedimentos de la cuenca del río Guadalupe de este y otros contaminantes se debe principalmente a actividades antrópicas, así como también al tratamiento veterinario de animales en granjas cercanas a esta cuenca (Biel-maeso et al.2017).

En el mismo estudio fueron realizadas determinaciones de estos compuestos en suelos utilizados para la agricultura en zonas cercanas a la cuenca del río de Guadalupe, en donde el ibuprofeno presentó una concentración de 16.14 ng/g. Probablemente, la fuente de contaminación de los suelos de cultivo es debida a las aguas con las que se riega en la zona, así como también el uso de lodos obtenidos de una planta de tratamiento de aguas, empleados para sustituir fertilizantes manufacturados.

En México también se ha reportado la presencia de diferentes CEs en cuerpos de agua superficial y potable, así como en sedimentos. Aunque la mayoría de los estudios realizados se han enfocado principalmente en la detección de metales pesados (Azpilcueta Pérez et al. 2017; Chacón et al. 2016; Gómez-Álvarez et al. 2004; Guzmán-Colis et al. 2011; Mancilla-Villa et al. 2012; Solís et al. 2006; Valles-Aragón et al. 2017), también se han realizado algunos estudios enfocados en la determinación de productos farmacéuticos y de cuidado personal, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), hormonas, entre otros (Reichert et al. 2019).

En un estudio realizado en las aguas de los humedales de Xochimilco, donde tradicionalmente se cultiva en chinampas, se detectó la presencia de bisfenol A y la 17 β -estradiol en concentraciones de hasta 140 y 2 ng/ μ L respectivamente (Díaz-Torres et al. 2013). De acuerdo con este estudio, la presencia de estos compuestos en las muestras analizadas se debe principalmente a la contaminación antrópica.

Por su parte, en el año 2007 Gibson determinó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), la presencia de 4-nonilfenol (50 ng/L), bisfenol A (20ng/L), 17 α – etinilestradiol (2.5 ng/L) y 17 β – estradiol (0.5 ng/L) en aguas superficiales, que corren desde la

ciudad de México hasta el estado de Hidalgo mediante tres canales, estas aguas son utilizadas sin tratamiento previo en regadíos (Gibson 2007).

Así mismo en el estado de Hidalgo, mediante cromatografía de gases con detector selectivo de masas se realizó la determinación ibuprofeno y naproxeno contenidos en los sedimentos del río Tula. Estos compuestos fueron detectados en todas las muestras de sedimentos analizadas, en concentraciones máximas de 0.1 y 3.7 ng/g respectivamente (Díaz y Peña-Álvarez 2017). Es importante resaltar que este río es el más contaminado de México, ya que sus aguas son impactadas por la alta densidad de descargas de aguas residuales industriales, así como por corrientes de agua contaminada provenientes de la ciudad de México (CONAGUA 2013).

Entretanto, en el Estado de Morelos, en las aguas superficiales de la cuenca del río Apatlaco se detectó la presencia de 4 – nonilfenol, bisfenol A, 17 α – etinilestradiol y 17 β – estradiol en concentraciones de hasta 85.5, 174.6, 103.6 y 624.3 ng/L respectivamente (Ronderos-Lara et al. 2018). Así mismo, en la cuenca del río Cuautla, los compuestos 4 – nonilfenol, 4 – ter – octilfenol, bisfenol A, 17 α – etinilestradiol y 17 β – estradiol fueron determinados en concentraciones de hasta 44.74, 28.08, 97.81, 4.80 y 5.77 ng/L respectivamente (Calderón-Moreno et al. 2019). En ambos estudios, los compuestos 4-nonilfenol y BPA fueron determinado en concentraciones menores a las concentraciones máximas sugeridas (6.6 μ g/L 1. 78 μ g/L respectivamente) por la USEPA (EPA 2005, 2011). Mientras que las hormonas 17 β – estradiol y 17 α – etinilestradiol fueron detectadas en concentraciones mayores a las sugeridas por la Unión Europea (0.4 ng/L y 0.035 ng/L respectivamente) (SCHER 2011b, 2011a).

Capítulo 3

Justificación, objetivos e hipótesis

3.1 Justificación

En las últimas décadas el Estado de Morelos ha experimentado un crecimiento demográfico significativo, lo que ha generado el incremento de las actividades socioeconómicas. La sobreexplotación de los recursos naturales, el inadecuado manejo de los residuos sólidos municipales, la contaminación del aire, así como de las barrancas y cuencas hidrológicas, han generado incertidumbre y preocupación en la población, dado que no se percibe una adecuada organización entre sociedad, gobierno e industrias, en la búsqueda de soluciones inmediatas que puedan preservar los equilibrios ecológicos y ambientales, que permitan mejorar la calidad de vida. Aunado a esto, la preocupación por parte de la sociedad ha ido en incremento debido a los posibles efectos adversos a la salud del humano y de organismos acuáticos ocasionados por la presencia de CDEs. Uno de los mayores problemas ambientales que se presentan en el Estado, es el deterioro de sus principales fuentes naturales de agua. En la región nacen las seis microcuencas que forman parte de la subcuenca del Amacuzac, para continuar después con la gran cuenca del Balsas. Asimismo, se localiza la cuenca del río Apatlaco, donde se concentra la mayor parte de la población del Estado de Morelos y gran parte de las actividades económicas, industriales, agrícolas y turísticas de ciudades como Cuernavaca, Jiutepec, Temixco y Jojutla, así como la zona industrial de CIVAC (Guerrero 2001).

Esta situación ha motivado a algunos grupos de investigación al desarrollo de estudios que han permitido realizar un diagnóstico de diversas sustancias orgánicas de interés ambiental, en las principales cuencas hidrológicas del Estado. Sin embargo, aún falta mucha información sobre la distribución y comportamiento de esta familia de compuestos, que permitan ser tomada en cuenta en la implementación de medidas de control y/o mitigación de esta problemática. Por tal motivo,

se planteó en el presente estudio, determinar la distribución de 4NP, BPA, E2, EE2, IBU y NPX entre agua y sedimentos en el río Apatlaco. Ya que, se presume, que estos compuestos representan un riesgo a la salud del hombre, así como a organismos acuáticos.

3.2 Objetivo general

Determinar la distribución ambiental de 4 compuestos disruptores endocrinos y 2 fármacos en el agua superficial y sedimentos del río Apatlaco.

3.3 Objetivos específicos

Optimizar y validar la metodología de extracción en fase sólida, para determinar la concentración de compuestos disruptores endocrinos y fármacos presentes en muestras de agua natural superficial.

Optimizar y validar la metodología de extracción asistida por ultrasonido para determinar la concentración de compuestos disruptores endocrinos y fármacos presentes en muestras ambientales de sedimento natural.

Estimar la distribución como coeficiente de partición ($\log K_d$) de los CDEs y fármacos analizados entre agua y sedimento en los sitios muestreados.

Determinar la posible correlación existente entre los niveles de concentración de los CDEs y fármacos seleccionados con los parámetros fisicoquímicos del agua.

3.4 Hipótesis

Debido a las descargas directas de drenajes domésticos, municipales, industriales y a que las plantas de tratamiento de agua no son capaces de eliminar totalmente compuestos disruptores endocrinos y fármacos, estos compuestos pueden ser encontrados en el agua superficial y principalmente en los sedimentos, brindando la posibilidad de generar un posible riesgo estrogénico para los organismos acuáticos que habitan estos cuerpos de agua.

Capítulo 4

Parte experimental

4.1 Acondicionamiento del material de laboratorio

Antes de su uso, el material de cristal (vasos de precipitados, probetas, pipetas serológicas y pipetas Pasteur) se lavó con agua común y jabón neutro (Hyclean-plus al 6 %). Posteriormente el material no volumétrico se mantuvo en sonicación durante 20 minutos. El proceso de lavado y sonicado fue repetido 3 veces. Después del lavado y sonicado, el material se enjuagó con abundante agua, seguido de impregnación de metanol grado HPLC y, posteriormente se sometió a calentamiento (180 °C) en estufa durante 6 horas.

En el caso del material volumétrico, después del lavado con agua y jabón, este se enjuagó con agua desionizada, seguido de impregnación de metanol grado HPLC y se dejó secar a temperatura ambiente.

4.2 Acondicionamiento de material de muestreo

El material de muestreo se refiere a instrumentos y recipientes utilizados para tomar y almacenar las muestras de agua y sedimento.

Previo al muestreo de agua y sedimentos, los frascos se lavaron con agua común y jabón neutro (Hyclean-plus al 6 %). Posterior, se mantuvieron en sonicación durante 20 minutos. El ciclo de

lavado-sonicado fue repetido 3 veces. Para eliminar posibles residuos de materia orgánica, los frascos se calentaron en estufa a 180 °C durante 6 horas. Después de dejar enfriar, los frascos se impregnaron con acetona grado HPLC, tapados y envueltos con papel aluminio.

La barrena para la toma de muestras de sedimento se lavó con agua común y jabón neutro. Posteriormente se impregnó con acetona grado HPLC.

4.3 Reactivos químicos

Los estándares 17 α – etinilestradiol (EE2, \geq 98 %) y 17 β – estradiol (E2, \geq 98 %) así como 4 – nonilfenol (4NP, \geq 99 %) e ibuprofeno (IBU \geq 98 %), se obtuvieron de Sigma-Aldrich. El estándar de bisfenol A (BPA, \geq 99 %) y el criseno deuterado (Chry-D₁₂) se obtuvieron de Supelco mientras que el estándar de naproxeno se obtuvo de Fluka (NPX \geq 99.9 %).

Los disolventes acetona (\geq 99.9 %) y metanol (\geq 99.9 %) utilizados para el acondicionamiento de material, así como en la preparación de estándares y muestras ambientales fueron grado HPLC de la marca Reactivos Química Meyer (99.9 %). Antes de su uso, los volúmenes de disolventes utilizados se filtraron bajo condiciones de vacío a través de filtro de nylon de la marca Pall, 0.2 μ m y 47 mm de diámetro.

Para la extracción de muestras de agua y sedimento, se utilizaron cartuchos de EFS en fase reversa de 500 mg de la marca Chromabond (Macherey-Nagel), constituidos de silica modificada con octadecilos (C₁₈, encapad), empacada en tubos de 6mL.

Para la derivatización se utilizó N, O – bis(trimetilsilil) – trifluoroacetamida + trimetilclorosilano (BSTFA + TMCS, 99:1, Supelco) y piridina (99.8 %, Sigma-Aldrich).

4.4 Preparación de soluciones

4.1.1 Soluciones stock

Individualmente se pesaron 10 mg de cada estándar, y por separado se disolvieron en 10 mL de acetona (concentración obtenida de cada estándar = 10×10^6 ng/mL).

4.1.2 Soluciones madre

Por separado, a partir de las soluciones stock se tomaron los volúmenes requeridos para preparar soluciones de 5000 ng/mL en acetona.

4.1.3 Solución estándar de trabajo

A partir de las soluciones madre, de cada estándar se tomaron y mezclaron en un matraz, los volúmenes requeridos para obtener una solución multiestándar de 500 ng/mL.

4.5 Calibración del equipo cromatográfico

A partir de la solución estándar de trabajo se prepararon soluciones de 0, 10, 40, 80, 160, 240 y 320 ng/mL, en volumen final de 0.12 mL.

4.6 Derivatización

Previo a la inyección cromatográfica, los compuestos contenidos en los viales se derivatizaron. Para esto, el remanente obtenido y filtrado posterior a la reducción de volumen en rota evaporador, contenido en vial de inyección, se llevó a sequedad total mediante exposición a N₂ grado cromatográfico. Posteriormente el remanente se resuspendió en 50 µL de BSTFA + TMCS (99:1) + 50 µL de piridina). Enseguida, para favorecer la reacción de derivatización, los viales se sometieron a baño de agua a 70 °C por 40 min. Después de que los viales alcanzaron temperatura ambiente, a cada vial se le agregaron 20 µL de una solución de Chry-D₁₂ (9000 ng/mL) preparado al momento en derivatizante y piridina (1:1).

4.7 Análisis cromatográfico

El análisis de las muestras previamente derivatizadas fue realizado en un cromatógrafo de gases (Agilent modelo 6890N) acoplado a un espectrómetro de masas (Agilent modelo 7000D).

La temperatura del inyector durante la inyección de muestras se mantuvo a 280 °C. En cada análisis fue inyectado 1 µL de muestra, en modo splitless (1 segundo). El gas transportador de la muestra empleado fue helio (99.999 %) empleando un flujo de 1 mL/min. La separación de los compuestos fue realizada en una columna capilar (Agilent HP5-MS de 30 m de longitud x 0.25 mm de diámetro y 0.25 µm de recubrimiento interno). La temperatura de la columna inició en 120 °C, manteniéndose por 2 minutos. Posteriormente, fue incrementándose 15 °C cada minuto hasta llegar a 250 °C. Inmediatamente después, la temperatura continuó incrementándose 5 °C por minuto hasta llegar a 300 °C. La línea de transferencia del cromatógrafo al espectrómetro de masas se mantuvo a 310 °C. La ionización de las moléculas de los compuestos fue realizada mediante impacto electrónico (IE) utilizando una energía de ionización de 70 eV. La fuente de ionización se mantuvo a 200 °C. La identificación de las moléculas de interés fue realizada en modo SIM.

4.7.1 Identificación de los compuestos mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)

La identificación de los compuestos mediante CG-EM fue realizada mediante la inyección individual de los estándares de interés (500 ng/mL). A partir de esta inyección, fue obtenido el tiempo de retención correspondiente a cada compuesto, así como su patrón de fragmentación (modo SCAN). Posteriormente fueron seleccionados los iones (m/z) de mayor abundancia para cada compuesto (Tabla 4). De esta manera, los compuestos de interés contenidos en las muestras ambientales fueron identificados mediante dos criterios: patrón de fragmentación (modo SIM) y tiempo de retención correspondientes a cada compuesto.

Posteriormente, para comprobar la correcta separación de las señales correspondientes a cada estándar (selectividad del método instrumental), fue preparada y derivatizada una solución de 500 ng/mL. La cual contenía cada uno de los estándares de interés, así como 1500 ng/mL de Chry-D₁₂.

Tabla 4 Identificación de los estándares de interés mediante CG-EM

Compuesto	Tiempo de retención (minutos)	Ion de cuantificación	Iones de confirmación
IBU-TMS	7.27	160	263, 234, 278
4NP-TMS	9.48	179	292, 277
NPX-TMS	10.6	185	243, 287, 302
BPA-TMS	11.43	357	372, 207
E ₂ -TMS	15.37	285	232, 416
EE ₂ -TMS	16.51	232	196, 425, 440

4.8 Evaluación del desempeño del método analítico

4.8.1 Respuesta analítica de fármacos y CDEs disueltos en diferentes disolventes

Previo a la elaboración de las soluciones que conforman la recta de calibración se determinó la respuesta analítica (mayor respuesta) para los estándares disueltos en diferentes disolventes. Para esto, fueron realizadas pruebas de inyección de los estándares de interés disueltos en diferentes disolventes.

En 3 viales diferentes, fueron colocados 19.2 μL de la solución de trabajo. Posteriormente el disolvente fue evaporado hasta sequedad total mediante exposición a N_2 y fueron sometidos al proceso de derivatización (concentración final 80 ng/L).

Para cambiar el disolvente, 2 de los viales fueron expuestos a N_2 hasta sequedad total. Los remanentes fueron resuspendidos en 120 μL de tolueno o acetona, para obtener así los derivados disueltos en 3 diferentes disolventes: acetona, tolueno y derivatizante + piridina. Posteriormente los viales fueron llevados a inyección en el cromatógrafo de gases.

4.8.2 Calibración del equipo cromatográfico

Después de seleccionar el disolvente que dio mejor respuesta en la inyección de los estándares derivatizados, se realizó la calibración del equipo mediante la inyección de 6 concentraciones diferentes de los estándares previamente derivatizados (10, 40, 80, 160, 240 y 320 ng/mL), así como un blanco de disolventes (derivatizante + piridina + Chry-D₁₂). Cada una de las soluciones con excepción del blanco, contenía los estándares EE2, E2, 4NP, BPA, IBU, NPX y Chry-D₁₂ (Tabla 5).

Tabla 5 Niveles de concentración utilizados para la calibración del equipo cromatográfico

Nivel	Concentración (ng/mL)	Chry-D ₁₂ (ng/mL)
Blanco	0	1500
1	10	1500
2	40	1500
3	80	1500
4	160	1500
5	240	1500
6	320	1500

4.8.3 Linealidad y rango lineal

La linealidad de la respuesta analítica fue medida a través de la gráfica de calibración, obtenida para cada compuesto y validada mediante el coeficiente de correlación (r), obtenido mediante la regresión lineal. Para determinar si el valor de " r " es significativo para cada compuesto, se aplicó el estadístico *t-Student* (ecuación 1), utilizando un nivel de confianza de 95 %.

$$t = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \text{ ----- Ecuación 1}$$

Donde:

t = estadístico de Student

n = niveles de concentración en la recta de calibración

r = coeficiente de correlación obtenido mediante regresión lineal

Para este estadístico, la hipótesis nula es que no existe correlación significativa entre las variables concentración y la respuesta analítica para cada estándar analizado. Por lo tanto:

H_0 : la correlación entre las variables no es significativa.

H_1 : La correlación entre las variables es significativa.

Por otro lado, el intervalo lineal para cada compuesto fue identificado mediante la proporción de la respuesta analítica de cada estándar en los diferentes niveles de concentración, a través del valor de r .

4.8.4 Regresión lineal ponderada

Para minimizar la variación de la respuesta analítica en los distintos niveles de concentración de la recta de calibración de cada compuesto, fue aplicada la ponderación de datos para obtener los valores del intercepto y la pendiente ponderados (a_w y b_w respectivamente) de acuerdo con Miller y Miller (Miller y Miller 2002).

Antes de proceder a realizar la ponderación de datos en las rectas de calibrado, fue aplicado el estadístico de Fisher (F) de dos colas con 2 grados de libertad, para determinar si existen variaciones significativas entre los diferentes niveles de concentración que conforman cada recta de calibrado utilizando las siguientes hipótesis:

Ho: No hay diferencia significativa entre la variación presente en los niveles de concentración

Hi: La variación entre los niveles de concentración es significativa

4.8.5 Límite de detección y límite de cuantificación

A partir de la ponderación de datos aplicada a la regresión lineal de cada compuesto, fue obtenido el límite de detección (LDD) y el límite de cuantificación (LDC) instrumental para cada compuesto.

El límite de detección instrumental (LDD_i; ecuación 2). fue calculado en términos del límite de detección de Y (LDD_y), a partir de la interpolación en la ecuación de la regresión ponderada.

$$LDD_i = \frac{LDD_y - a_w}{m_w} \text{ ----- Ecuación 2}$$

El LDD_y (ecuación 3), fue determinado a partir de los valores del intercepto ponderado (a_w) más 3 veces el valor calculado para el error de Y en X (S_(y/x)w).

$$LDD_y = a_w + 3 * S_{(y/x)w} \text{ ----- Ecuación 3}$$

Donde:

a_w = valor ponderado del intercepto.

b_w = valor ponderado de la pendiente.

S_(y/x)w = error de Y en X.

Por otro lado, el límite de cuantificación instrumental (LDC_i) fue determinado en términos del límite de cuantificación en Y (LDC_y; ecuación 4), obtenido de:

$$LDC_y = a_w + 10 * S_{(y/x)w} \text{ ----- Ecuación 4}$$

Donde:

a_w = valor ponderado del intercepto.

S_(y/x)w = error de Y en X.

Así, el LDC_i (ecuación 5) fue calculado a partir de la interpolación de la ecuación en la recta de calibración mediante:

$$LDC_i = \frac{LDC_y - a_w}{m_w} \text{ ----- Ecuación 5}$$

Donde:

a_w = valor ponderado del intercepto.

m_w = valor ponderado de la pendiente.

4.8.6 Métodos de extracción y derivatización

4.8.6.1 Metodología general

4.8.6.1.1 Extracción en fase sólida (muestras de agua)

Previo a la extracción de las muestras de agua, la fase estacionaria fue acondicionada a gravedad en 4 etapas:

1. 6 mL de acetona – MeOH.
2. 6 mL de MeOH grado HPLC.
3. 6 mL de agua desionizada.
4. 6 mL de la muestra a extraer.

Posteriormente, en cámara de extracción y aplicando vacío, la muestra fue extraída aplicando un flujo de 5 – 6 mL/min.

Después de la extracción de 50 mL de muestra, la fase estacionaria fue lavada con 10 mL de agua desionizada y secada durante 20 minutos con vacío. Los compuestos retenidos fueron eluidos a gravedad con 10 mL del sistema de disolventes utilizado en la primera etapa del acondicionamiento. El volumen del eluato fue reducido mediante rota evaporación hasta 0.5 mL aproximadamente. El remanente fue filtrado a través de acrodisco de nylon de 0.45 μ m y transferido a vial de inyección. El disolvente fue evaporado mediante exposición a N_2 grado cromatográfico hasta sequedad total y posteriormente fue sometido a derivatización. En la Figura 7 se presenta el procedimiento realizado para el acondicionamiento de la fase estacionaria en la extracción en fase sólida.

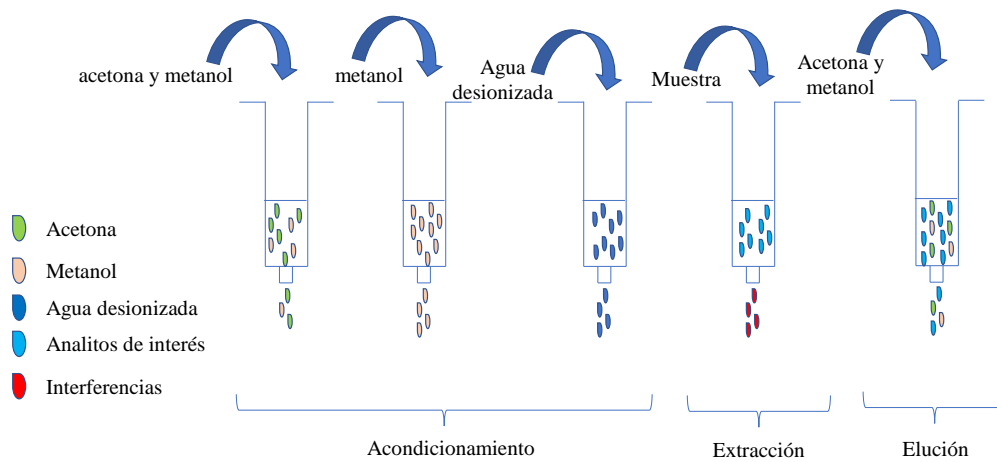


Figura 7 Procedimiento de la extracción en fase sólida

4.8.6.2 Extracción asistida por ultrasonido (muestras de sedimento)

Para realizar la extracción asistida por ultrasonido, 10 mL de la mezcla de disolventes especificada en el procedimiento para cada prueba fueron agregados a 10 g de sedimento contenido en tubo de teflón para centrifuga. Inmediatamente la muestra fue agitada vigorosamente mediante un Vórtex durante 15 segundos. Posteriormente la muestra fue extraída en baño de agua con ultrasonido durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de la extracción, la muestra fue centrifugada a 4400 rpm y la fase líquida fue cuidadosamente transferida a un matraz de bola. La extracción fue realizada por triplicado y la fase líquida de las 3 extracciones fue combinada. Enseguida, el disolvente fue evaporado hasta sequedad casi total. El remanente fue resuspendido en 1 mL de MeOH y aforado a 50 mL con agua desionizada. Para la limpieza y derivatización, la muestra fue tratada como se indica en el apartado de extracción en fase sólida.

4.9 Optimización de los métodos de extracción

4.9.1 Extracción en fase sólida

La optimización del método de extracción en fase sólida fue realizada en dos etapas. En las que fue evaluada la eficiencia de extracción obtenida con diferentes proporciones de acetona y metanol en el acondicionamiento de la fase estacionaria y elución de los compuestos retenidos, así como la eficiencia de extracción obtenida con diferente pH de la muestra.

Para la optimización del método de extracción en fase sólida fueron preparadas muestras de agua desionizada enriquecidas con 19.2 μL de la solución estándar de trabajo (500 ng/mL). En la etapa uno, fue evaluado el efecto en la respuesta analítica (porcentaje de recuperación) de los estándares a través de modificaciones de la proporción de acetona y metanol (1:0, 0:1, 1:1, 1:2 y 2:1) utilizadas para el acondicionamiento de la fase estacionaria. En la segunda etapa, fue evaluada la influencia de extracción para los estándares con variaciones en el nivel de pH de la muestra (2, 7 y 9).

4.9.2 Eficiencia de extracción con diferentes proporciones de acetona-metanol

El acondicionamiento de la fase estacionaria (Chromabond C_{18}) fue realizado de acuerdo con el apartado de extracción en fase sólida; método general (4 etapas).

Para determinar la influencia de la proporción de disolventes en la extracción, en la primera etapa del acondicionamiento fueron empleadas por separado las diferentes proporciones de acetona – MeOH, para cada proporción de disolventes fue realizada una extracción por duplicado (Tabla 6). En las etapas 2, 3 y 4 no fue realizada ninguna modificación. En la elución de los compuestos retenidos fue utilizada la misma proporción de disolventes utilizada en la etapa 1 del acondicionamiento.

Para esta evaluación, por triplicado 19.2 μL de la solución estándar de trabajo fueron adicionados a un matraz con agua desionizada y aforado hasta 50 mL. Las muestras se mantuvieron en agitación por 1 hora antes de ser extraídas. Después de la elución de compuestos, las muestras fueron sometidas a proceso de derivatización y analizadas mediante CG-EM.

Tabla 6 Proporción de disolventes utilizada para el acondicionamiento de la fase estacionaria

Sistema	Proporción
Acetona	1
MeOH	1
Acetona - MeOH	3:2
Acetona - MeOH	2:3
Acetona - MeOH	1:1

4.9.3 Influencia del pH de la muestra en la eficiencia de recuperación

Posterior a la determinación de la proporción de acetona – MeOH que brinda mayor eficiencia de extracción, se evaluó el efecto del pH de la muestra en la eficiencia de extracción de los estándares. Para esto, fueron extraídas muestras de agua desionizada a 3 diferentes valores de pH (2, 7 y 9).

Muestras de 50 mL de agua desionizada que contenían 19.2 µL de la solución estándar de trabajo se mantuvieron en agitación por 1 hora. Después de la agitación, el pH de las soluciones fue modificado mediante la adición del volumen requerido de ácido sulfúrico concentrado para alcanzar un pH ≈ 2 o hidróxido de sodio 1 N para las soluciones de pH ≈ 9. Posteriormente las muestras se mantuvieron en agitación durante 30 minutos y enseguida fueron extraídas mediante extracción en fase sólida. Para la extracción en la primera etapa del acondicionamiento de la fase estacionaria fueron empleados 6 mL de acetona-metanol 3:2. Después de la extracción, los compuestos adsorbidos en la fase estacionaria fueron eluidos con 10 mL de acetona-metanol 3:2. Enseguida las muestras fueron filtradas en acrodisco de nylon y sometidas a derivatización para su análisis mediante CG-EM.

4.10 Extracción asistida por ultrasonido para muestras de sedimento

4.10.1 Selección del disolvente de extracción

La optimización del método de extracción asistida por ultrasonido consistió en determinar el efecto de diferentes disolventes en el porcentaje de extracción de los estándares extraídos. Para lo cual, fueron empleadas muestras de sedimento obtenido de manantial y previamente secado mediante exposición al aire libre dentro de una campana de extracción con temperatura ambiente (23 – 28 °C).

Por triplicado fueron pesadas 3 muestras de 10 g de sedimento y posteriormente enriquecidos con 19.2 μ L de la solución estándar de trabajo. Posteriormente fueron agregados 10 mL de acetona. Las muestras fueron guardadas en la obscuridad hasta evaporación total del disolvente. Enseguida las muestras fueron extraídas como se indica el apartado general de extracción asistida por ultrasonido, utilizando como disolvente de extracción los disolventes de la Tabla 7, con los cuales, según Löffler et al 2003 y Gumbi et al 2017, se pueden obtener eficiencias de extracción superiores a 80 %.

Tabla 7 Disolventes empleados en la optimización de la extracción asistida por ultrasonido

Sistema	Proporción	Bibliografía
Acetona - metanol	3:2	Propuesta en este trabajo
Acetona - acetato de etilo	1:1	Gumbi et al. 2017
Acetona - ácido acético	20:1	Löffler y Ternes 2003

4.11 Validación de los métodos de extracción

4.11.1 Extracción en fase sólida

4.11.1.1 Robustez

Posterior a la optimización del método de extracción en fase sólida, la robustez del método se evaluó en 3 diferentes tipos de agua; manantial, residual doméstica y tratada. El desempeño de extracción en fase sólida fue evaluado en términos de eficiencia de recuperación y precisión (evaluada como repetibilidad y reproducibilidad).

4.11.1.2 Eficiencia de extracción

La eficiencia de extracción fue medida en términos de porcentaje de recuperación para los estándares de los compuestos de interés en tres tipos de agua diferentes: muestras de agua provenientes de manantial, un cuerpo de agua impactado por descargas de drenajes domésticos y un cuerpo de agua impactado por descargas de plantas de tratamiento de agua principalmente.

Para determinar la eficiencia de extracción fueron analizadas muestras de agua de 50 mL de cada matriz enriquecida con 19.2 μ L de la solución estándar de trabajo (n=2), adicionalmente fue analizada una muestra de agua natural de 50 mL sin enriquecimiento y un estándar de los

compuestos de interés de 80 ng/mL preparado a partir de la solución estándar de trabajo (500 ng/mL).

La eficiencia de extracción fue determinada como el cociente obtenido de la señal cromatográfica de las muestras de agua ambiental y la señal cromatográfica, correspondiente al estándar en disolvente (ecuación 6).

$$\% \text{ recuperación} = \frac{S_{me} - S_m}{S_{std}} * 100 \text{ ----- Ecuación 6}$$

Donde:

S_{me} = Señal cromatográfica correspondiente a la muestra enriquecida con estándares.

S_m = Señal cromatográfica correspondiente a la muestra sin enriquecimiento.

S_{std} = Señal cromatográfica correspondiente a los estándares disueltos en disolvente.

4.11.1.3 Precisión

La precisión fue evaluada en términos de repetibilidad a una misma concentración y la reproducibilidad fue evaluada a 2 concentraciones diferentes.

La repetibilidad fue evaluada como % de variación (ecuación 7) de la respuesta analítica de 2 muestras de agua natural enriquecidas con 19.2 µL de la solución estándar de trabajo.

$$\% \text{ variación} = \frac{\sigma_{80}}{\bar{x}_{80}} * 100 \text{ ----- Ecuación 7}$$

Donde:

σ_{80} = Desviación estándar de la respuesta obtenida para conjunto de señales de 80 ng/mL (n=2).

\bar{x}_{80} = Promedio de la respuesta obtenida para el conjunto de señales de 80 ng/mL (n=2).

Por otro lado, para determinar la reproducibilidad del método de extracción fueron procesados 2 muestras de agua natural de 50 mL enriquecidas con 19.2 µL de la solución estándar de trabajo y 2 muestras enriquecidas con 38.4 µL de la solución estándar de trabajo. Así, la reproducibilidad del método fue evaluada a dos concentraciones diferentes (80 y 160 ng/mL).

La reproducibilidad fue expresada como el porcentaje de variación (ecuación 8) obtenido a partir del porcentaje de recuperación obtenido de las muestras enriquecidas con 19.2 y 38.4 µL de la solución estándar de trabajo.

$$\% \text{ variación} = \frac{\bar{\sigma}_{80,160}}{\bar{x}_{80,160}} * 100 \text{ ----- Ecuación 8}$$

Donde:

$\bar{\sigma}_{80,160}$ = Promedio de la desviación estándar obtenida para el porcentaje de recuperación correspondiente a 80 y 160 ng/mL (n=4).

$\bar{x}_{80,160}$ = Promedio determinado a partir de los promedios correspondientes al porcentaje de recuperación obtenido para las muestras enriquecidas con 80 y 160 ng/mL.

4.12 Extracción asistida por ultrasonido

4.12.1 Robustez del método de extracción

Después de la optimización del método de extracción en fase sólida para muestras de agua, la robustez del método de extracción por ultrasonido se evaluó en 3 diferentes tipos de sedimento, obtenidos de un cuerpo de agua de manantial, y cuerpos de agua impactados por descargas de drenajes domésticos y por descargas de una planta de tratamiento de agua. El desempeño fue evaluado en términos de eficiencia de recuperación y precisión (evaluada como repetibilidad y reproducibilidad).

4.12.2 Eficiencia de extracción

La eficiencia de la extracción fue medida en términos del porcentaje de recuperación para los estándares de los compuestos de interés. Para determinar la eficiencia de extracción, fueron analizadas dos muestras de sedimento (10 g) enriquecidas con 19.2 µL de la solución estándar de trabajo (500 ng/mL), adicionalmente fue procesada una muestra de sedimento (10 g) no enriquecida y un estándar 80 ng/mL preparado a partir de la solución estándar de trabajo.

El porcentaje de recuperación (ecuación 6) fue calculado como el cociente obtenido del promedio de la respuesta analítica de 2 muestras enriquecidas (19.2 μL) menos la respuesta de una muestra no enriquecida, entre la respuesta analítica de los estándares contenidos en disolvente (80 ng/mL).

4.12.3 Precisión

La precisión fue determinada en términos de repetibilidad y reproducibilidad. La repetibilidad se calculó mediante el análisis de 2 muestras de sedimento (10 g) enriquecidas con los 19.2 μL de la solución estándar de trabajo (500 ng/mL). Entretanto, la reproducibilidad fue determinada con dos concentraciones diferentes, mediante el análisis de 2 muestras de sedimento (10 g) enriquecidas con 19.2 μL de la solución estándar de trabajo y 2 muestras de sedimento (10 g) enriquecidas con 38.4 μL de la solución estándar de trabajo.

El porcentaje de repetibilidad y reproducibilidad del método de extracción fue determinado de acuerdo con las ecuaciones 7 y 8 respectivamente.

4.13 Aplicación de los métodos desarrollados a muestras ambientales de agua y sedimento

4.13.1 Muestreo

Las muestras de agua y sedimento fueron colectadas de manera simultánea en febrero 2020, en diferentes cuerpos de agua superficial ubicados en el Estado de Morelos México. Los sitios de muestreo (Figura 8) fueron seleccionados tomando en cuenta 2 características principales; flujo de corriente casi nulo y ausencia de fluctuaciones del agua (sin turbulencias). Las muestras de agua y sedimentos fueron tomadas al mismo tiempo en el mismo punto (Tabla 8), en diferentes sitios (NMX-AA-112-1995 - SCFI 1996).

Tabla 8 Coordenadas de los sitios de muestreo

Sitio	Ubicación
Tetela del Monte (TTL)	18°57'44.35"N 99°15'49.49"O
Chapultepec (CPTP)	18°54'36.48"N 99°12'37.10"O
Temixco 1 (TMC1)	18°51'17.67"N 99°13'25.01"O
Temixco 2 (TMC2)	18°51'15.10"N 99°13'20.00"O
Jiutepec (JTPEC)	18°51'29.94"N 99° 9'53.42"O

Las muestras de agua fueron colectadas en frascos de vidrio, los cuales fueron previamente acondicionados como se indica en el apartado de acondicionamiento de material de muestreo (apartado 4.2).

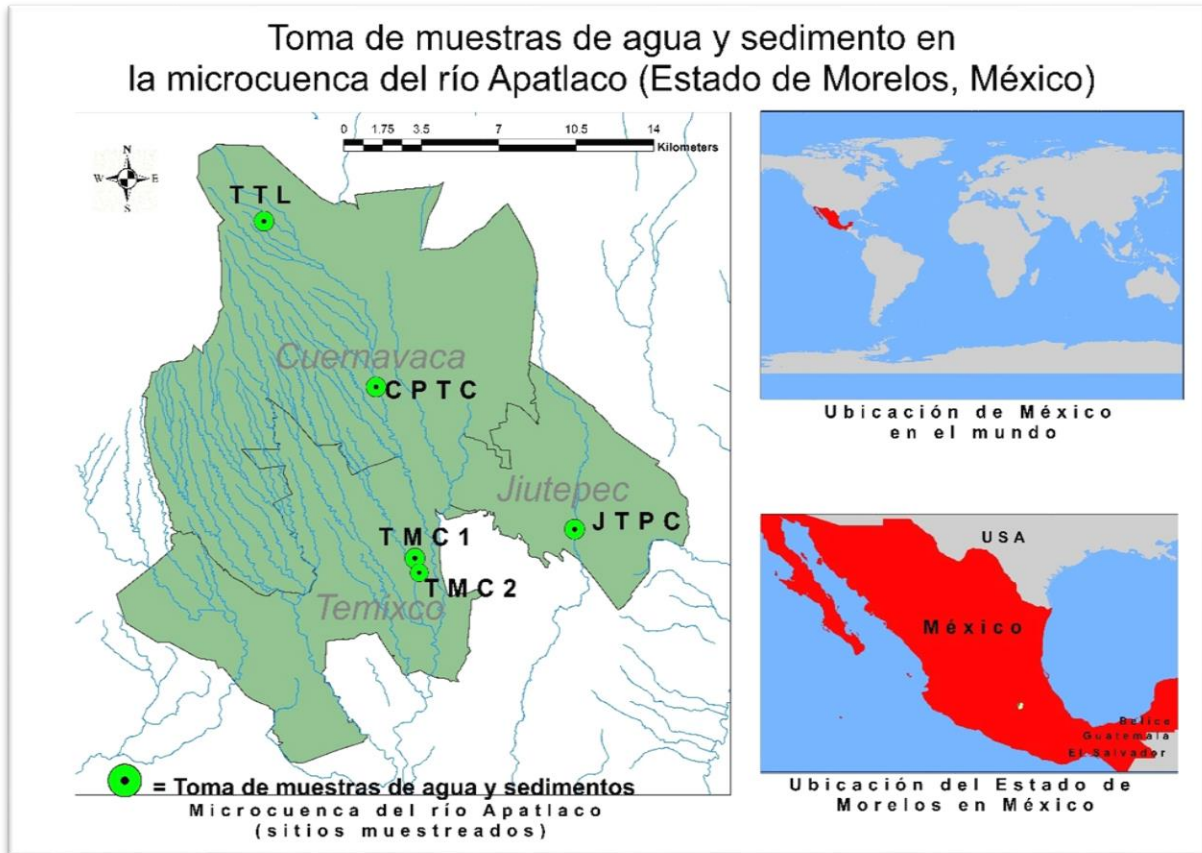


Figura 8 Sitios muestreados

En cada punto de muestreo se tomaron 3 volúmenes de muestras (1, 0.5 y 0.25 L). De estas, la muestra de 1 L fue utilizada para determinar porcentaje de recuperación y la concentración ambiental de los CDEs de interés. La muestra de 0.5 L fue utilizada para determinar demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅) y la muestra de 0.25 L fue preservada con H₂SO₄ (pH ≈ 2) y utilizada para determinar carbono orgánico total (COT), así como demanda química de oxígeno (DQO). En el sitio de muestreo fueron medidos los parámetros de temperatura, pH y conductividad. Estos parámetros fueron medidos con un equipo portátil multiparámetros HATCH modelo HQ 40d.

Las muestras de sedimento (1 Kg) fueron colectadas en frascos de vidrio, previamente acondicionados como se indicó anteriormente en el apartado 4.2.

Las muestras de sedimentos se obtuvieron con una barrena de acero inoxidable, la cual fue enterrada varias veces en un perímetro de 30 x 30 cm a 25 cm de profundidad (a partir de la capa superior de sedimentos).

4.13.2 Preservación de muestras

Las muestras de agua y sedimento fueron transportadas al laboratorio manteniendo una temperatura de 4 °C. Una vez en el laboratorio, las muestras de agua fueron refrigeradas a 4 °C, mientras que las muestras de sedimento fueron expuestas al aire ambiente dentro de campana de extracción a temperatura ambiente (24 – 29 °C) y aisladas de la luz directa, hasta conseguir sequedad total (2 días y 3 noches). Posteriormente, los sedimentos fueron triturados y tamizados a través de malla 2.0 mm (tamaño de orificio). Finalmente, las muestras fueron almacenadas en frascos de vidrio y se refrigeraron hasta su análisis.

4.13.3 Extracción en fase sólida aplicada a muestras de agua natural superficial

Las muestras de agua fueron extraídas mediante extracción en fase sólida. Antes de la extracción, la fase estacionaria (Chromabond-C₁₈, 500 mg, 6 mL) fue acondicionada a gravedad con 6 mL de metanol-acetona (2:3), seguido de 6 mL de metanol y 6 ml de agua desionizada por separado y en este orden.

Posteriormente, las muestras de agua natural fueron filtradas a través de la fase estacionaria manteniendo un flujo de 4 – 6 mL/min. Al finalizar la filtración de las muestras, la fase estacionaria fue lavada con 10 mL de agua desionizada y se mantuvo en con vacío durante 20 minutos.

Los compuestos retenidos en la fase estacionaria fueron eluidos a gravedad con 10 mL de metanol-acetona (2:3). El eluato obtenido fue evaporado hasta 0.5 mL aproximadamente en rota evaporador. Posteriormente, el remanente fue filtrado a través de acrodisco de nylon 0.45 µm. El remanente obtenido se llevó a sequedad total mediante exposición a N₂.

4.13.4 Extracción asistida por ultrasonido aplicada a muestras de sedimento natural

En el caso de los sedimentos, 10 g de cada muestra fueron pesados por separado. Posteriormente fueron adicionados 10 mL de acetona a cada muestra y éstas, fueron almacenadas en oscuridad a temperatura ambiente hasta evaporación total del disolvente (1 día y 1 noche).

Para efectuar la extracción de los compuestos de interés, 10 mL de acetona-metanol (3:2) fueron agregados a cada muestra. Para conseguir el máximo contacto posible entre el sedimento y el disolvente, las muestras fueron agitadas en vórtex durante 15 segundos, y enseguida fueron sometidas a ultrasonido con baño de agua por 20 minutos a temperatura ambiente. Al finalizar el tiempo de extracción, las muestras fueron centrifugadas a 4500 rpm durante 5 minutos, hasta obtener la completa separación de las fases líquido-sólido. Cada extracción se repitió tres veces y las fracciones de la fase líquida obtenidas, correspondientes a cada muestra fueron combinadas.

Para la concentración de los compuestos extraídos, la fracción líquida colectada fue evaporada hasta 0.5 mL aproximadamente en rota evaporador. El remanente obtenido fue resuspendido en 1 mL de acetona y aforado a 50 mL con agua desionizada. A continuación, la muestra fue tratada como se indica en el apartado de extracción en fase sólida (Apartado 4.8.6.1.1).

4.13.5 Derivatización

El remanente obtenido de la reducción de volumen mediante rota evaporación fue filtrado a través de acrodisco de teflón de 13 mm de diámetro y 0.45 μm de tamaño de poro. El remanente fue llevado a sequedad total mediante exposición a N_2 .

Para la derivatización de los compuestos, a cada vial fueron agregados 50 μL de derivatizante BSTFA+TMCS, seguido de 50 μL de piridina. Para favorecer la eficiencia de derivatización, los viales fueron tapados y llevados a baño de agua a 70 $^{\circ}\text{C}$, durante 60 minutos. Después de que los viales alcanzaron temperatura ambiente, fueron agregados 1500 ng/mL de Chry-D₁₂, contenidos en derivatizante y piridina (1:1)

4.13.6 Determinación de la concentración de CDEs en muestras ambientales de agua y sedimento

La concentración de los fármacos y CDEs en las muestras naturales de agua y sedimento, fue determinada por interpolación en la recta de calibrado a través de la ecuación de regresión lineal ponderada correspondiente a cada compuesto.

La concentración calculada de los compuestos en cada muestra fue corregida mediante la aplicación del porcentaje de recuperación para cada compuesto. Para tal objeto, cada muestra de agua y sedimento fue procesada por triplicado. De estas, 2 muestras fueron enriquecidas con 19.2 µL de la solución estándar de trabajo y la tercera fue procesada sin enriquecimiento.

4.14 Distribución de fármacos y CDEs en el ambiente

La distribución de los fármacos y CDEs entre las matrices de agua y sedimento de cuerpos de agua superficiales, fue calculada como el logaritmo ($\log K_d$) del cociente obtenido entre la concentración determinada en la matriz de sedimento y la matriz de agua correspondiente a cada sitio muestreado, de acuerdo con la ecuación 9.

$$\log K_d = \frac{C_s}{C_w} \text{ ----- Ecuación 9}$$

Donde C_s es la concentración de fármaco o CDE determinada en la matriz de sedimento y C_w es la concentración del fármaco o CDE determinada en la matriz de agua.

4.15 Relación entre las condiciones ambientales y la concentración de fármacos y CDEs contenidos en los cuerpos de agua analizados

Para determinar si existen posibles correlaciones entre las concentraciones ambientales de fármacos y CDEs con los parámetros fisicoquímicos ambientales, fue aplicado el estadístico de correlación de *Spearman*. La correlación entre concentraciones y parámetros fisicoquímicos fue determinada para las concentraciones obtenidas tanto en la matriz de agua, así como en la matriz de sedimento. Este estadístico fue aplicado debido al número de datos obtenido de las repeticiones en los análisis.

4.16 Estrogenicidad en el ambiente acuático del río Apatlaco

La estrogenicidad ($EEQ_{2_{ng/L}}$) en agua fue determinada únicamente para los CDEs 4NP, BPA, E2 y EE2 y expresada para cada sitio muestreado, como la suma de estrogenicidad de los compuestos detectados.

La $EEQ_{2_{ng/L}}$ (ecuación 10) fue determinada mediante el factor de estrogenicidad equivalente a la hormona natural E2 (EEF por sus siglas en inglés) y la concentración de cada CDE determinada en el ambiente (MEC_i por sus siglas en inglés).

$$EEQ_{ng/L} = MEC_i * EEF_i \text{ ----- Ecuación 10}$$

Donde MEC_i es la concentración ambiental determinada para 4NP, BPA, E2 o EE2 y EEF_i es la estrogenicidad equivalente a E2 establecida experimentalmente (López-Roldán et al. 2010).

Debido a que los CDEs no se encuentran aislados dentro del cuerpo de agua, la estrogenicidad en agua fue determinada como el total de estrogenicidad equivalente a E2 aportada por todos los CDEs analizados (ecuación 11).

$$\Sigma EEQ_{ng/L} = EEQ_{ng/L_i} + \dots + EEQ_{ng/L_n} \text{ ----- Ecuación 11}$$

Donde EEQ_{ng/L_i} es la estrogenicidad en agua determinada en el mismo sitio para cada compuesto.

Por otra parte, la estrogenicidad de los CDEs en sedimento ($EEQ_{S_{(ng/L)}}$), se determinó a través de la conversión de la actividad estrogénica de los CDEs en agua en su correspondiente a sedimento mediante la ecuación 12.

$$EEQ_{S_{(ng/L)}} = \frac{1000 * C_{si_{(ng/L)}} * EEF_i}{K_{OC,i(L/Kg)}} * \% COT \text{ ----- Ecuación 12}$$

Donde C_{si} es la concentración en sedimento del CDE, EEF_i es el factor de estrogenicidad equivalente a E2 en agua, $K_{OC,i}$ el coeficiente de partición normalizado para carbono orgánico (Jin et al. 2013a; Tan et al. 2018a; Wang et al. 2011) y % COT es el porcentaje de carbono orgánico total.

Al igual que la estrogenicidad en agua, la estrogenicidad en sedimento fue expresada mediante la estrogenicidad en el mismo sitio aportada por todos los compuestos analizados (ecuación 13).

$$\Sigma EEQ_{S_{ng/L}} = EEQ_{S_{ng/L_i}} + \dots + EEQ_{S_{ng/L_n}} \text{ ----- Ecuación 13}$$

Donde $EEQ_{S\ ng/L_i}$ es la estrogenicidad en sedimento determinada en el mismo sitio para cada compuesto.

4.17 Riesgo ecológico

El riesgo ecológico en los sitios muestreados fue determinado según lo especificado por la USEPA como el cociente de riesgo (RQ; ecuación 14) obtenido entre la concentración del CDE medida en el ambiente (MEC_i) y la concentración que no provoca efectos estrogénicos en organismos acuáticos (PNEC).

$$RQ = \frac{MEC_i}{PNEC_i} \text{ ----- Ecuación 14}$$

Los valores PNEC fueron determinados como la ecuación 15, donde HC5 es la concentración del contaminante a la cual el 95 % de las especies están protegidas de riesgo. Los valores de HC5 fueron 1.43 µg/L, 6.82 ng/L, 4.91 µg/L y 0.1 ng/L para 4NF, BPA, e2 y EE2 respectivamente (EPA 1997). El valor de evaluación (AF) fue 3.

$$PNEC = \frac{HC5}{AF} \text{ ----- Ecuación 15}$$

Debido a que en los sitios muestreados los CDEs con capacidad de provocar riesgo ecológico no se encuentran aislados, el riesgo ecológico para cada sitio fue expresado como el índice de peligro (HI por sus siglas en inglés) para cada sitio (ecuación 16).

$$HI = RQ_i + \dots RQ_n \text{ ----- Ecuación 16}$$

Donde RQ es el valor de riesgo ambiental determinado en el mismo sitio para cada compuesto.

4.18 Determinación de parámetros fisicoquímicos

Durante la toma de muestras de agua y sedimento fueron medidos los parámetros de temperatura, conductividad, pH y oxígeno disuelto del agua, utilizando un equipo portátil multiparámetros HACH HQ40d.

Para las muestras de agua, en el laboratorio fue determinado el contenido de sólidos suspendidos totales (SST), carbono orgánico total (COT), demanda química de oxígeno y demanda bioquímica de oxígeno en 5 días (DBO₅).

El contenido de SST fue determinado en base a la norma oficial mexicana NOM-AA-034-SCFI-2015. Los crisoles de porcelana fueron llevados a peso constante manteniéndolos a 105 °C durante 6 horas. Después de dejar los crisoles enfriar, fueron pesados por triplicado.

Después, 50 mL de muestra de agua fueron transferidos a los crisoles y se mantuvieron en estufa a 105 °C hasta conseguir sequedad total (6 horas) de la muestra. Los crisoles se dejaron enfriar y nuevamente fueron pesados.

Para medir el COT y DQO, las muestras de agua fueron tratadas como se indica en el método propuesto por HACH (adición de kit 9790166 y 2125515 respectivamente, y calentamiento a 120 minutos a 105 ° para COT y 120 minutos a 150 °C para DQO). Posteriormente, las muestras fueron analizadas en un espectrofotómetro HACH DR 3900, utilizando las longitudes de onda 420 y 598 nm para DQO y COT respectivamente.

La DBO₅ de las muestras fue obtenida en un equipo medidor de DBO₅ de la marca HACH BOD Track *IITM* de acuerdo con la metodología establecida en el manual de uso.

Capítulo 5

Resultados y discusión

5.1 Identificación de los compuestos en cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)

Los compuestos fueron identificados como derivados de trimetilsilano (TMS) mediante CG-EM. Para la correcta identificación de cada compuesto en el cromatograma, fueron tomados en cuenta el tiempo de retención y el patrón de fragmentación correspondientes a cada compuesto. Los 7 estándares analizados fueron eluidos en un lapso de 17 minutos.

En la Figura 9 se ilustra el cromatograma de la separación de los compuestos analizados, así como la señal cromatográfica correspondiente a cada compuesto identificado. Tomando en cuenta ambos aspectos del método analítico, es posible inferir que el método es selectivo para todos los compuestos analizados.

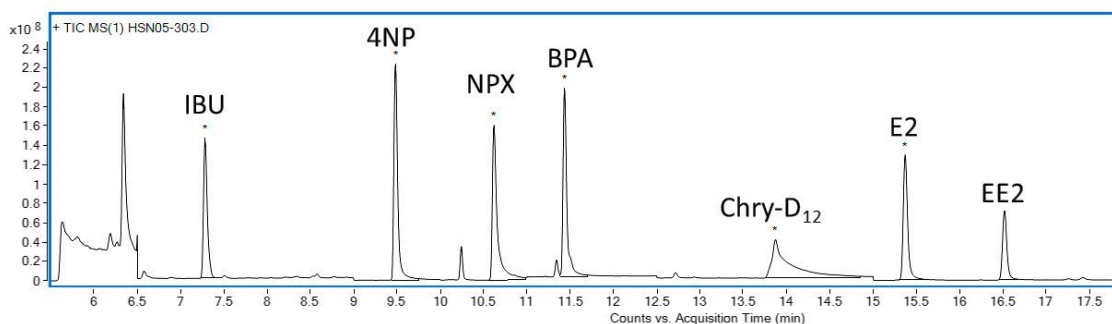


Figura 9 Cromatograma obtenido para la separación de la mezcla de los estándares de interés

5.2 Identificación de los estándares mediante espectrometría de masas

En la Figura 10 se muestra la fragmentación del derivado IBU-TMS, así como el mecanismo de fragmentación propuesto. El ion $m/z = 160$ $[M-118]^+$ (pico base) corresponde al fragmento originado a partir de la escisión del enlace formado entre el átomo de carbono (C8) y el carbono α (C7). El ion $m/z = 263$ $[M-15]^+$ (ion cualificador) corresponde a la pérdida de un grupo metilo en el grupo isopropilo enlazado al anillo aromático, mientras que el ion $m/z = 234$ $[M-44]^+$ (ion cualificador) corresponde al grupo isopropilo, provocando la formación del ion *tropylium* en el anillo aromático. El ion $m/z = 278$ $[M]^+$ (ion cualificador) corresponde al ion molecular.

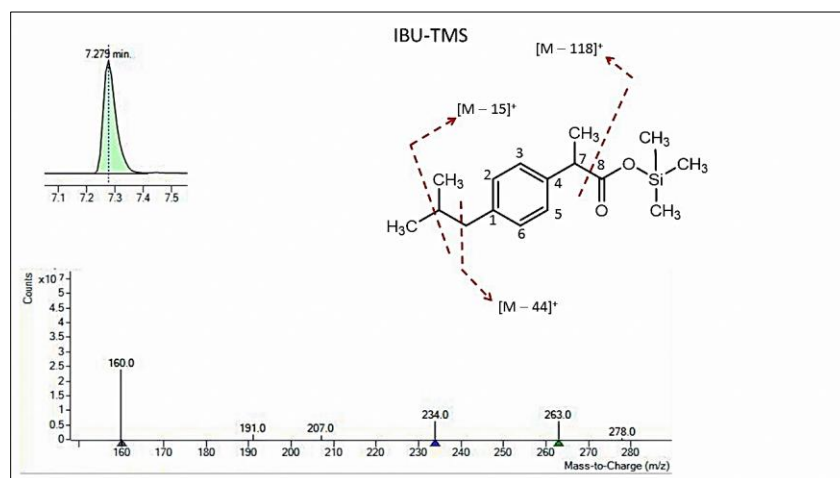


Figura 10 Identificación del derivado IBU-TMS y mecanismo de fragmentación sugerido

Los iones de fragmentación, así como el mecanismo de fragmentación propuesto para el derivado 4NP-TMS se muestran en la Figura 11. El ion $m/z = 179$ $[M-113]^+$ (pico base) corresponde al fragmento generado de la escisión del enlace entre el átomo de carbono bencílico (C7) y el átomo de carbono C8 dando origen a la formación de un ion *tropylium*. El ion $m/z = 277$ $[M-15]^+$ corresponde a la pérdida del grupo metilo, pérdida originada a partir de la escisión C14-C15, mientras que el ion $m/z = 292$ $[M]^+$ corresponde al ion molecular.

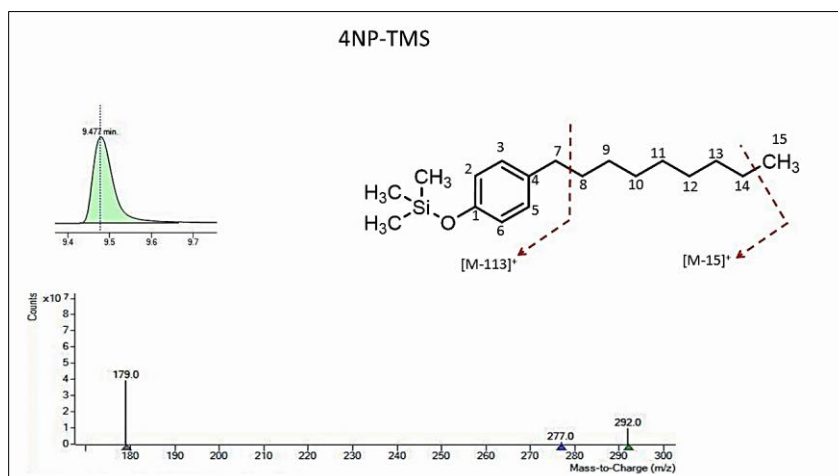


Figura 11 Identificación del derivado 4NP-TMS y mecanismo de fragmentación sugerido

El espectro de masas obtenido para el derivado NPX-TMS, así como el mecanismo de fragmentación sugerido se muestra en la Figura 12. El ion $m/z = 185$ $[M-117]^+$ (pico base) corresponde al fragmento originado a partir de la escisión del enlace al carbono α (posición C9-C10). El ion $m/z = 243$ $[M-59]^+$ (ion de cuantificación) corresponde al fragmento originado por la doble escisión en el anillo aromático A (posiciones C2-C3 y C1-C8). El ion $m/z = 287$ $[M-15]^+$ (ion cualificador) corresponde a la pérdida del grupo metilo enlazado al átomo de oxígeno. El ion $m/z = 302$ $[M]^+$ corresponde al ion molecular del derivado NPX-TMS.

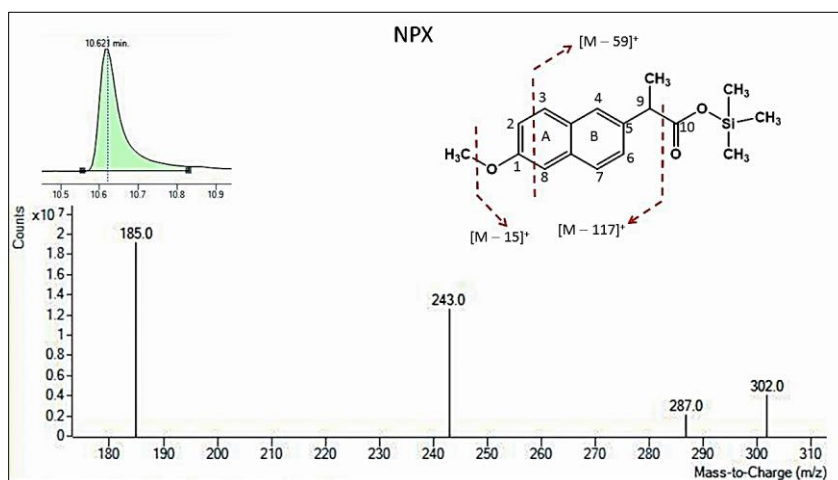


Figura 12 Identificación del derivado NPX-TMS y mecanismo de fragmentación sugerido

Para el derivado de BPA-TMS, el espectro de masas obtenido y el mecanismo de fragmentación propuesto se muestran en la Figura 13. El ion $m/z = 357$ $[M-15]^+$ (pico base) corresponde a la pérdida de uno de los grupos metilo, enlazados al átomo de carbono cuaternario en la posición C7. El ion $m/z = 207$ $[M-165]^+$ (ion cualificador) corresponde al fragmento generado a partir de la

escisión del enlace formado por el carbono cuaternario C7 y el átomo de carbono C4 del anillo aromático. El ion $m/z = 372 [M]^+$ (ion cualificador) corresponde al ion molecular del derivado.

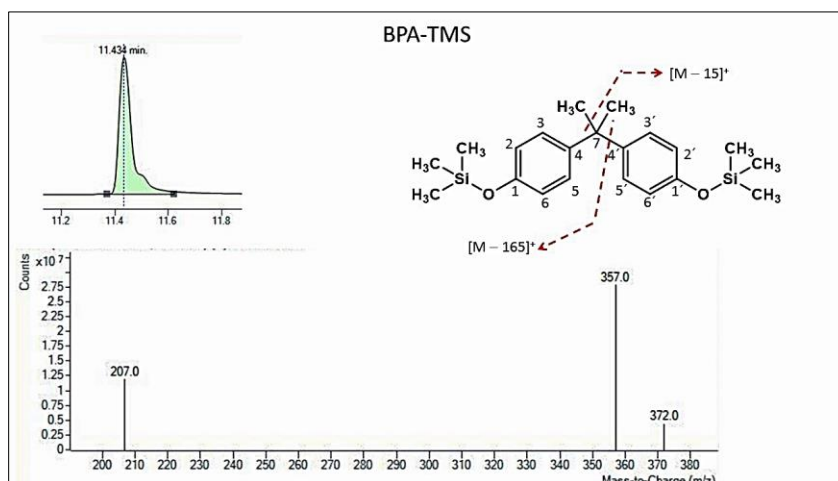


Figura 13 Identificación del derivado BPA-TMS y mecanismo de fragmentación sugerido

La fragmentación, así como el mecanismo de fragmentación sugerido para el derivado E2-TMS se muestra en la Figura 14. El ion $m/z = 285 [M-131]^+$ (pico base) corresponde al fragmento derivado de la escisión simultánea en los enlaces entre las posiciones C13-C15 y C14-C17. El ion $232 [M-184]^+$ corresponde al ion derivado a partir de la doble escisión en la estructura del anillo aromático en los enlaces formados por los átomos de carbono C11-C12 y C8-C14. El ion $m/z = 416$ (ion molecular) es el correspondiente a la molécula de la hormona derivatizada.

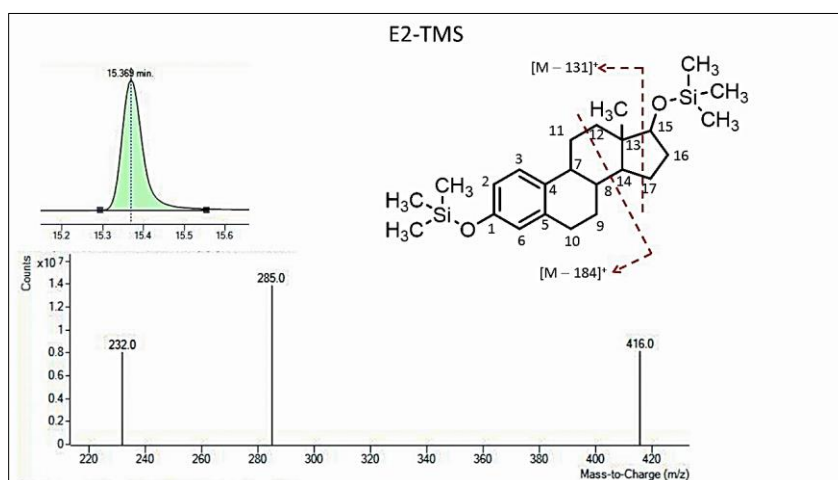


Figura 14 Identificación del derivado E2-TMS y mecanismo de fragmentación sugerido

Para el derivado EE2-TMS, su espectro de masas, así como el mecanismo de fragmentación sugerido se muestran en la Figura 15. El ion $m/z = 232 [M - 208]^+$ (pico base) corresponde al ion formado a

partir de la doble escisión en el ciclohexano B, en los enlaces C11–C12 y C8–C14. El ion $m/z = 425$ $[M - 15]^+$ (pico de cualificación) corresponde a la pérdida de un grupo metilo del grupo TMS, el cual se encuentra enlazado al anillo aromático. El ion $m/z = 196$ $[M - 208]^+$ corresponde al ion formado debido a la doble escisión en el ciclohexano B en los enlaces C12–C13 y C8–C14. El ion $m/z = 440$ corresponde al ion molecular del derivado EE2–TMS.

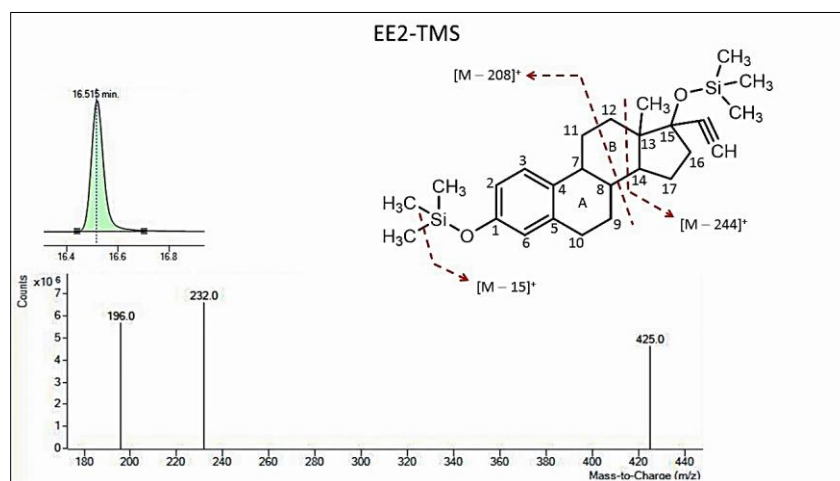


Figura 15 Identificación del derivado EE2–TMS y mecanismo de fragmentación sugerido

5.3 Eficiencia de derivatización y efecto de la respuesta analítica de los derivados disueltos en diferentes disolventes

La sensibilidad en la respuesta para cada compuesto puede verse afectada por diferentes factores que intervienen en la preparación de la muestra, así como las características del equipo de análisis. Por lo tanto, la derivatización es un paso crucial para el análisis mediante CG-EM de analitos de baja volatilidad.

El tipo de derivatización de los compuestos a analizar puede favorecer o disminuir la respuesta de la señal cromatográfica. Adicionalmente, es importante tomar en cuenta diferentes factores a la hora de la derivatización, tales como el tipo de catalizador, tiempo y temperatura de derivatización, así como los volúmenes de derivatizante y catalizador empleado para cada muestra.

En este trabajo, los factores que afectan a la derivatización de compuestos no fueron investigados, debido a que, en la literatura, diversos autores han aportado suficiente evidencia y los efectos en la derivatización son bien conocidos (Gumbi et al. 2017; Kumirska et al. 2013; Shareef et al. 2006; Verenitch et al. 2006; Zhou et al. 2007).

Las condiciones fisicoquímicas utilizadas en la derivatización de los compuestos fueron obtenidas de lo reportado por Ronderos-Lara et al (Ronderos-Lara et al. 2018). La derivatización de los analitos fue realizada con BSTFA + TMCS (99:1). El uso de BSTFA brinda eficiencias de derivatización altas para las moléculas de IBU, NPX, BPA, 4NF y E2. Sin embargo, se ha demostrado que la derivatización de EE2 realizada únicamente con BSTFA es incompleta, debido a que el grupo hidroxilo de la posición 17 no es derivatizado. Este efecto es ocasionado por el impedimento estérico provocado por el grupo etinilo (Shareef et al. 2006). Esta deficiencia es mejorada con el uso de TMCS, combinado en proporciones pequeñas con BSTFA.

Por otro lado, este método emplea como catalizador de la reacción, el uso de piridina en la misma proporción que la mezcla de derivatizantes (50:50). Debido a la capacidad de la molécula de piridina de donar electrones, esta molécula es considerada base de Lewis, lo que favorece la eficiencia de derivatización mediante la activación de los grupos ácidos contenidos en las moléculas a analizar. Adicionalmente, al tener la función de catalizador en la derivatización, al final de la reacción, remueve los productos ácidos obtenidos (Kumirska et al. 2013b). En cambio, de acuerdo con estudios publicados, el uso de metanol como catalizador, produce una derivatización deficiente debido a que el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo, compite con el hidrógeno activo de los analitos (Gumbi et al. 2017; Shareef et al. 2006; Verenitch et al. 2006; Zhou et al. 2007) originando la reacción entre el sitio activo de la molécula y el metanol, lo cual, de llevarse a cabo, evita la reacción sitio activo-derivatizante (Shareef et al. 2006).

Así mismo, el efecto de la temperatura y el tiempo de derivatización empleados en este estudio fueron seleccionados de acuerdo con lo establecido en la literatura. Para los compuestos IBU y NPX con BSTFA + TMCS (99:1) no hay cambio significativo en la eficiencia de derivatización cuando las soluciones son sometidas a baño de agua 70 a 100 °C. Así mismo, no hay cambios significativos en la respuesta analítica para las muestras calentadas entre 10 y 50 minutos (Gumbi et al. 2017)

Entretanto, para los compuestos 4NP, BPA, E2 y EE2 la máxima eficiencia de derivatización fue obtenida, cuando la reacción se llevó a cabo a una temperatura de 65 °C durante 60 minutos (Sghaier et al. 2017). Por lo tanto, en este trabajo, para asegurar la máxima eficiencia de derivatización de los 6 compuestos de interés, la derivatización fue llevada a cabo en baño de agua a 70 °C durante 60 minutos.

5.4 Validación del método instrumental

5.4.1 Linealidad y rango lineal

La linealidad del método fue determinada mediante el valor del coeficiente de correlación (r) obtenido para la regresión lineal correspondiente a cada compuesto analizado. El método instrumental evaluado resultó ser lineal para todos los compuestos. Los coeficientes de correlación obtenidos para cada compuesto fueron 0.9991, 0.9951, 0.9903, 0.9936, 0.9851 y 0.9908, para IBU, 4NP, NPX, BPA, E2 y EE2 respectivamente (Tabla 9).

Para los compuestos IBU y E2 el rango lineal fue desde 0 hasta 240 ng/mL, mientras que para los compuestos 4NP, NPX, BPA y EE2 el rango lineal fue desde 0 hasta 320 ng/mL (Tabla 9).

Posteriormente, mediante la aplicación del estadístico *t-Student* ($p \geq 0.05$) se determinó que los valores de " r " son significativos y, por lo tanto, es posible inferir que el método analítico es lineal para todos los compuestos en los rangos de concentración anteriormente mencionados. Los gráficos correspondientes a las rectas de calibración, así como los resultados obtenidos del estadístico *t-Student* pueden consultarse en el apéndice A.

Tabla 9 Ecuación lineal ponderada, coeficiente de correlación y rango lineal determinados para los compuestos analizados

Parámetro	IBU	4NP	NPX	BPA	E2	EE2
Coeficiente de correlación (r)	0.9991	0.9951	0.9903	0.9936	0.9851	0.9908
Regresión lineal ponderada	$y = 27095X + 170681$	$y = 68437723X - 54677536$	$y = 2916856 - 2163466X$	$y = 31517484X - 8421391$	$y = 13688606X - 4858261$	$y = 7331801X - 1541923$
Rango lineal (ng/mL)	0 – 240	0 – 320	0 – 320	0 – 320	0 – 240	0 – 320

5.4.2 Límite de detección y límite de cuantificación; determinación de la heterocedasticidad en las rectas de calibrado

La variación de la respuesta en los diferentes niveles de concentración que conforman la recta de calibración puede generar errores de las concentraciones determinadas, así como en los LDD y LDC. Esta variación en la respuesta de los diferentes niveles de concentración se conoce como heterocedasticidad (Miller y Miller 2002).

Para determinar si las rectas de calibrado de cada compuesto presentan heterocedasticidad, fue aplicado el estadístico de Fisher (resultados en el apéndice B). Con esto, fue posible inferir que para

cada recta de calibración la variación en los diferentes niveles de concentración es diferente, lo que infiere que hay variaciones en la respuesta obtenida para los diferentes niveles de concentración que conforman cada recta de calibración. Por lo tanto, los datos recopilados son heterocedásticos (Miller y Miller 2002).

Para suavizar las variaciones a lo largo de la recta de calibración, los valores de la pendiente y el intercepto de la ecuación lineal correspondiente a cada compuesto fueron recalculados por el método de regresión lineal pesada, conocido también como regresión lineal ponderada (Tabla 9) de acuerdo con Miller y Miller 2002.

Mediante la aplicación de la regresión lineal ponderada, es posible suavizar la variación en los diferentes niveles de concentración de la recta de calibración, por consiguiente, es posible determinar concentraciones (mediante interpolación) más precisas (Miller y Miller 2002; Ramis-Ramos y Garcia-Álvarez-Coque 2001). Adicionalmente, el cambio en el intercepto de la recta de calibración originado por el cambio en la pendiente brinda una disminución en los límites de detección y de cuantificación.

Por otro lado, para cada compuesto, el LDD fue calculado como la concentración que arroja una señal cromatográfica igual a 3 veces la desviación estándar ponderada ($(S_{y/x})_w$) dividida entre la pendiente de la regresión lineal ponderada, mientras que el LDC fue calculado de la misma manera, pero en relación de 10 veces la desviación estándar.

Los LDD obtenidos para los compuestos oscilaron entre 0.03 ng/mL (E2) y 13.73 ng/mL (IBU), mientras que los LDC estuvieron entre 0.09 ng/mL (E2) y 45.75 ng/mL (IBU) (Tabla 10).

El derivado con mayor LDD obtenido fue IBU-TMS, el cual presenta dos órdenes de magnitud por encima del LDD reportado por Azzouz y un orden de magnitud por encima del reportado por Basaglia-Pietrogrande (Azzouz 2010; Basaglia y Pietrogrande 2012). Mientras que el segundo mayor LDD fue el obtenido para NPX (3.41 ng/mL). Es evidente que el LDD es mayor para los compuestos IBU y NPX, lo cual puede ser atribuido a su baja volatilidad relativa al resto de los compuestos con menor LDD (Basaglia y Pietrogrande 2012).

Por otro lado, los derivados 4-NF y BPA presentaron LDD de hasta dos órdenes de magnitud por debajo a lo reportado por Samaras y Basaglia (Basaglia y Pietrogrande 2012; Samaras et al. 2011). Por su parte, las hormonas E2 y EE2 presentaron límites de detección de hasta 3 órdenes de magnitud a lo reportado por Azzouz y Basaglia (Azzouz 2010; Basaglia y Pietrogrande 2012).

Tabla 10 Límite de detección (ng/mL) y cuantificación (ng/mL) obtenido para cada compuesto y comparación con otros estudios (Obtenidos mediante CG-EM)

Compuesto	México ¹		España ²		Italia ³		Grecia ⁴	
	LDD	LDC	LDD	LDC	LDD	LDC	LDD	LDC
IBU	13.73	45.75	0.01	NR	NR	NR	7.1	29.3
4NP	0.26	0.87	NR	NR	3.8	12	NR	NR
NPX	1.02	3.41	0.02	NR	3.2	9.6	3.1	27.7
BPA	0.41	1.35	NR	NR	14	48	3.9	20.5
E2	0.03	0.09	0.05	NR	NR	NR	NR	NR
EE2	0.12	0.42	0.06	NR	NR	NR	4.1	19.5

LDD (ng/mL); LDC (ng/mL); NR = No reportado.
 1. Este trabajo; 2. Azzouz et al., 2010; 3. Samaras et al., 2011; 4. Basaglia y Pietrogrande 2012.

La diferencia en los valores de los LDD obtenidos en este trabajo y los reportado por otros autores (Tabla 10) puede deberse a diferentes circunstancias, tales como cuidados del equipo cromatográfico, materiales utilizados para la preparación de estándares, entre otras. Así mismo, el análisis estadístico ejecutado (regresión lineal simple y regresión ponderada) puede marcar la diferencia en los valores de la ecuación lineal obtenida y por consiguiente afectar los LDD obtenidos (Sanchez 2018).

Considerando que la concentración máxima permitida en muestras ambientales sugeridas por la Agencia de protección ambiental de los Estados Unidos (USEPA), así como por la Unión Europea (UE), se puede inferir que el método analítico desarrollado en el presente estudio es adecuado para el análisis de muestras ambientales, ya que los LDD aquí determinados son inferiores a las concentraciones máximas sugeridas por la USEPA y UE (excepto para EE2; Tabla 11).

Tabla 11 Comparación de los límites de detección instrumentales obtenidos en este trabajo y las concentraciones máximas permisibles (CMP) en el ambiente

Compuesto	LDD (ng/L) obtenido	CMS en agua superficial	Referencia
IBU	13.75	---	CMP en ambiente no establecida
4NP	0.26	6.6 µg/L	EPA, 2005
NPX	1.02	---	CMP en ambiente no establecida
BPA	0.41	1.78 µg/L	EPA, 2011
E2	0.03	0.4 ng/L	SCHER 2011a
EE2	0.12	0.035 ng/L	SCHER 2011b

Por otro lado, es importante considerar que las muestras con concentraciones superiores al rango lineal establecido para cada compuesto deben ser diluidas y analizadas nuevamente, o en su caso procesar menor cantidad de muestra para evitar que la concentración sea estimada dentro del rango de trabajo establecido para cada compuesto mediante la calibración del equipo.

5.5 Optimización de los métodos de extracción

5.5.1 Extracción en fase sólida para muestras de agua natural

5.5.1.1 Efecto de diferentes disolventes en el acondicionamiento de la fase estacionaria y elución de los compuestos retenidos

El acondicionamiento de la fase estacionaria es quizás el paso más importante en la extracción en fase sólida, ya que, la eficiencia de extracción depende de la capacidad de adsorción de las moléculas solvatadas de la fase estacionaria. Por lo tanto, se estudió la eficiencia de extracción obtenida para los fármacos y CDEs de interés cuando la fase estacionaria es acondicionada con diferentes volúmenes de metanol y acetona.

En la Figura 16 se muestra la eficiencia de recuperación obtenida con los diferentes sistemas de metanol y acetona, utilizados para el acondicionamiento de la fase estacionaria. La mayor eficiencia de recuperación para todos los estándares extraídos fue obtenida con la proporción de disolventes acetona – metanol 3:2. Con esta proporción de disolventes el rango de la eficiencia de recuperación osciló de 54.24 % a 89.77 % (4NP y EE2, respectivamente), con %DER entre 1.12 % (4NP) a 7.34 % (E2), mientras que la menor eficiencia de extracción fue obtenida utilizando únicamente acetona, durante el acondicionamiento de la fase estacionaria y elución de los compuestos. La eficiencia de extracción obtenida con este disolvente osciló entre 0.41 % (IBU) y 46.21% (NPX).

Debido a que con el sistema de disolventes acetona – metanol 3:2, se obtuvo la mayor eficiencia en la recuperación para todos los compuestos, este sistema de disolventes fue seleccionado para realizar el acondicionamiento de la fase estacionaria y la elución de los CDEs retenidos en la misma, después de la extracción.

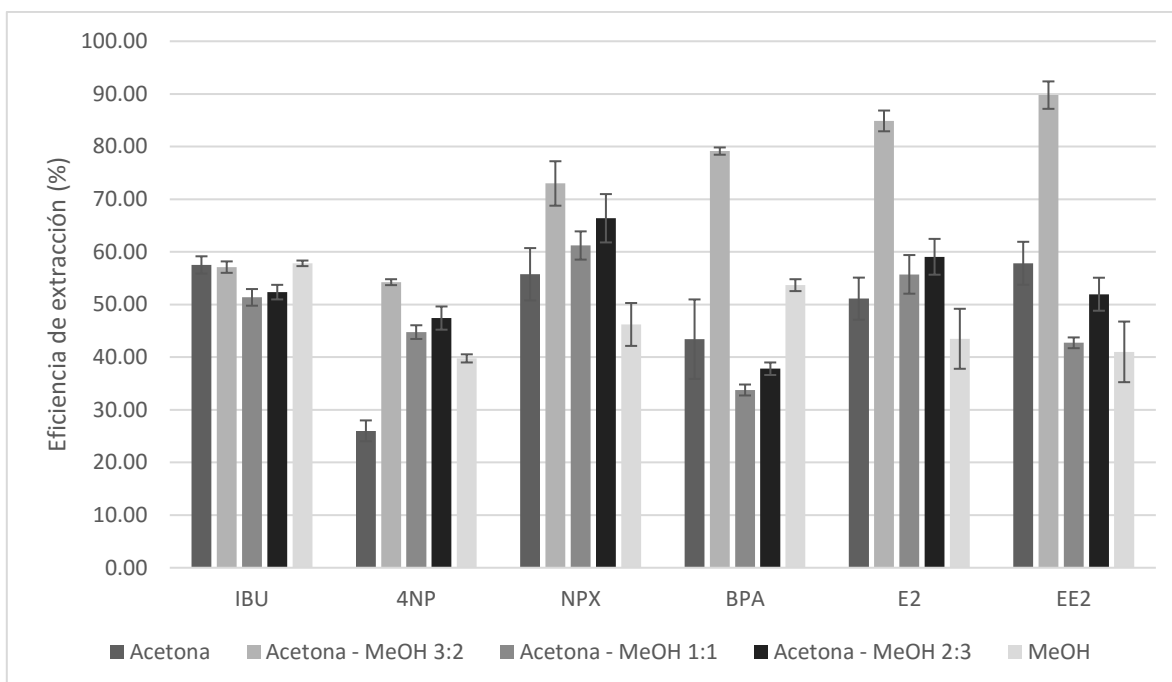


Figura 16 Eficiencia de extracción obtenida (promedio) y %DER (barras de error) con las diferentes proporciones de metanol y acetona (n=3).

Para tratar de explicar las diferencias obtenidas en la eficiencia de extracción con las diferentes proporciones de acetona y MeOH, con la ecuación 17 fue calculado el nivel de polaridad de cada sistema de disolventes, el cual está reflejado en la Tabla 12. En este contexto, aparentemente la mayor eficiencia de extracción se obtiene cuando la polaridad del sistema de disolventes se encuentra en el rango 5.8 – 6.1, ya que el uso individual de metanol y acetona (polaridad 5.4 y 6.6 respectivamente) dieron los menores porcentajes de recuperación para la mayoría de los compuestos.

$$Polaridad\ del\ sistema = \rho_a \phi_a + \rho_b \phi_b \text{ ----- Ecuación 17}$$

Donde: ρ representa la polaridad del disolvente y ϕ representa la fracción del disolvente en la mezcla.

Por el contrario, el uso de sistemas de disolventes de acetona y metanol en diferentes proporciones dieron los mayores porcentajes de recuperación, lo que evidencia la importancia de modificar la polaridad del sistema de disolventes para el acondicionamiento de la fase estacionaria y la elución de los compuestos retenidos.

Tabla 12 índice de polaridad de los sistemas de disolventes utilizados

Sistema de disolventes	Índice de polaridad
Metanol	6.6
Acetona-metanol 2:3	6.12
Acetona-metanol 3:2	5.88
Acetona-metanol 1:1	6
Acetona	5.4

5.5.1.2 Influencia del pH de la muestra de agua para en la eficiencia de recuperación

Debido a las diferencias de pKa entre los 6 compuestos analizados, fue estudiada la influencia del pH de las muestras en el porcentaje de recuperación. La mayor eficiencia de extracción para los estándares fue obtenida cuando la muestra se encuentra a $\text{pH} \approx 7$ (54 – 98 % para 4NP y EE2, respectivamente), mientras que el %DER obtenido para todos los compuestos fue menor a 8.4 %. De acuerdo con el pKa de los compuestos 4NP, BPA, E2 y EE2 (Tabla 13) este nivel de pH, permite que los analitos se encuentren en su forma neutra, lo que aumenta su hidrofobicidad y, por lo tanto, su retención en la fase estacionaria durante la extracción (Azzouz 2010). En la Figura 17 es presentada la eficiencia de extracción obtenida para los 3 niveles de pH de extracción ($\text{pH} \approx 2, 7$ y 9).

Tabla 13 pKa de los compuestos de interés

Compuesto	pKa
4-Nonilfenol (4NP)	10.3
Bisfenol A (BPA)	9.7
Estradiol (E2)	10.27
Etinilestradiol (EE2)	10.24
Naproxeno (NPX)	4.2
Ibuprofeno (IBU)	4.9

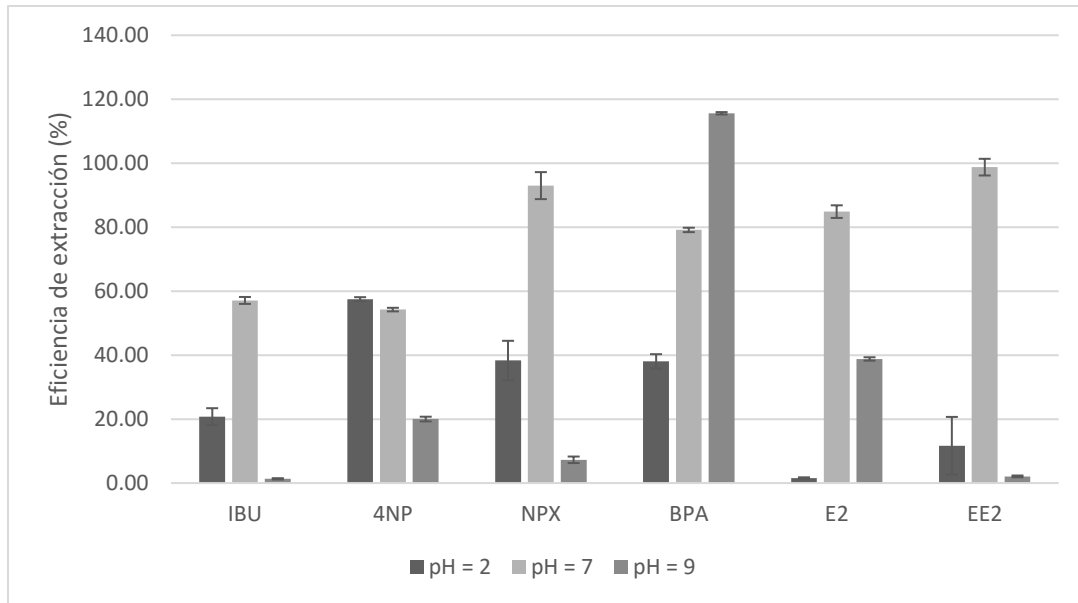


Figura 17 Eficiencia de extracción (promedio) y %DER (barras de error) obtenida con diferentes niveles de pH ($n = 2$)

Por otro lado, la menor eficiencia de extracción fue conseguida con la muestra a $\text{pH} \approx 9$. En la cual fueron obtenidas eficiencias de extracción entre 1 y 115 %. (IBU y BPA respectivamente).

En el caso de la extracción a $\text{pH} \approx 2$, el recobro obtenido estuvo entre 1 % y 57 % (E2 y 4NP, respectivamente). Por lo que se decidió que la extracción de muestras ambientales de agua debe ser realizada a pH neutro.

En las extracciones a pH 2 fueron obtenidos %DER (barras de error en la Figura 17) menores a 18.04 % (EE2), mientras que para la extracción a pH 9, el %DER fue menor a 2.03 % (NPX) para todos los compuestos, lo que sugiere que la baja eficiencia de recuperación probablemente es debida a que la fase estacionaria no es apta para trabajar en estos niveles de pH. Adicionalmente, con estos valores de %DER obtenidos, es posible justificar que el método de extracción es repetible para para ambos niveles de pH, por lo que pueden ser descartados errores en el enriquecimiento.

Así mismo, el %DER obtenido para Chry-D₁₂ fue menor a 3.72 % en todos los análisis cromatográficos efectuados. Esto demuestra que la disminución de las áreas bajo la curva correspondientes a las señales analíticas no se debe a alguna inestabilidad del equipo cromatográfico durante el análisis de las muestras.

5.5.2 Extracción asistida por ultrasonido para muestras de sedimento

5.5.2.1 Selección del disolvente de extracción

La eficiencia de extracción asistida por ultrasonido fue estudiada únicamente en términos de la eficiencia de extracción obtenida con diferentes tipos de disolventes. Para esto, fueron realizadas extracciones de sedimentos naturales enriquecidos y no enriquecidos, utilizando diferentes sistemas de disolventes, para comparar con cuál de los sistemas se obtiene mayor recuperación de los estándares. En la Figura 18 se muestra gráficamente la eficiencia de extracción obtenida con los 3 diferentes sistemas de disolventes.

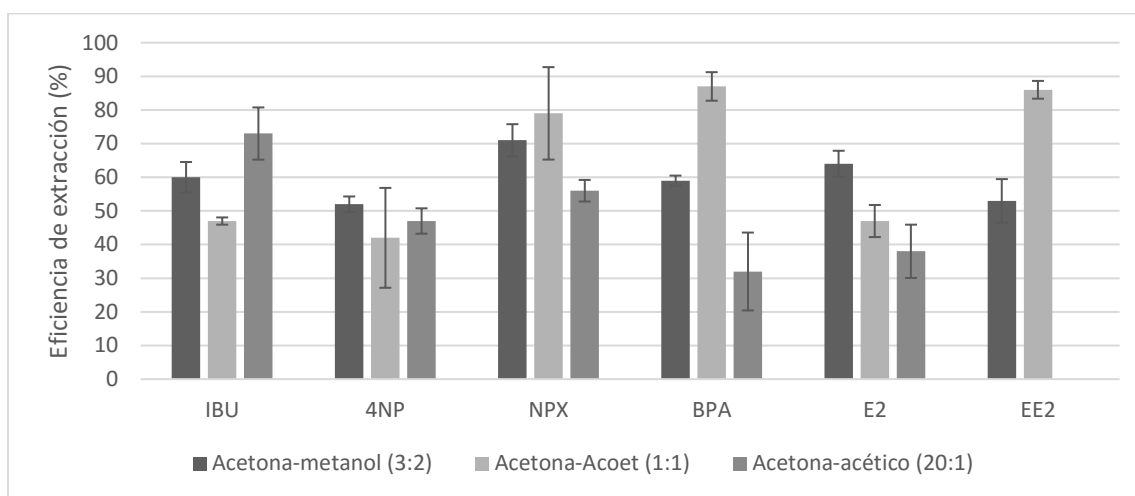


Figura 18 Eficiencia de la extracción (promedio) y %DER (barras de error) obtenidas por ultrasonido obtenida con diferentes disolventes (n=3)

En la extracción con acetona – acetato de etilo fueron mayormente recuperados los estándares NPX, BPA y EE2 (79, 87 y 86 % respectivamente). En la extracción con acetona -metanol (3:2) fueron mayormente recuperados los estándares 4 NP y E2 (52 y 64 % respectivamente). Mientras que en la extracción con acetona – acético (20:1) fue mayormente recuperados el estándar de IBU (73 %). En este último sistema de disolventes, el porcentaje de recuperación de la hormona sintética EE2 fue superior a 300 % (no mostrado en la Figura 18 para evitar la supresión de las otras barras). El cual, puede ser debido a interferencias provenientes de compuestos contenidos en el sedimento natural. Adicionalmente, con este sistema de disolventes, los porcentajes de recuperación para los estándares BPA y EE2 fue 32 % y 38 % respectivamente. Siendo ambos los menores porcentajes de recuperación obtenidos en esta prueba

El orden de la eficiencia de extracción obtenida con los diferentes sistemas de disolventes fue acetona – acetato de etilo > acetona – MeOH (3:2) > acetona – acético (20:1). Sin embargo, se decidió seleccionar el sistema de disolventes acetona – MeOH (3:2) para realizar las extracciones de sedimentos.

Esta decisión se justifica con base en lo siguiente: en la extracción con el sistema de disolventes acetona – acetato de etilo, para los estándares 4NP y NPX fueron obtenidos %DER (barras de error en la Figura 18) iguales a 29.69 % y 27.48 % respectivamente, mientras que en la extracción con acetona – metanol (3:2) el %DER para todos los compuestos osciló entre 2.99 % (BPA) a 12.91 % (EE2), con lo que queda demostrado que la variación en la extracción es menor cuando las muestras son extraídas con el sistema acetona – metanol (3:2).

Adicionalmente, es importante tomar en cuenta que la optimización de este método de extracción fue realizada con sedimentos extraídos de un manantial ubicado dentro de una reserva natural, por lo cual, se puede considerar que, en comparación con sedimentos extraídos de barrancas, el sedimento natural utilizado en esta optimización ha sufrido menor impacto antrópico. Con esto, es de suponerse, que, en el análisis de muestras ambientales de sedimentos mayormente impactados por diferentes fuentes de emisión de contaminantes, la variación en la medición de los contaminantes de interés podría ser mayor, debido a la cantidad de contaminantes presentes en los sedimentos.

Otro aspecto que tener en cuenta para justificar la decisión de llevar a cabo las extracciones con acetona – metanol (3:2) y no con acetona – acetato de etilo, es que, después de la extracción asistida por ultrasonido, al reaforar con agua para continuar con la EFS, si el acetato de etilo no es eliminado completamente del remanente, los estándares contenidos en el acetato de etilo no podrán ser resuspendidos en su totalidad en el agua, debido a la insolubilidad entre el agua y el acetato de etilo. Lo cual, puede conllevar a ocasionar mayores porcentajes la variación en la extracción. De cumplirse esto, la variación en los porcentajes de recobro obtenidos podría superar el 30 % de variación aceptable para muestras ambientales (Thompson et al. 2002).

5.6 Validación de los métodos de extracción: robustez, repetibilidad y reproducibilidad de los métodos de extracción en muestras naturales.

Debido a las diferencias en la composición de las muestras reales de agua y sedimento fue necesario determinar la robustez de los métodos de extracción previamente validados. En este caso, debido a la naturaleza de los puntos seleccionados de muestreo, la robustez de los métodos de extracción fue determinada en tres tipos de agua y sedimentos, provenientes de manantial y de cuerpos de agua superficial impactados por descargas de drenajes domésticos y por descargas de plantas de tratamiento de agua.

Adicionalmente, los métodos de extracción optimizados fueron validados en términos de porcentaje de recuperación, repetibilidad y reproducibilidad. Esta validación fue realizada con la intención de observar el desempeño de los métodos de extracción aplicados a muestras ambientales de

diferentes composiciones, y así decidir si estos son adecuados para determinar la concentración de los compuestos de interés en muestras reales y evitar sub o sobreestimaciones en las concentraciones de los compuestos de interés.

La Tabla 14 presenta la eficiencia de extracción (%) obtenida para cada CDE y fármacos en los tres tipos de agua y sedimento analizados (las muestras de agua fueron extraídas sin previa filtración).

En las muestras de agua, los porcentajes de recuperación obtenidos se encuentran en los intervalos 70 (IBU) – 83 (4NP) % para las muestras de manantial, 67 (BPA) – 88 (4NP) % para las muestras de drenaje doméstico y 64 (4NP) – 97 (EE2) % para las muestras de agua tratada.

Por otra parte, en las muestras de sedimentos los porcentajes de recuperación obtenidos estuvieron en los intervalos 61 (4NP) – 86 (EE2) % para las muestras de manantial, 49 (4NP) – 112 (NPX) % para las muestras de drenaje doméstico y 48 – 112 % (BPA y E2) para los sedimentos impactados por agua tratada.

La repetibilidad obtenida en las muestras de agua fue menor a 5.83 (EE2) %, 3.44 (EE2) % y 8.10 (EE2) % para las muestras de manantial y las impactadas principalmente por drenaje doméstico y por descargas planta de tratamiento de aguas respectivamente. Mientras que la reproducibilidad obtenida para estas muestras fue menor a 6.02 (EE2) %, 3.68 (EE2) % y 11.13 (EE2) %, respectivamente.

La repetibilidad obtenida en las muestras de sedimento de manantial y las impactadas por drenajes domésticos y planta de tratamiento de aguas fue menor a 8.32 (E2) %, 6.64 (E2) % y 17.21 (BPA) %, respectivamente. Mientras que la reproducibilidad obtenida fue menor a 12.95 (E2) %, 12.56 (E2) % y 17.84 (BPA) %, respectivamente.

De acuerdo con los valores de la eficiencia de recuperación, repetibilidad y reproducibilidad obtenidos para las muestras de agua y sedimento, se puede concluir que los métodos de extracción utilizados para procesar cada tipo de matriz son robustos, repetibles y reproducibles. Por lo tanto, estos métodos son confiables para ser aplicados en muestras naturales de agua y sedimentos impactadas por diferentes fuentes. Ya que el coeficiente de variación permitido en muestras ambientales es de hasta 30 % (Thompson et al. 2002). Esta amplitud en el porcentaje de variación es permitida debido a la extensa cantidad de compuestos que conforman este tipo de matrices y que pueden provocar variaciones en la cuantificación.

Tabla 14 Porcentaje de recuperación, repetibilidad y reproducibilidad obtenidos en la validación de los métodos de extracción en agua y sedimentos

Origen de la muestra	Compuesto	Agua			Sedimento		
		% recuperación \pm DE (n=2)	Repetibilidad (%DER, n=2)	Reproducibilidad (n=3)	% recuperación \pm DE (n=2)	Repetibilidad (%DER, n=2)	Reproducibilidad (n=3)
Manantial	IBU	70.35 \pm 1.8	2.55	2.75	72.65 \pm 1.4	1.92	7.02
	4NP	83.94 \pm 0.1	0.12	1.96	61.01 \pm 1.1	1.80	7.68
	NPX	79.17 \pm 0.3	0.40	3.68	70.78 \pm 2.5	3.53	4.63
	BPA	76.75 \pm 1.4	1.82	2.30	73.86 \pm 3.8	5.14	8.64
	E2	80.03 \pm 1.8	2.25	2.48	68.48 \pm 5.7	8.32	12.95
	EE2	75.39 \pm 4.4	5.83	6.02	86.57 \pm 6.3	7.27	9.63
Drenajes domésticos	IBU	77.73 \pm 0.1	0.13	0.70	65.23 \pm 2.8	4.30	6.73
	4NP	88.18 \pm 0.5	0.60	1.12	49.02 \pm 2.7	5.51	7.64
	NPX	70.63 \pm 0.3	0.42	0.58	112.55 \pm 4.3	3.82	4.19
	BPA	67.65 \pm 1.2	1.80	1.95	58.58 \pm 1.7	2.90	3.09
	E2	77.70 \pm 2.6	3.35	3.52	96.40 \pm 6.4	6.64	12.56
	EE2	72.55 \pm 2.5	3.44	3.68	83.34 \pm 4.4	5.30	6.80
Agua tratada	IBU	88.84 \pm 0.2	0.22	1.33	51.15 \pm 1.1	2.15	7.21
	4NP	68.93 \pm 1.2	1.74	1.91	54.65 \pm 1.8	3.30	4.61
	NPX	90.21 \pm 0.7	0.80	1.38	74.86 \pm 0.9	1.20	3.86
	BPA	66.25 \pm 0.6	0.90	1.75	48.81 \pm 8.4	17.21	17.84
	E2	64.59 \pm 3.3	5.12	7.42	111.58 \pm 5.7	5.11	15.12
	EE2	97.68 \pm 7.9	8.10	11.13	89.34 \pm 2.3	2.60	7.92

Los porcentajes de recuperación obtenidos en este trabajo son similares a los reportados por otros grupos de investigación que han utilizado la extracción en fase sólida y extracción asistida por ultrasonido para el análisis de muestras ambientales de agua y sedimento (Tabla 15).

En la extracción de muestras de agua superficial, Azzouz y Samaras reportaron porcentajes de recuperación superiores a los aquí obtenidos para IBU (97 %) y NPX (93 %) respectivamente. Por otro lado, para el plastificante BPA, Samaras reportó una eficiencia de recuperación de 18 % en extracciones realizadas en fase estacionaria C₁₈ y de 26 % en extracciones realizadas con HLB en muestras de agua a pH \approx 7, argumentando que la baja eficiencia de recobro es debida a la baja acidez de la molécula de BPA (pKa = 10.3). Sin embargo, en nuestro estudio, hemos demostrado que en las extracciones a pH neutro (pH \approx 7) y básico (pH \approx 9) los porcentajes de recuperación fueron mayores a 80 % (con fase estacionaria de sílica modificada con C₁₈). Adicionalmente, teniendo en cuenta el pKa de la molécula de BPA (pKa = 10.3) y el nivel de acidificación ajustado (al menos 2 unidades por debajo del pKa) de las muestras de agua, la molécula de BPA se encuentra en estado protonado, lo cual favorece su adsorción en la fase estacionaria.

Tabla 15 Comparación de la eficiencia de extracción (%) mediante extracción en fase sólida (agua) y extracción asistida por ultrasonido (sedimento).

Matriz	IBU	4NP	NPX	BPA	E2	EE2	Bibliografía
Agua	70	83	79	76	80	75	Este estudio
	97 ^{a)}	92 ^{b)}	85 ^{a)}	84 ^{b)}	83 ^{a)}	80 ^{a)}	a) (Azzouz 2010); b) (A Azzouz y Ballesteros 2014)
	79 ^{c)}	--	--	87 ^{d)}	96 ^{e)}	72 ^{e)}	c) (Maldaner y Jardim 2012); d) (Melo y Brito 2014) e) (Naldi et al. 2016)
	72 ^{f)}	91 ^{f)}	93 ^{f)}	18 ^{g)}	91 ^{g)}	69 ^{g)}	f) (Samaras et al. 2011); g) (Huang et al. 2011)
Sedimentos	73	61	71	64	69	87	Este estudio
	91 ^{h)}	--	67 ^{h)}	84 ^{h)}	--	--	h) (Díaz y Peña-Alvarez 2017)
	107 ⁱ⁾	93 ^{j)}	87 ⁱ⁾	87 ^{j)}	102 ⁱ⁾	103 ⁱ⁾	i) (Kumirska et al. 2019); j) (Azzouz y Ballesteros 2016)
	88 ^{k)}	--	86 ^{k)}	--	75 ^{l)}	--	k) (Biel-maeso et al. 2017); l) (Hernández-Quiroz et al. 2019)

En el caso de la extracción asistida por ultrasonido de muestras de sedimento, los porcentajes de recobro para todos los compuestos, aquí estudiados fueron menores a los obtenidos por diversos autores. Esta diferencia de recobros puede ser explicada mediante la variación de diferentes factores, tales como cantidad de sedimento extraído, nivel de enriquecimiento con estándares, composición de la muestra de sedimento, así como también la fase estacionaria empleada para la retención de los compuestos. Sin embargo, basados en la repetibilidad y reproducibilidad, así como en los porcentajes de recobro obtenidos en diferentes tipos de muestras, el método de extracción optimizado, es apropiado para el análisis de muestras ambientales, ya que este método es robusto, repetible y reproducible (Thompson et al. 2002).

5.7 Control de calidad

En las inyecciones de blancos de disolventes y estándares de referencia en la cuantificación durante el análisis cromatográfico, no se encontraron señales adicionales en el cromatograma, que pudieran provenir de inyecciones anteriores. Así mismo, tampoco fueron detectadas supresiones o aumento de la señal correspondiente a los compuestos de interés, establecida con la solución de referencia.

En las muestras de agua, en las inyecciones del estándar de disolventes de referencia, no fueron detectadas variaciones significativas (%DER < 3 %), que indiquen aumento de señal de los compuestos debido a material orgánico que pudiera quedar retenido en la columna durante la inyección de muestras provenientes de diferentes sitios.

En la medición de la estabilidad del equipo (expresada como % de variación correspondiente a la señal de Chry-D₁₂) no fueron detectadas alteraciones en la señal correspondiente Chry-D₁₂, y en todos los casos, la variación del área bajo la curva de la señal de Chry-D₁₂ fue menor a 2 %.

Con esta información fue posible determinar que el funcionamiento del equipo es estable y, además, no se observaron interferencias o incremento del área bajo la curva (correspondiente a cada compuesto) ocasionado por remanentes que pudieran no ser eluidos por completo de la columna entre inyecciones de diferentes muestras.

5.8 Aplicación de los métodos validados a muestras ambientales

Los métodos de extracción validados fueron aplicados a muestras de agua y sedimento superficial colectadas durante el mes de noviembre del año 2019, en la ciudad de Cuernavaca Morelos, México. Los cuerpos de agua muestreados están impactados principalmente por el vertimiento de aguas a través de drenajes domésticos. Los sitios muestreados forman parte del río Apatlaco, el cual es el cuerpo de agua más grande e importante del estado de Morelos.

Durante su trayecto, el río Apatlaco cruza por 10 municipios, entre los que destacan Cuernavaca, Jiutepec y Temixco. Lo que revela que este cuerpo de agua es impactado por diferentes fuentes, principalmente por centros urbanos del Estado (CONAGUA 2014).

A lo largo de la microcuenca del río Apatlaco, pueden apreciarse diferentes campos de cultivo de flores de ornato (rosas, gladiolas, girasoles, entre otras) así como cultivos de productos comestibles (maíz, arroz, mango, entre otros). Estos campos son regados con agua del río Apatlaco. Otra actividad importante es la recarga y transporte de agua mediante pipas para realizar actividades urbanas, tales como el riego de plantas que adornan las ciudades y pueblos del Estado (Moeller-Chávez et al. 2004). Además, según fuentes oficiales del gobierno, esta cuenca es importante para el desarrollo del ecosistema del Estado, ya que, en este río, habitan diferentes especies de peces y aves que dependen de este cuerpo de agua.

Las concentraciones de fármacos y CDEs detectados en los sitios muestreados se observan en la Tabla 16. En el sitio JTPC (Jiutepec) fueron detectados todos los compuestos analizados en las muestras de agua, además en este punto los compuestos fueron detectados con la mayor concentración, lo que puede ser debido a que este es impactado principalmente por agua proveniente de dos plantas de tratamiento, así como de agua que proviene de la vasta red hídrica municipal de drenajes de los asentamientos poblacionales.

Entretanto, en las muestras de agua, el punto que presentó menor cantidad de contaminantes fue CPTC (Chapultepec). Donde los compuestos 4NP, BPA y E2 fueron detectados en concentraciones menores al LDD (LDD = 0.26, 0.41 y 0.03 ng/mL respectivamente). Este sitio cumple con la función de parque ecológico que alberga actividades de aprendizaje para la población infantil principalmente, así como un pequeño zoológico, lo cual explica la baja concentración de los compuestos detectados y la ausencia de los fármacos IBU y NPX, así como de la hormona sintética EE2 en ambas matrices.

Tabla 16 Concentraciones determinadas en las muestras de agua (ng/L) y sedimento (ng/g)

Sitio	Agua (ng/L)						Promedio	DE
	IBU	4-NP	NPX	BPA	E2	EE2		
CPTC	ND	< LDD	ND	< LDD	< LDD	ND	0.34	0.39
TTL	< LDD	8.45 ± 0.02	81.65 ± 0.12	19.75 ± 0.04	4.03 ± 0.04	< LDD	22.79	31.26
TMC1	31.87 ± 0.07	9.19 ± 0.01	84.13 ± 0.11	19.81 ± 0.05	2.55 ± 0.03	< LDD	23.14	31.45
TMC2	< LDD	< LDD	2.33 ± 0.01	10.37 ± 0.02	1.87 ± 0.01	< LDD	3.07	3.76
JTPC	51.93 ± 0.07	11.08 ± 0.04	86.40 ± 0.03	65.21 ± 0.14	5.37 ± 0.03	16.06 ± 0.04	36.82	33.28
Promedio	17.74	5.94	50.90	23.22	2.86	3.24		
DE	23.19	5.07	45.44	24.74	1.89	7.17		

Sitio	Sedimento (ng/g)						Promedio	DE
	IBU	4-NP	NPX	BPA	E2	EE2		
CPTC	ND	< LDD	ND	< LDD	0.01 ± 0.00	ND	0.00	0.00
TTL	0.55 ± 0	0.07 ± 0.01	0.66 ± 0.01	0.1 ± 0.03	0.85 ± 0.01	< LDD	0.37	0.36
TMC1	0.62 ± 0	0.33 ± 0.06	0.85 ± 0.01	0.26 ± 0.03	0.16 ± 0.03	< LDD	0.37	0.31
TMC2	0.37 ± 0.04	0.02 ± 0.01	0.04 ± 0	0.87 ± 0.01	0.8 ± 0.03	< LDD	0.35	0.40
JTPC	0.72 ± 0.01	0.70 ± 0.02	ND	3.97 ± 0.05	0.16 ± 0.05	0.46 ± 0.02	1.00	1.48
Promedio	0.45	0.22	0.31	1.04	0.40	0.09		
DE	0.28	0.30	0.41	1.67	0.40	0.21		

CPTC = Chapultepec; TTL = Tetela; TMC1 = Temixco 1; TMC2 = Temixco 2; JTPC = Jiutepec; DE = Desviación estándar

En las muestras de sedimento, en el sitio JTPC, con excepción del fármaco NPX, fueron detectados todos los compuestos analizados. En el sitio TTL, todos los compuestos de interés fueron identificados, tanto en las muestras de agua como en las de sedimento. En ambas matrices, la hormona sintética EE2 fue detectada en concentraciones menores al LDD (LDD = 0.12 ng/mL). En este sitio, los compuestos detectados en mayor concentración fueron NPX (81.65 ± 0.12 ng/L) en agua y E2 en sedimentos (0.85 ± 0.01 ng/g). Este sitio es afectado principalmente por actividad animal, así como por drenajes domésticos.

En el sitio TMC1, tanto en agua como en sedimentos fueron detectados todos los compuestos, aunque en ambas matrices la hormona sintética EE2 fue detectada en concentraciones menores al LDD (LDD = 0.12 ng/mL). En este sitio, tanto en agua como en sedimento, el fármaco NPX fue el

compuesto detectado en mayor concentración (84.13 ± 0.11 ng/L y 0.85 ± 0.01 ng/g respectivamente). Este sitio es impactado principalmente por drenajes domésticos.

Así mismo, en las muestras de agua correspondiente al sitio TMC2, los compuestos IBU, 4NP y EE2 fueron detectados en concentraciones menores al LDD (LDD = 13.75, 0.26 y 0.12 ng/mL respectivamente). En este sitio, el fármaco BPA fue el compuesto detectado en mayor concentración (10.37 ± 0.02 ng/L). Mientras tanto, en el sedimento fueron detectados todos los compuestos buscados. En esta matriz, la hormona sintética EE2 fue detectada en concentraciones menores al LDD (LDD = 0.12 ng/mL), mientras que el compuesto detectado en mayor concentración fue el plastificante BPA (0.87 ± 0.01 ng/g). Al igual que el sitio TMC1, este sitio es impactado principalmente por drenajes domésticos.

El sitio que presentó menor cantidad de contaminantes fue CPTC. En las muestras de agua, los fármacos IBU y NPX, así como la hormona sintética EE2 no fueron detectados. Por el contrario, los alquilfenoles 4NF y BPA, así como la hormona natural E2, fueron detectados en concentraciones menores al LDD (LDD = 0.26, 0.41 y 0.03 ng/mL respectivamente). Por otro lado, en las muestras de sedimento, únicamente fue determinada la concentración de la hormona natural E2 (0.01 ± 0.00 ng/g), mientras que los compuestos 4NP y BPA, fueron detectados en concentraciones menores al LDD. La presencia de E2, 4NP y BPA en este sitio puede ser atribuida a las especies animales albergadas en el pequeño zoológico, así como a las actividades de limpieza y riego de jardineras.

5.9 Comparación de los niveles de concentración con otros ríos alrededor del mundo

En la Tabla 17 se muestran el intervalo de las concentraciones de los compuestos determinadas en este estudio, así como las concentraciones encontradas en muestras de agua y sedimentos correspondientes a ríos ubicados en diferentes países del mundo.

En el agua superficial de la cuenca del río Apatlaco, Rivera Jaimes reportó la concentración de diferentes fármacos. Entre ellos, las concentraciones de IBU y NPX, las cuales son de hasta 2 órdenes de magnitud mayores a las determinadas en este estudio. La diferencia en las concentraciones de IBU y NPX obtenidas en este estudio, pueden ser debidas probablemente a que Rivera Jaimes realizó los muestreos en una planta de tratamiento de aguas residuales (Rivera-Jaimes et al. 2018).

Por otro lado, en el agua superficial de la cuenca del río Cuautla (perteneciente al Estado de Morelos) Calderón-Moreno (Calderón-Moreno et al. 2019) reportó concentraciones en agua de 4NP, BPA, E2 y EE2 en el mismo orden de magnitud a las encontradas en este estudio. En el caso de la hormona natural E2, las concentraciones son similares. Para los alquilfenoles 4NP y BPA,

Calderón-Moreno reportó concentraciones ligeramente mayores a las aquí determinadas. Mientras que para EE2 las concentraciones son menores a las determinadas en este trabajo.

Tabla 17 Comparación de la concentración de fármacos y CDEs entre el río Apatlaco y otros ríos del mundo

Matriz	Río	Compuesto						Bibliografía
		IBU	4NP	NPX	BPA	E2	EE2	
Agua superficial (ng/L)	Cuenca Apatlaco (México)	< LDD – 51.93	< LDD – 11.08	< LDD – 86.40	< LDD – 65.21	< LDD – 5.37	< LDD – 16.06	Este Trabajo Rivera Jaimes et al., 2018 Calderón-Moreno et., al 2019 a) Valcárcel et al. 2013; b) Rocha et al., 2015 a) Yang et al. 2015; b) Li et al., 2019
	Cuenca Cuautla. (México)	502 – 1106	--	3000 - 4820	--	--	--	
	Tagus (España y Portugal)	180 – 267 ^{a)}	1 – 21 ^{b)}	109 – 166 ^{a)}	27 – 190 ^{b)}	0.14 – 3 ^{b)}	0.1 – 9 ^{b)}	
	Yangtzé (China)	0.4 – 4 ^{b)}	ND - 104 ^{a)}	0.6 – 17 ^{b)}	15 – 110 ^{a)}	ND – 59 ^{a)}	ND – 44 ^{a)}	
Sedimento (ng/g)	Cuenca Apatlaco (México)	30 – 60	< LDD – 58	3 – 70	ND – 330	0.8 – 67	ND – 38	Este Trabajo
	Tula (México)	< LDD	--	< LDD – 102	--	--	--	Díaz y Peña-Álvarez 2017
	Río Yangtzé (China)	--	ND – 8	--	ND – 41	ND – 17	ND – 37	Wang et al., 2016
	Diferentes ríos (Italia)	--	< LDD – 97	--	< LDD – 23	--	< LDQ	Errico et al., 2017
	Mbokodweni (África)	0.8 – 3	--	4 – 9	--	--	--	Amos Sibeko et al., 2019

En países desarrollados a nivel industrial como es el caso de China, en el agua superficial del río Yangtzé se han reportado concentraciones en el mismo orden de magnitud para los compuestos IBU y NPX. (Li et al. 2019; Yang et al. 2015). Sin embargo, el rango de concentraciones detectadas para ambos compuestos es al menos 5 veces mayor en el agua superficial del río Apatlaco. Por el contrario, el rango de concentraciones para los compuestos 4NP, BPA, E2 y EE2 es al menos 2 veces mayor para en el río Yangtzé.

Por su parte, en el agua superficial del río Tagus (España/Portugal) los rangos de concentración para los fármacos IBU y NPX son de un orden de magnitud superiores a los reportados para el agua superficial de la cuenca del río Apatlaco, mientras que el rango de concentraciones de 4NP, E2 y EE2 es similar en ambos cuerpos de agua (Rocha et al. 2015; Valcárcel et al. 2013). Por el contrario, el rango de concentraciones para el BPA es al menos 3 veces superior en el agua superficial del río Tagus.

En el caso de los sedimentos no se encontraron estudios realizados en la cuenca del río Apatlaco que determinen la concentración de fármacos y CDEs. Sin embargo, en el río Tula, ubicado en Hidalgo México, Díaz y Peña-Álvarez 2017 reportaron concentraciones de IBU y NPX similares a las determinadas en este estudio. Díaz y Peña-Álvarez 2017 sugieren que debido a que estos fármacos son utilizados para el tratamiento de dolores del cuerpo, las altas concentraciones de IBU y NPX pueden ser atribuidas al número de habitantes, por lo cual mayores concentraciones de IBU y NPX son liberados al ambiente mediante drenajes domésticos.

Por otra parte, los rangos de concentraciones correspondientes a los compuestos IBU, NPX, 4NP, E2 y EE2 detectadas en el presente estudio, son similares a las concentraciones en sedimentos determinadas en el río Mbokodweni, África (Amos Sibeko et al. 2019), en el río Yangtzé de China (Wang et al. 2016) y diferentes ríos de Italia (Errico et al. 2017).

5.10 Distribución ($\log K_d$) de CDEs y fármacos entre agua y sedimento

El coeficiente de partición es un parámetro importante para determinar el transporte y destino de los compuestos en estudio. Usualmente las isotermas de adsorción de Freundlich son utilizadas para determinar la adsorción de compuestos en sedimento. Sin embargo, en cuerpos acuáticos naturales es difícil medir la adsorción de los compuestos debido a que la adsorción en el sedimento presente en el cuerpo de agua puede ser afectado por diferentes factores, tales como la composición y tamaño de partícula del material orgánico presente en ambas matrices (Amos Sibeko et al. 2019), condiciones hidrológicas del cuerpo de agua, así como posibles procesos biológicos (Cheng 2016; Pignotti y Dinelli 2018). Por lo tanto, la adsorción de los compuestos en el material sólido presente en los sitios muestreados puede darse debido a diferentes interacciones, tales como puentes de hidrógeno principalmente. Las cuales son típicamente originadas por los grupos funcionales hidroxilos y anillos aromáticos presentes en la estructura molecular de los compuestos analizados. A pesar de que los sitios analizados en este trabajo no presentan altos flujos de corriente, es imposible para los compuestos alcanzar el equilibrio entre las fases de agua-sedimento. Por lo tanto, el valor de $\log K_d$ presentado en este trabajo depende de las condiciones de algunas características fisicoquímicas en las muestras de agua.

La Tabla 18 muestra los valores de $\log K_d$ obtenidos para los compuestos analizados en sedimento y agua de la cuenca del río Apatlaco. Para todos los compuestos estudiados el valor de $\log K_d$ es > 0 , lo cual indica que los compuestos analizados presentan tendencia de adsorción con la superficie del material sólido presente en los sitios analizados.

De acuerdo con los valores $\log K_{ow}$ establecidos en diferentes estudios para los compuestos aquí analizados, la concentración de los compuestos determinadas en agua y sedimentos eran esperadas, sin embargo, a pesar de que el valor $\log K_{ow}$ de cada compuesto puede predecir la afinidad del

compuesto para permanecer disuelto en agua o interactuar con la materia orgánica presente, este no puede medir la intensidad de adsorción. Por lo que, debido a las diferencias en los niveles fisicoquímicos entre cuerpos de agua es importante determinar la concentración de los compuestos en ambas matrices antes de declarar la ausencia en sedimento de los compuestos de bajo pKa (IBU y NPX en este caso).

El valor $\text{Log } K_{ow}$ de cada compuesto analizado en este trabajo, indica que los compuestos tienden a ser adsorbidos en el sedimento en lugar de permanecer suspendidos en el agua superficial, debido a que las interacciones hidrofóbicas entre compuesto-sedimento son favorecidas (Zhao et al. 2019). Esto es consistente con las concentraciones de cada compuesto obtenida en ambas matrices, donde las concentraciones de los compuestos en sedimento son mayores en todos los casos (Tabla 16).

Los valores de $\text{Log } K_d$ obtenidos en este trabajo son consistentes con los valores de $\text{Log } K_d$ reportados por diferentes autores (Tabla 18), indicando que las interacciones hidrofóbicas de los compuestos analizados favorecen la adsorción en los sedimentos. El valor $\text{Log } K_d$ determinado para 4NP, BPA y EE2 es mayor a lo reportado por Salgueiro González et al., 2015, Gong et al., 2019 y Gomes 2011 respectivamente. El valor $\text{Log } K_d$ determinado para IBU y E2 es similar a lo reportado por Agunbiade y Moodley et al., 2016 y Gomes 2011. Mientras que para NPX el $\text{Log } K_d$ es mayor a lo reportado por Mohd Amin et al., 2016.

Esta diferencia entre los valores determinados probablemente es debido a las diferencias en el equilibrio químico, el cual no es el mismo entre diferentes cuerpos de agua, ya que estos son afectados de diferentes maneras. Adicionalmente, la composición del sedimento contribuye directamente en el valor de partición (Tan et al. 2018b). Sin embargo, los valores de $\text{Log } K_d$ mostrados en la tabla 18, concuerdan en que los compuestos analizados tienden a presentarse en mayores concentraciones en sedimento que en agua superficial.

Tabla 18 Coeficiente de partición entre sedimentos y agua ($\text{Log } K_d$) para los diferentes compuestos y $\text{Log } K_d$ determinado en otros estudios

Parámetro	IBU	4NP	NPX	BPA	E2	EE2	Bibliografía
$\text{Log } K_d$ (L/Kg)	1.43 ± 0.26*	1.35 ± 0.37*	1.05 ± 0.17*	1.24 ± 0.59*	1.91 ± 0.56*	1.4 ± 0.13*	Este trabajo
	1.08 ^{a)}	3.60 ^{b)}	0.47 ^{c)}	2.87 ^{d)}	2.26 ^{e)}	2.45 ^{e)}	a) Agunbiade y Moodley 2016; b) Salgueiro-González et al. 2015; c) Mohd Amin et al. 2016; d) Gong et al. 2019; e) Gomes et al. 2011; f) Murillo-Torres et al. 2012; g) Díaz y Peña-Álvarez 2017; h) Azzouz 2010; i) Amos Sibeko et al. 2019; j) Azzouz y Ballesteros 2014; k) Ternes et al. 2002
pKa	4.4 ^{c)}	10.3 ^{f)}	4.8 ^{c)}	9.7 ^{g)}	10.2 ^{h)}	10.2 ^{h)}	
$\text{Log } K_{ow}$	7.71 ⁱ⁾	5.76 ^{j)}	3.10 ⁱ⁾	3.5 ^{g)}	4.01 ^{k)}	3.67 ^{k)}	

5.11 Relación entre las condiciones ambientales y la concentración de fármacos y CDEs determinadas en agua y sedimento

Debido a que las matrices de agua y sedimentos ambientales son complejas y, en los diferentes sitios muestreados presentan grandes diferencias entre las concentraciones de los compuestos determinados, se estimó mediante un análisis de correlación de Spearman, la posible relación entre la concentración de los compuestos y los parámetros fisicoquímicos medidos para cada punto muestreado, teniendo en cuenta un nivel de probabilidad de $p \leq 0.1$ y $p \leq 0.05$. En este análisis fueron identificadas fuertes correlaciones positivas (Tabla 19).

Tabla 19 Correlaciones encontradas en las matrices de agua y sedimentos para los compuestos analizados ($p \leq 0.5$ y $*p \leq 0.1$)

Parámetro	Agua						Sedimentos					
	IBU	4NP	NPX	BPA	E2	EE2	IBU	4NP	NPX	BPA	E2	EE2
pH												
T (°C)												
Conductividad							+0.7632*					
O ₂ Disuelto											-0.7833*	
COT	+0.8499*			+0.8503*		+0.8423*				+0.9246		+0.8376
DBO ₅	+0.8369*			+0.9272	+0.8783	+0.9027				+0.9158		+0.8990
DQO	+0.8628*			+0.9446	+0.7483*	+0.9552		+0.8896		+0.9880		+0.9524
SST	+0.7996*	+0.7528*	+0.7899*		+0.8136*		+0.9373					

Dentro del nivel de probabilidad $p \leq 0.1$ fueron encontradas correlaciones positivas significativas entre los parámetros COT y SST con los compuestos IBU (0.8499 y 0.7996), 4NP (0.7528), NPX (0.7899), BPA (0.8503), E2 (0.8136) y EE2 (0.8423). Debido a que las muestras de agua fueron extraídas sin previa filtración, estas correlaciones están definidas por la adsorción que se da entre los compuestos y la materia orgánica suspendida en el medio acuático.

En las muestras de agua a un nivel de probabilidad $p \leq 0.05$, los parámetros DBO₅ y DQO, presentaron fuertes correlaciones positivas con los compuestos BPA (0.9272 y 0.9446), E2 (0.8783) y EE2 (0.9027 y 0.9552). Correlaciones similares fueron reportadas por Gong (Gong et al. 2019b), y pueden ser atribuidas a la biodegradación ocasionada por microorganismos acuáticos en el ambiente.

En el caso de los sedimentos, al nivel de confianza $p \leq 0.05$ fueron encontradas correlaciones positivas entre IBU y SST (0.9373), 4NP y DQO (0.8896), BPA con COT (0.9246) DBO₅(0.9158) y DQO (0.9880), EE2 con COT (0.8376), DBO₅ (0.8990) y DQO (0.9524). En el nivel de probabilidad $p \leq 0.1$,

únicamente fue encontrada una correlación negativa entre EE2 y O₂ disuelto (-0.7833), lo cual puede ser indicativo del aumento de biodegradación bajo condiciones aerobias (Gong et al. 2019b).

Adicionalmente, en ambas matrices, a un nivel de probabilidad $p \leq 0.1$ y 0.05 fueron encontradas fuertes correlaciones positivas significativas entre los compuestos analizados (no mostradas en la Tabla 19). Tales como IBU con 4NP (0.8247), NPX (0.7694), BPA (0.9200), E2 (0.9230) y EE2 (0.7691). 4NP con NPX (0.9890), BPA (0.8635), E2 (0.8582) y EE2 (0.8938). NPX con E2 (0.8251) y finalmente BPA con E2 (0.8848) y EE2 (0.9495). Lo cual indica que probablemente los compuestos provienen de la misma fuente de emisión, que en este caso son principalmente los drenajes domésticos.

Las correlaciones observadas entre compuestos y condiciones ambientales, así como las correlaciones entre compuestos detectados en este trabajo, son consistentes con lo reportado en otros estudios, en los que se ha demostrado que altas concentraciones de E2, EE2, BPA y 4NP en sedimentos está fuertemente relacionada con la concentración de COT, DQO y DBO₅. Esta relación permite la adsorción de los compuestos en la superficie de la materia orgánica mediante interacciones puentes de hidrógeno entre el carbono orgánico y los compuestos analizados (Pignotti y Dinelli 2018; Xu et al. 2006; Zhang et al. 2014).

Entretanto, a un nivel de probabilidad $p \leq 0.1$, en sedimentos se observó una correlación positiva significativa entre IBU y conductividad (0.7632). De acuerdo con el entorno de los sitios de muestreo, es probable la presencia de los cationes tales como Al³⁺, Ca²⁺ y Mg²⁺ (no determinados en este estudio). La presencia de estos cationes en el agua aumenta el efecto “salting out” (precipitación salina) y reduce la solubilidad de IBU, lo cual favorece la adsorción con los sedimentos. Esto es evidente con las concentraciones de IBU encontradas en las muestras de agua y sedimentos, en las que la concentración de IBU en las muestras de sedimentos es casi 4 veces mayor a la concentración encontrada en las muestras de agua del mismo sitio (Tabla16).

5.12 Estrogenicidad en el ambiente acuático del río Apatlaco

El riesgo estrogénico que pueden presentar los compuestos detectados en el presente estudio fue calculado en relación con la estrogenicidad de la hormona natural E2. La unión europea estableció que la mínima concentración de E2 que causa efectos de disrupción endocrina es de 1 ng /L. Por lo tanto, los compuestos disruptores endocrinos con actividad estrogénica equivalente a E2 (EEQ) mayor a 1 podría causar efectos estrogénicos en organismos acuáticos de aguas superficiales (AC01769567 1996).

Para calcular el valor de EEQ, de los compuestos estrogénicos detectados en agua y sedimentos fue tomada en cuenta la concentración del compuesto estrogénico detectada en el ambiente y el valor

del factor de estrogenicidad equivalente a E2 (EEF). Las concentraciones detectadas por debajo LDD fueron tomadas en cuenta como el valor de la concentración obtenido mediante interpolación en la recta de calibración. La estrogenicidad ambiental producida por los fármacos IBU y NPX no fue estudiada, debido a que en la literatura no fueron encontrados valores de EEF para estos compuestos.

Los valores EEF de los compuestos fueron tomados de Vega-Morales et al., 2013. Se consideró tomar estos valores para tener un valor promedio de EEF para cada compuesto, ya que Vega Morales reportó estos valores como el promedio EEF obtenido de una recopilación de diferentes estudios publicados por diferentes autores (Vega-Morales et al. 2013). Así, tomando en cuenta estos valores es posible reducir la sobreestimación o subestimación de los valores de EEF.

En el apéndice C se muestran los valores de EEQ obtenidos para cada compuesto en cada uno de los sitios analizados. Sin embargo, esta forma de presentar la actividad estrogénica no es la más adecuada, debido a que en el ambiente los compuestos detectados no se encuentran aislados. Por lo tanto, es más conveniente presentar los valores EEQ como la suma de actividad estrogénica de los compuestos para cada sitio.

La actividad estrogénica promedio estimada obtenida en agua para los sitios estudiados fue de 6.92 ± 10.45 ng/L. La actividad estrogénica total aportada por los CDEs (Σ EEQ) calculada para cada sitio desciende en el orden JTPC (25.47 ng/L) > TTL (4.10 ng/L) > TMC1 (2.60 ng/L) > TMC2 (1.95 ng/L) > CPTP (0.50 ng/L).

En la Figura 19, se muestra el valor total de EEQ en agua para cada sitio (Σ EEQ ng/L), tomando en cuenta los 4 compuestos (4NP, BPA, E2 y EE2). En las muestras de agua, en 4 de los 5 sitios analizadas (TTL, TMC1, TMC2 y JTPC) fueron el riesgo estrogénico fue clasificado como “alto”, debido a que los valores de Σ EEQ determinados son mayores a 1 ng/L. Lo que representa posible riesgo de daños estrogénicos para la fauna acuática. En estos sitios, la mayor aportación de actividad estrogénica es aportada por las hormonas E2 y EE2.

En el sitio JTPC, a pesar de que el BPA fue el compuesto detectado con mayor concentración (65.21 ± 0.14 ng/L), su aporte estrogénico es clasificado como “bajo” ($EEQ = 2.5 \times 10^{-2}$ ng/L), esto debido a su valor EEF. Sin embargo, este sitio resultó ser el de mayor riesgo estrogénico debido a la presencia de las hormonas EE2 y E2 (20.08 y 5.37 ng/L respectivamente), las cuales presentan alto riesgo de causar estrogenicidad en organismos vivos.

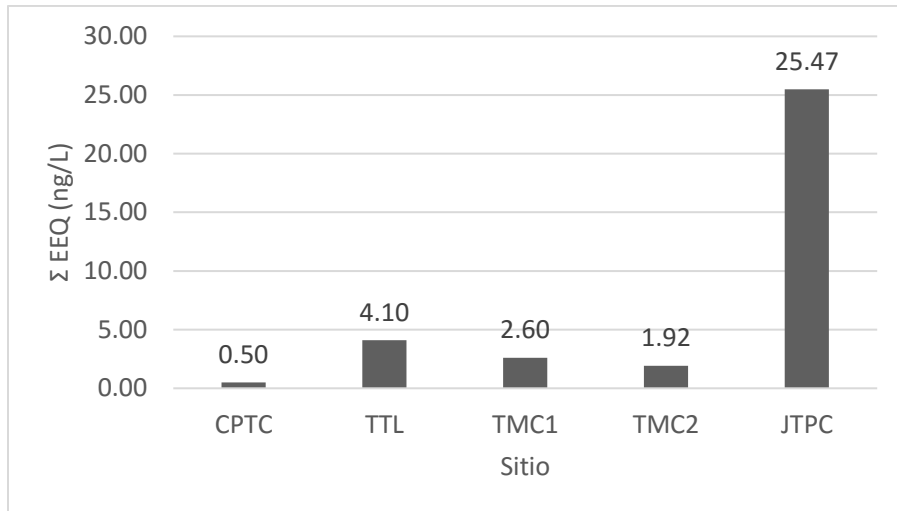


Figura 19 Valor total de EEQ (Σ EEQ ng/L) determinado en agua para cada sitio analizado

Por otro lado, en las muestras de sedimento analizadas, el riesgo estrogénico fue clasificado como “bajo”, para los 5 sitios, debido a que los valores de estrogenicidad (Σ EEQ) determinados son menores a 1 ng/L (Figura 20), lo que indica posible ausencia de riesgo de disrupción endocrina para los organismos acuáticos (López-Roldán et al. 2010).

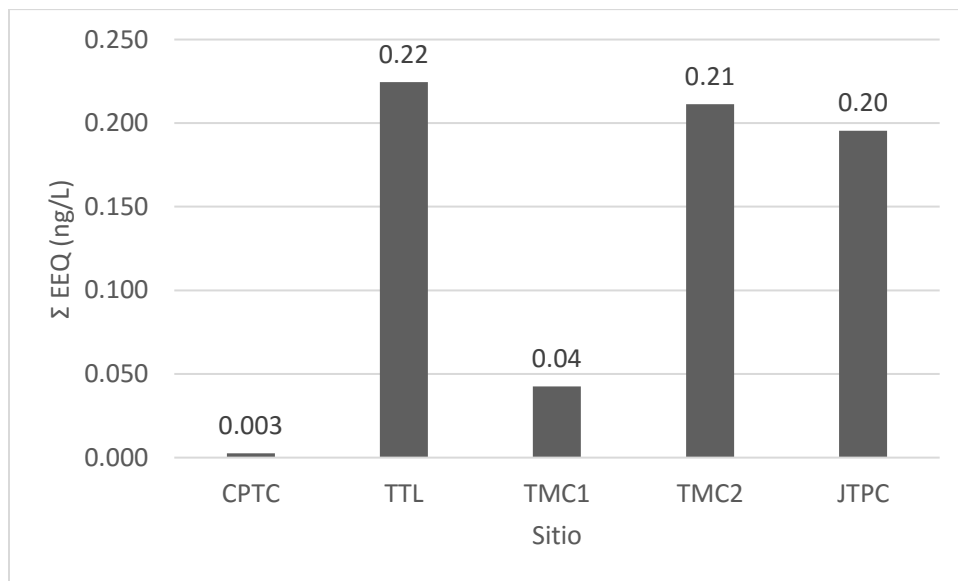


Figura 20 Valor total de EEQ (Σ EEQ ng/L) determinados en sedimento para cada sitio analizado

Los valores de estrogenicidad obtenidos en la matriz de sedimentos son menores con respecto a los obtenidos para la matriz de agua, a pesar de que los CDEs fueron detectados en mayor concentración en la matriz de sedimentos. Esto es debido a que en la ecuación para la determinación de riesgo estrogénico aportado por cada compuesto en sedimentos es considerado el carbono

orgánico normalizado, con valores de 4840, 4360, 17990 y 38900 (L/Kg) para EE2, E2, BPA y 4NP respectivamente. Lo cual es indispensable para determinar el riesgo estrogénico en concentraciones de ng/L (Tan et al. 2018).

Para esta matriz, el riesgo estrogénico promedio determinado para los 5 sitios fue de 0.14 ± 0.10 ng/L. Así, la actividad estrogénica total (Σ EEQ) determinada en los diferentes sitios se encuentra en el rango 0.003 – 0.22 ng/L (CPTC y JTPC respectivamente).

La actividad estrogénica en los sitios analizados desciende en el orden TTL (0.22 ng/L) > TMC2 (0.21 ng/L) > JTPC (0.20 ng/L) > TMC1 (0.04 ng/L) > CPTC (0.003 ng/L). En el caso del sitio JTPC, el compuesto que aporta mayor riesgo estrogénico es la hormona sintética EE2 (1.53×10^{-1} ng/L). Mientras que en el sitio CPTC, el riesgo estrogénico es aportado únicamente por la hormona natural E2 (0.002 ng/L).

5.13 Comparación del riesgo estrogénico en la cuenca del río Apatlaco y ríos de otras partes del mundo

En la Tabla 20 se muestran algunos estudios enfocados en la determinación del riesgo estrogénico determinado en diferentes ríos ubicados en diferentes partes del mundo.

El rango de riesgo estrogénico (EEQ ng/L) en agua determinado en este trabajo para las muestras de agua es de hasta un orden de magnitud mayor al determinado en la cuenca del río Cuautla (Calderón-Moreno et al. 2019), y en los ríos Yeongsan y Seomjin (Duong et al. 2010) ubicado en Corea del Sur. Lo cual es debido principalmente a la diferencia de concentraciones detectadas para las hormonas E2 y EE2.

A pesar de que China es un país con mayor desarrollo industrial que México, en diferentes ríos han sido calculados valores de Σ EEQ en agua de hasta 3 órdenes de magnitud menores a los determinados en este trabajo. Esta diferencia entre las concentraciones puede ser debida a que las muestras de agua analizadas fueron tomadas de un lago, en el que no hay corriente de agua y, por lo tanto, puede favorecerse el equilibrio químico entre compuestos y sedimentos, disminuyendo la concentración de compuestos en el agua debido a las interacciones hidrofóbicas de los compuestos de interés (Dan Liu et al. 2017). Otra posible causa de las concentraciones bajas en los ríos de China puede es el efecto dilución, ya que los ríos muestreados son susceptibles a cambios de temperatura durante el día y son recargados por deshielo (Tan et al. 2018, Liu et al. 2020). Por el contrario, en el río Pearl, el Σ EEQ calculado es hasta 2 órdenes de magnitud mayor al determinado en la cuenca del río Apatlaco (Zhao et al. 2011). Estos altos valores de Σ EEQ se deben principalmente a que en el trabajo de Zhao et al. 2011 las concentraciones de los compuestos analizados fueron determinadas

en efluentes de plantas de tratamiento de aguas, lo que demuestra la falta de eficiencia de las plantas de tratamiento para eliminar completamente los compuestos emergentes.

En el río Langat, ubicado en Malasia, fueron determinados niveles de Σ EEQ de hasta 2 órdenes de magnitud menores a los determinados en este trabajo (Praveena et al. 2016). Los bajos niveles de riesgo estrogénico son debidos a que las hormonas E2 y EE2 fueron detectadas en bajas concentraciones (No detectado a 0.005 ng/L para EE2 y No detectado a 0.004 ng/L para E2).

En el caso de la determinación del riesgo estrogénico en sedimentos, es importante mencionar que existen pocos estudios que determinan este parámetro en esta matriz. En la investigación bibliográfica realizada dentro del alcance de este proyecto, los trabajos publicados en los que se estudia la estrogénicidad en sedimentos es mucho menor que el número de trabajos que determinan el riesgo estrogénico en agua.

En este contexto, el rango de Σ EEQ determinado en este estudio es similar al rango estrogénico determinado en diferentes ríos de China (Dan Liu et al. 2017) y hasta 2 órdenes de magnitud menor al rango de Σ EEQ determinado en la laguna de Xiamen, China (Zhang et al. 2011). Por otro lado, el rango de Σ EEQ determinado en este trabajo es de hasta 3 órdenes de magnitud menor al rango Σ EEQ determinado en la cuenca de Lhasa y en el río Pearl, ubicados en China (Liu et al. 2020, (Zhao et al. 2011).

Tabla 20 Estrogénicidad en el río Apatlaco y en ríos de diferentes partes del mundo

Río/País	Estrogénicidad (Σ EEQ ng/L)	Compuestos analizados	Bibliografía
Agua			
Cuenca Apatlaco/México	0.50 – 25.47	4NP, BPA, E2, EE2	Este trabajo
Cuenca Cuautla/México	0.02 – 6.6	4NP, BPA, E2, EE2, 4tOP	Calderón-Moreno et al. 2019
Langat/Malasia	4.13×10^{-2} – 0.0	E2, EE2, E1, E3	Praveena et al. 2016
Diferentes ríos/China	3×10^{-4} – 4.45×10^{-3}	BPA, E1, E2, EE2	Tan et al. 2018
Cuenca Lhasa/China	5×10^{-3} – 0.04	BPA, E1, E2, E3, OP	Liu et al. 2020
Yeongsan y Seomjin /corea del sur	3.8 – 5.9	4NP, BPA, OP, E2, E1, EE2	Duong et al. 2010
Diferentes ríos/China	3.27×10^{-3} – 2.24	E2, EE2, DES, BPA, 4NP, OP	Dan Liu et al. 2017
Pearl/China	0.23 - 324	E2, DHTT, Ehrenstorfer, tamoxifeno, flutamida	Zhao et al. 2011
Sedimentos			
Cuenca Apatlaco/México	0.003 – 0.22	4NP, BPA, E2, EE2	Este trabajo
Varío ríos/China	1.87×10^{-7} – 1.41	BPA, E1, E2, EE2	Tan et al. 2018
Cuenca Lhasa/China	2 - 105	BPA, E1, E2, E3, P	Liu et al. 2020
Pearl/China	0 - 101	E2, DHTT, Ehrenstorfer, tamoxifeno, flutamida	Zhao et al. 2011
Laguna Xiamen/China	8.66 - 23.95	E1, E2, EE2, DES, 4NP, OP, BPA	Zhang et al. 2011

4tOP = 4 ter-octilfenol; OP = octilfenol; E1 = estrona; E3 = estriol; P = progesterona; DES = dietilestilbestrol; DHTT = dihidrotestosterona

Como se mencionó anteriormente, los niveles de Σ EEQ en sedimentos han sido escasamente estudiados, alrededor del mundo. Tal es el hecho, que, durante la revisión en la literatura, no se encontró algún trabajo publicado que se enfoque en determinar el riesgo estrogénico en

sedimentos de cuerpos de agua superficial ubicados en México. Aunado a esto, es de igual importancia mencionar que este es el segundo trabajo que se enfoca en determinar el riesgo estrogénico en agua natural del país, siendo el primero el reportado por Calderón-Moreno et al., 2019. Lo que deja evidenciado que en México no se ha logrado desarrollar una legislación actualizada que evalúe las condiciones ambientales requeridas en los cuerpos de agua superficial y sus sedimentos.

5.14 Riesgo ecológico

En la determinación del riesgo ecológico (RQ por sus siglas de acuerdo con la USEPA) en agua superficial, el riesgo ecológico para cada compuesto fue catalogado como bajo ($RQ < 0.10$), medio ($0.11 < RQ < 1.0$) o alto ($RQ > 1.01$). Para este análisis, fueron consideradas todas las concentraciones de los CDEs sin tomar en cuenta que fueran detectadas en concentraciones por debajo del límite de detección. En este contexto, fueron determinados niveles RQ bajos, medio y altos debido a los CDEs presentes en los sitios estudiados (Figura 21). Lo que indica que en los sitios determinados con índice RQ alto, existe la probabilidad de que se produzcan o puedan producirse efectos ecológicos adversos como consecuencia de la exposición a los CDEs analizados. Los niveles RQ específicos aportados por cada compuesto para los sitios analizados se muestran en el apéndice D.

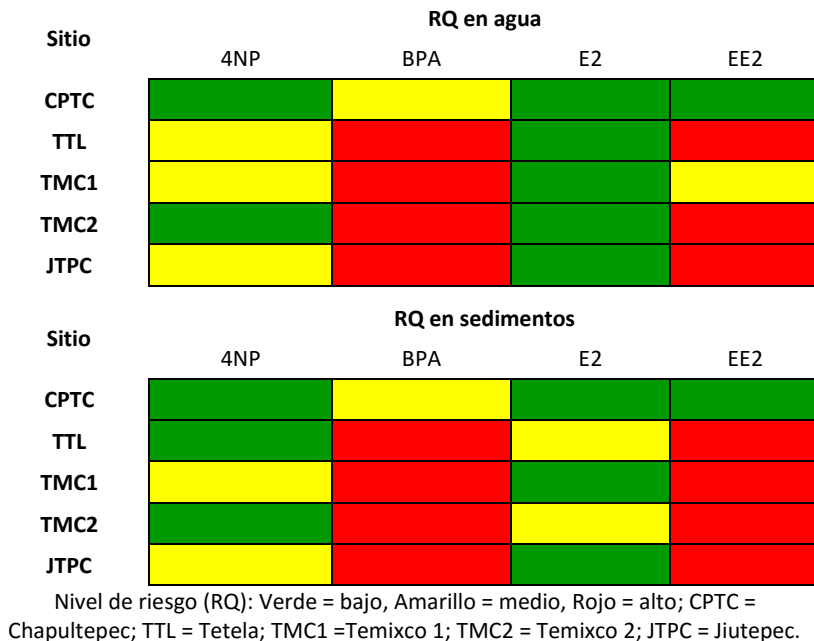


Figura 21 Nivel de riesgo ecológico (RQ) determinado para los CDEs en cada sitio

En la matriz de agua superficial, el RQ aportado por cada compuesto para los diferentes sitios descende en el orden BPA > EE2 > 4NP > E2. El RQ aportado por el alquilfenol BPA va de riesgo medio (RQ = 0.42, CPTC) a alto (RQ = 28.68, JTPC). El RQ aportado por la hormona EE2 va de riesgo bajo (RQ = 0.00, CPTC) a alto (RQ = 481.80, JTPC). El RQ aportado por el alquilfenol 4NP va de bajo (RQ = 0.00, CPTC) a medio (RQ = 0.02, JTPC), mientras que el RQ aportado por la hormona natural E2 es de riesgo bajo para todos los sitios estudiados (RQ = 0.00). El RQ bajo obtenido para E2 en todos los sitios es debido a que este compuesto presenta un valor PNEC relativamente alto (PNEC = 1.64), mientras que para el caso de la hormona EE2, su valor PNEC es de apenas 0.03.

En la matriz de sedimentos, fueron determinados niveles RQ de bajo a alto. En esta matriz la aportación a la afectación en RQ para los sitios analizados decrece en el orden BPA > EE2 > 4NP > E2. El cuál es el mismo orden de afectación presentado en la matriz de agua, pero con diferentes niveles RQ determinados. En este sentido, el RQ aportado por el alquilfenol BPA va de riesgo medio (RQ = 0.40, CPTC) a alto (RQ = 349.27, JTPC). El RQ aportado por la hormona EE2 va de riesgo bajo (RQ = 0.00, CPTC) a alto (RQ = 2760.00, JTPC). El RQ aportado por el alquilfenol 4NP va de bajo (RQ = 0.00, CPTC) a medio (RQ = 0.29, JTPC), mientras que el RQ aportado por la hormona natural E2 va de riesgo bajo (RQ = 0.00) a riesgo medio (RQ = 0.11, JTPC).

Los niveles RQ aportados por los CDEs en los sitios analizados muestran que las concentraciones determinadas de estos compuestos pueden propiciar riesgo ecológico a los organismos acuáticos de los sitios analizados. Sin embargo, de acuerdo con la USEPA, los cuerpos de agua superficial son impactados por diferentes tipos de contaminantes, que provienen de las diferentes descargas de drenajes, por lo que el riesgo ecológico no debe ser asociado únicamente a un compuesto (EPA 1997). En este sentido, es más conveniente reportar el nivel de RQ como la suma de los valores RQ de los compuestos sospechosos de provocar alguna disrupción en organismos acuáticos. Este valor es denominado índice de peligro o hazard index (HI). Donde, valores de HI > 1 indican que el sitio presenta un riesgo alto y puede ocasionar efectos negativos a los organismos acuáticos que habitan el cuerpo de agua. Sin embargo, un HI < 1, no indica que el cuerpo de agua está exento de riesgo ecológico, más bien el riesgo ecológico debe de ser interpretado de acuerdo con los efectos reportados con la magnitud del HI determinado (EPA 1997).

En la matriz de agua (Figura 22) y sedimentos (Figura 23), fue determinado que con excepción del sitio CPTC, todos los sitios presentan niveles de riesgo ecológico alto (HI > 1). Lo que sugiere que los organismos acuáticos están expuestos a riesgo ecológico asociado a los CDEs analizados (Calderón-Moreno et al. 2019; EPA 1997; Gao et al. 2014; Liu et al. 2016; Yuan et al. 2014; Zha et al. 2008).

A diferencia de estudios realizados en china, específicamente en el lago Donghu, en el río Yangtzé y en la cuenca del río Liao (Jin et al. 2013b; Lu et al. 2010; Tan et al. 2018b), en este trabajo el riesgo ecológico fue aportado mayormente por la hormona EE2 y el alquilfenol BPA, y no por las hormonas EE2 y E2. Por lo que, a pesar del bajo valor EEF que presenta el alquilfenol BPA, este puede generar

riesgo ecológico significativo en los sitios analizados debido a las altas concentraciones en las que fue encontrado en las muestras de agua y sedimentos analizados.



Figura 22 Niveles HI en agua determinados para cada sitio analizado

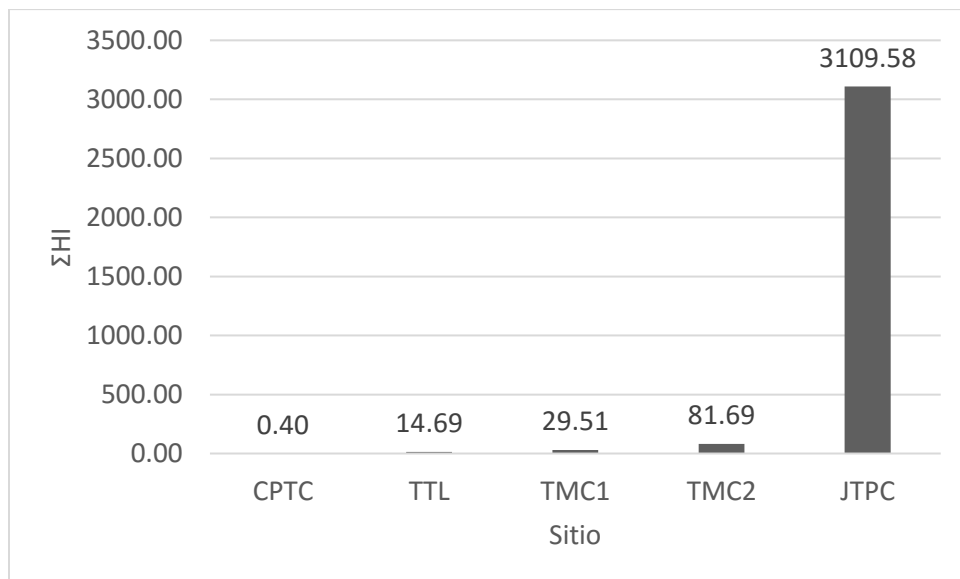


Figura 23 Niveles HI en sedimentos determinados para cada sitio analizado

5.15 Calidad del agua en los cuerpos acuáticos estudiados

La Tabla 21 presenta los niveles de los parámetros fisicoquímicos determinados en las muestras de agua analizadas en este trabajo. De acuerdo con la Comisión Nacional del Agua (CONAGUA), el pH y la temperatura de todas las muestras de agua analizadas se encuentran dentro de los rangos de los límites máximos permitidos (LMP) para agua superficial (CONAGUA 2012).

Tabla 21 Parámetros fisicoquímicos de las muestras colectadas y analizadas

Sitio	pH	Temperatura (°C)	O ₂ disuelto (mg/L)	COT (mg/L)	DBO ₅ (mg/L)	DQO (mg/L)	DBO ₅ /DQO
CPTP	7.48	21	7.7	0.9	1	1	1
TTL	7.6	20	1.1	2.8	14	17	0.82
TMC1	7.62	24.9	5	5.1	3.1	33	0.1
TMC2	7.2	26	4.5	8.1	11	47	0.23
JTPC	7.53	26.1	4.6	13.4	33	144	0.23
LMP	6 - 8	25 - 30	6	---	*	---	---

LMP = Límite máximo permisible; *Categorizado

El rango de concentración de COT en las muestras analizadas osciló entre 0.9 y 13.4 mg/L (CPTC y JTPC respectivamente), sin embargo, debido a que la concentración máxima permisible de COT en aguas superficiales no se encuentra establecida, no es posible clasificar el grado de contaminación del agua. Pero es importante tener en cuenta que la concentración de COT afecta directamente la concentración de oxígeno disuelto. Debido a que para la degradación de la materia orgánica es necesaria la presencia de oxígeno.

En el análisis de muestras de agua superficial realizado en este trabajo, los resultados obtenidos de las muestras analizadas para COT y DQO mostraron consistencia con lo discutido en el párrafo anterior.

De acuerdo con los criterios establecidos por la CONAGUA, la calidad del agua en base a la demanda bioquímica de oxígeno en 5 días (DBO₅) en los sitios CPTP y TTL (DBO₅ ≤ 3) es de “calidad excelente”. Es decir, es agua superficial no contaminada por materia orgánica disuelta. En el sitio TMC1, la calidad del agua es clasificada como de “buena calidad” (3 < DBO₅ < 6 mg/L). Lo que indica que contiene bajo contenido de materia orgánica. En el sitio TMC2 la calidad del agua es clasificada como “calidad aceptable” (6 < DBO₅ < 30 mg/L). Lo que indica que el agua superficial presenta indicios de contaminación por materia orgánica que posiblemente proviene de descargas de aguas tratadas por métodos biológicos, pero es agua con capacidad de autodepuración de materia orgánica. Mientras que para el sitio JTPC, la calidad del agua es considerada como “contaminada” (30 < DBO₅ < 120). Lo que indica que es agua superficial contaminada principalmente por descargas de agua residual cruda que proviene principalmente de la red de drenajes municipales.

En el análisis de DBO_5 , ninguna de las muestras presentó calidad del agua clasificada como “fuertemente contaminada” ($DBO > 120$). Una concentración de $DBO_5 > 120$ indica descargas de aguas residuales crudas municipales y no municipales (CONAGUA 2012)

Los resultados obtenidos para la DQO muestran consistencia con relación a DBO_5 obtenido para cada muestra analizada. Ya que debido a la presencia de materia orgánica que no es biodegradable, la concentración de DQO es mayor a la DBO_5 en todas las muestras analizadas.

Con los resultados obtenidos de DBO_5 y DQO es posible obtener una idea del nivel de contaminación del agua analizada. Aunado a esto, mediante el cociente de las concentraciones DBO_5/DQO , fue posible determinar que en los sitios TMC1, TMC2 y JTPC ($DBO_5/DQO < 0.2$) el agua es alterada principalmente por vertidos de naturaleza industrial que contiene contaminantes levemente biodegradables. Lo cual es consistente con la ubicación de los sitios muestreados. Mientras que para los sitios CPTC y TTL, el cociente de concentración $DBO_5/DQO (> 0.5)$, indica que el efecto contaminante a estos cuerpos de agua es principalmente por vertidos de agua de naturaleza urbana que contiene compuestos altamente biodegradables.

5.16 Impacto en los cuerpos de agua muestreados

El río Apatlaco, es hogar de diferentes especies animales y vegetales, de los cuales destaca la carpita Morelense (*Notropis boucardi*) y el cangrejito barranqueño (*Pseudothelphusa dugesi*).

En el cuerpo de agua correspondiente a agua de manantial (CPTP), habitan especies animales endémicas del Estado de Morelos, entre los que se encuentran el pez carpita Morelense (*Notropis boucardi*) y el cangrejito barranqueño (*Pseudothelphusa dugesi*). Además de aves como el pájaro reloj (*Momotus mexicanus*), pájaro Carpintero enmascarado (*Melanerpes chrysogenys*), así como patos. A su vez, pueden encontrarse animales terrestres como la iguana negra (*Ctenosaura pectinata*), el tlacuache (*Didelphis virginiana*), el cacomixtle (*Bassariscus astutus*) y la ardilla (*Otospermophilus variegatus*). Sin duda alguna, estas especies pueden desarrollarse en este sitio debido a la sustentabilidad que el lugar maneja (CONAGUA 2012).

Por otro lado, los sitios TTL, TMC1, TMC2 y JTPC se encuentran ubicados en ciudades asentadas que emiten descarga directa de drenaje al río (río Apatlaco). Esta es la principal causa de deterioro de la calidad del agua de este río, ya que, estas descargas directas contienen residuos sólidos, plaguicidas y otros productos químicos de uso cotidiano (CONAGUA 2012).

Hoy en día, es bien conocido que los CDEs, tienen la habilidad de afectar negativamente el funcionamiento del sistema endocrino del hombre y animales, lo que es ocasionado debido a la semejanza en la estructura molecular entre CDEs y hormonas naturales (Gibson y Saunders 2014; Giulivo et al. 2016).

Los CDEs presentes en el ambiente, reportados en este estudio han sido reportados por otros autores en diferentes matrices, tales como agua subterránea, agua superficial, agua de manantial, agua tratada en plantas de tratamiento, sedimentos de cuerpo de agua superficiales, plantas (Amos Sibeko et al. 2019), tejido de animales que viven dentro de los cuerpos de agua, así como animales que utilizan a los cuerpos de agua como fuente principal de alimentación (Ruhí et al. 2016).

Los efectos de los compuestos estrogénicos en la fauna acuática pueden ocasionar un problema para el desarrollo y preservación de la vida animal que habita en la cuenca del río Apatlaco, ya que algunos estudios reportan que tan solo la presencia de la hormona sintética EE2 en cuerpos de agua superficial puede provocar feminización de peces, así como la reducción en el tamaño de testículos de peces macho (Anderson et al. 2012; Vilela et al. 2018). Lo que tiene como consecuencia la disminución en la capacidad de reproducción (Donk et al. 2016; Rose et al. 2013). Adicionalmente, la presencia de EE2 puede reducir la biomasa de los peces, además de la interrupción de la cadena trófica (Hallgren et al. 2014). Adicionalmente, se sabe que los estrógenos sintéticos contenidos en cuerpos de agua no solo afectan a peces. En este sentido, el grupo de Salla et al. 2016 reportó que concentraciones de EE2 > 10 ng/L pueden provocar alteraciones en el funcionamiento del corazón de renacuajos de rana toro (Salla et al. 2016).

Por otro lado, estudios han reportado que la presencia de fármacos ácidos en el ambiente puede provocar riesgos a la salud de organismos acuáticos, así como en humanos (Celiz et al. 2009). Adicionalmente, se ha reportado que la presencia de fármacos puede inhibir la germinación de semillas y plantas de cultivo (Schmidt y Redshaw 2015).

Otro aspecto importante para tomar en cuenta es que, en actividades de riego, los fármacos pueden ser absorbidos por plantas o cultivos regados con aguas contaminadas (Amos Sibeko et al. 2019; Prosser et al. 2014). A pesar de esto, no se ha demostrado científicamente que la ingesta de fármacos IBU y NPX mediante alimentos vegetales pueda conllevar riesgos adversos a la salud (Luís et al. 2020).

Por tales razones, la presencia de CDEs en los cuerpos de agua analizados podrían representar un riesgo. Ya que un exceso de individuos hembra de peces puede traer como consecuencia la interrupción del ciclo de reproducción en peces. Por otro lado, la concentración de compuestos en tejidos animales, vegetales y del humano puede aumentar debido a la cadena trófica, lo que puede ocasionar efectos negativos en el crecimiento y funcionamiento de estos organismos (Ruhí et al. 2016).

Capítulo 6

Conclusiones

Las conclusiones de este trabajo son:

- El método analítico de CG-EM establecido permite la identificación correcta y cuantificación de los compuestos de interés derivatizados (IBU, 4NP, NPX, BPA, E2 Y EE2).
- La eficiencia, así como la repetibilidad y reproducibilidad de los métodos de extracción aplicados a muestras ambientales son afectados por el tipo de disolventes empleados durante el acondicionamiento de la fase estacionaria y elución de los compuestos extraídos. Siendo la mezcla acetona – MeOH 3:2 la más adecuada para la extracción de los compuestos IBU, 4NP, NPX, BPA, E2 Y EE2.
- A pesar de que el valor pKa de los compuestos estudiados se encuentra en un rango amplio (desde 4.2 hasta 10.2), los mayores porcentajes de recuperación fueron obtenidos con muestras a pH neutro.
- Las concentraciones de los CDEs E2 y EE2 determinadas en las muestras de agua analizadas son hasta 5 y 19 veces superiores (respectivamente) a las concentraciones recomendadas por la USEPA.

- Mediante el $\text{Log } K_d$ y correlación de Spearman fue determinado que, debido a las características fisicoquímicas de las moléculas de los fármacos y CDEs, así como los parámetros ambientales del agua, las interacciones hidrofóbicas en el cuerpo de agua son favorecidas, por lo que los fármacos y CDEs son adsorbidos en los sedimentos y materia orgánica.
- La concentración determinada de los compuestos analizados en agua y sedimentos es atribuida principalmente a la descarga de drenajes domésticos e industriales.
- Con excepción del sitio Chapultepec (CPTP) todos los sitios muestreados pueden ser considerados con potencial riesgo estrogénico a la salud de los organismos acuáticos. Debido a que la estrogenicidad equivalente a E2 es mayor a 1 ng/L.
- Con excepción del sitio Chapultepec (CPTP), en todos los sitios muestreados se determinaron niveles de riesgo ecológico ($\text{HI} > 1$) desde medio hasta alto, debido a las concentraciones de los CDEs presentes.
- A diferencia de estudios realizados en China, donde los mayores niveles de HI fueron aportados por las hormonas EE2 y E2, en este estudio los mayores niveles de riesgo ecológico (HI) en agua y sedimentos fueron aportados por la hormona E2 y el alquilfenol BPA.
- De acuerdo con los parámetros de calidad del agua determinados, 4 de los 5 sitios analizados, presentan calidad del agua en el rango de “aceptable” a “excelente”. El sitio Jiutepec (JTPC) fue el único que presenta calidad del agua “contaminada”, debido al impacto de aguas crudas principalmente. Sin embargo, Con excepción del sitio Chapultepec (CPTC) la concentración de los contaminantes analizados representa un riesgo ecológico en los otros 4 sitios analizados.

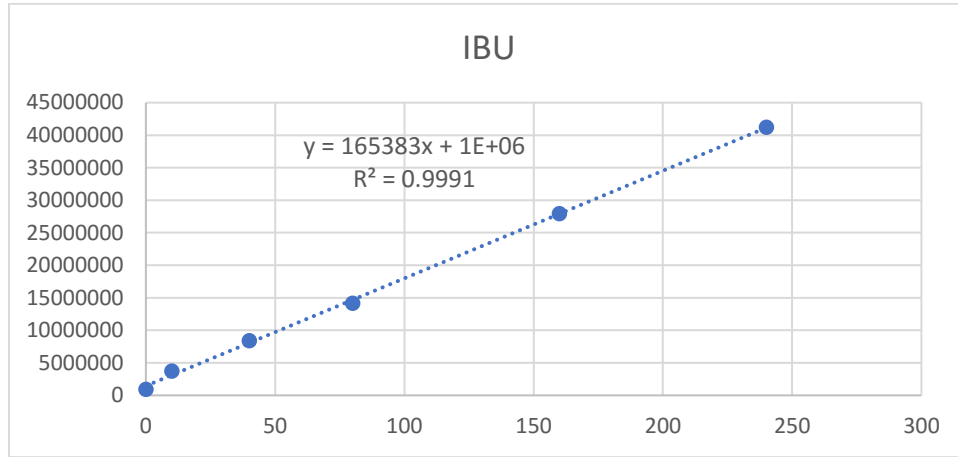
Perspectivas

Realizar estudios en las 4 estaciones del año para determinar el comportamiento de los compuestos contaminantes en el agua ambiente y sus sedimentos.

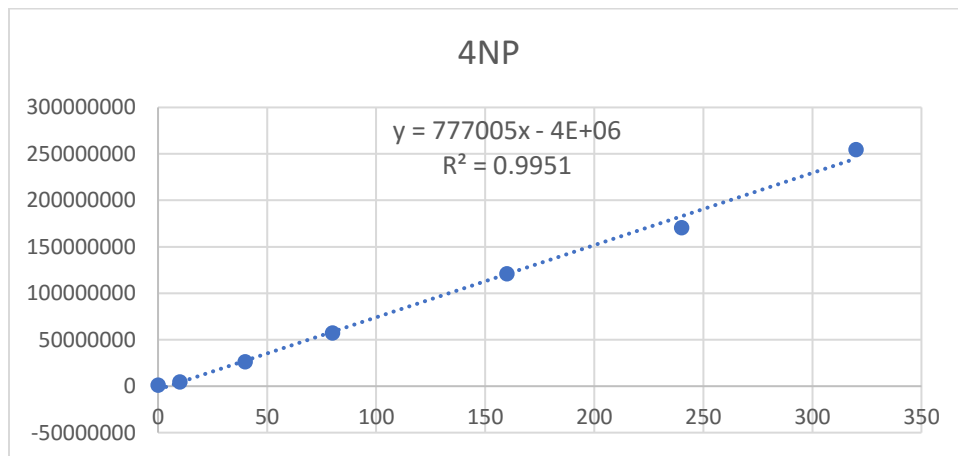
Determinar el grado de impacto estrogénico en peces que habitan en los sitios determinados con potencial riesgo estrogénico para organismos acuáticos.

Realizar análisis futuros de los mismos sitios utilizando el kit S-YES para reforzar los resultados obtenidos en los niveles de estrogenicidad.

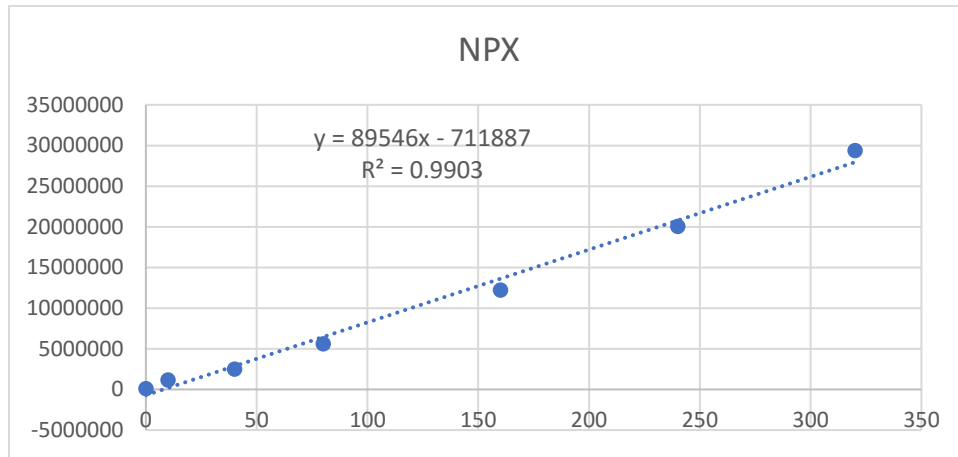
Apéndice A



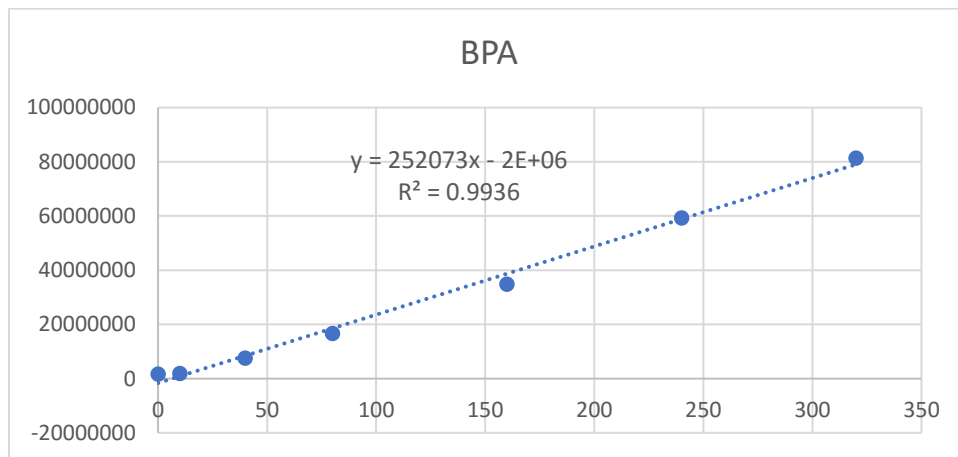
Recta de calibración obtenida para ibuprofeno (IBU)



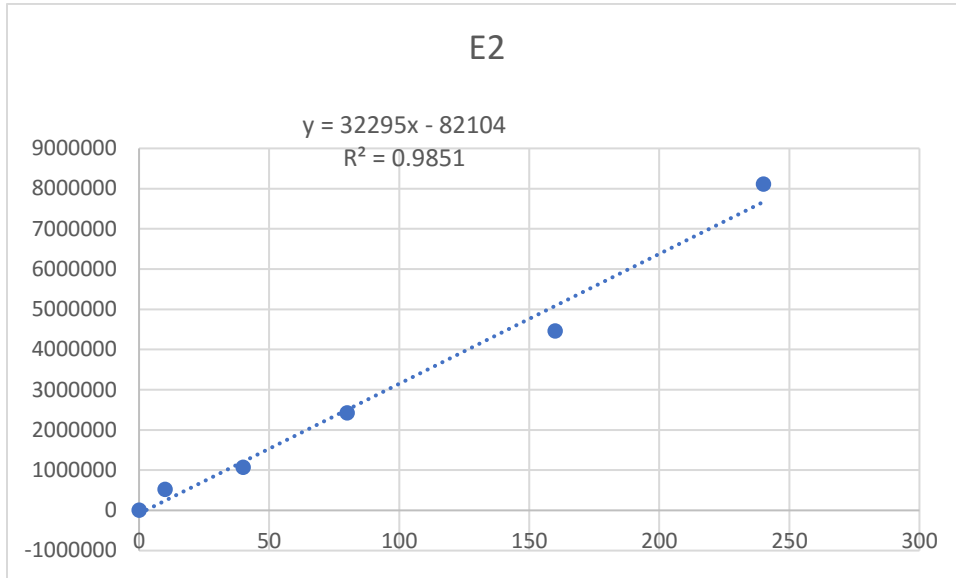
Recta de calibración obtenida para 4-nonilfenol (4NP)



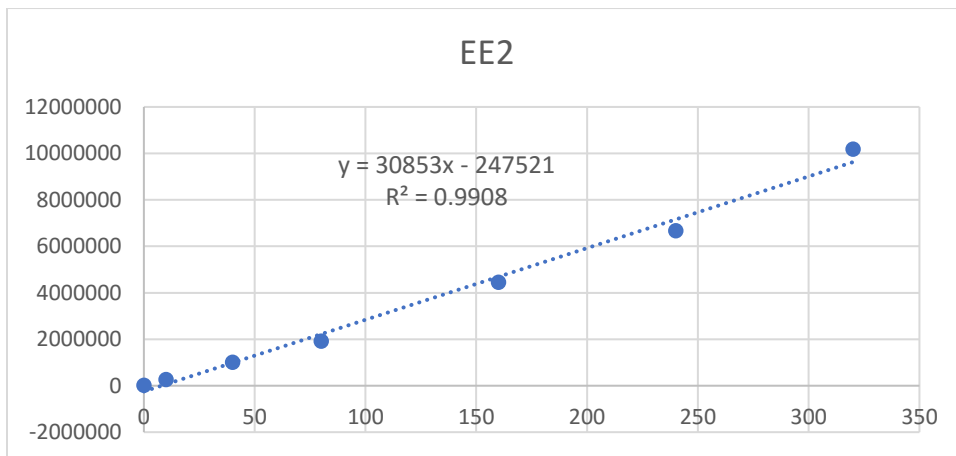
Recta de calibración obtenida para naproxeno (NPX)



Recta de calibración obtenida para bisfenol A (BPA)



Recta de calibración obtenida para 17 β



Recta de calibración obtenida para 17 α -etinilestradiol (EE2)

T-Student ($p \geq 0.05$) para comprobar linealidad de las rectas de calibrado

Compuesto	r	n	t calculado	t tablas
IBU	0.9991	6	47.1086	2.7764
4NP	0.9951	7	22.5046	2.5706
NPX	0.9903	7	15.9370	2.5706
BPA	0.9936	7	19.6692	2.5706
E2	0.9851	6	11.4558	2.7764
EE2	0.9908	7	16.3705	2.5706

n = niveles de concentración en la recta de calibración.

Apéndice B

Prueba F para determinar homocedasticidad en la recta de calibrado para ibuprofeno (IBU). $F_{2,2} = 39$ (en rojo valores superiores a F de tablas (> 39)).

IBU (ng/mL)	0	10	40	80	160	240
0						
10	26.9264					
40	2.8336	9.5025				
80	59.8192	2.2216	21.1107			
160	1384.0499	51.4013	488.4423	23.1372		
240	973.0137	36.1361	343.3843	16.2659	1.4224	

Prueba F para determinar homocedasticidad en la recta de calibrado para 4-nonilfenol (4NP). $F_{2,2} = 39$ (en rojo valores superiores a F de tablas (> 39)).

4NP (ng/mL)	0	10	40	80	160	240	320
0							
10	27.1102						
40	884.0420	32.6093					
80	560.2150	20.6644	0.6337				
160	6750.0165	248.9848	7.6354	12.0490			
240	877.0629	32.3518	0.9921	1.5656	7.6962		
320	241963.4113	8925.1948	273.7013	431.9117	35.8463	275.8792	

Prueba F para determinar homocedasticidad en la recta de calibrado para naproxeno (NPX). $F_{2,2} = 39$ (en rojo valores superiores a F de tablas (> 39)).

NPX (ng/mL)	0	10	40	80	160	240	320
0							
10	23.6146						
40	126.6825	5.3646					
80	3583.7313	151.7590	28.2891				
160	13080.9214	553.9333	103.2575	3.6501			
240	31444.7665	1331.5808	248.2170	8.7743	2.4039		
320	4802.5040	203.3700	37.9098	1.3401	0.3671	6.5476	

Prueba F para determinar homocedasticidad en la recta de calibrado para bisfenol A (BPA). $F_{2,2} = 39$ (en rojo valores superiores a F de tablas (> 39)).

BPA (ng/mL)	0	10	40	80	160	240	320
0							
10	76.0293						
40	896.6638	11.7937					
80	794.3913	10.4485	0.8859				
160	3612.1348	47.5098	4.0284	4.5470			
240	117838.3928	1549.9086	131.4187	148.3380	32.6229		
320	153661.8017	2021.0879	171.3706	193.4334	42.5404	1.3040	

Prueba F para determinar homocedasticidad en la recta de calibrado para 17β – estradiol (E2). $F_{2,2} = 39$ (en rojo valores superiores a F de tablas (> 39)).

E2 (ng/mL)	0	10	40	80	160	240
0						
10	494.5704					
40	777.0961	1.5713				
80	994.1685	2.0102	1.2793			
160	986.8065	1.9953	1.2699	0.9926		
240	5433.9329	10.9872	6.9926	5.4658	5.5066	

Prueba F para determinar homocedasticidad en la recta de calibrado para 17α – etinilestradiol (EE2). $F_{2,2} = 39$ (en rojo valores superiores a F de tablas (> 39)).

EE2 (ng/mL)	0	10	40	80	160	240	320
0							
10	108.2387						
40	4701.0096	43.4319					
80	7005.3561	64.7214	1.4902				
160	1741.7487	16.0917	0.3705	0.2486			
240	32358.8084	298.9579	6.8834	4.6192	18.5783		
320	102035.6225	942.6908	21.7050	14.5654	58.5823	3.1533	

Apéndice C

Actividad estrogénica (EEQ_{ng/L}) en agua

	4NP	BPA	E2	EE2	Σ EEQ (ng/L)
EEQ (ng/L)	2.70E-04	3.90E-04	1	1.25	
CPTC	6.48E-05	3.74E-04	0.50	0.00	0.50
TTL	2.28E-03	7.70E-03	4.03	0.06	4.10
TMC1	2.48E-03	7.73E-03	2.55	0.04	2.60
TMC2	1.94E-04	4.04E-03	1.87	0.05	1.92
JTPC	2.99E-03	2.54E-02	5.37	20.08	25.47
Promedio	1.60E-03	0.0091	2.86	4.05	6.92
DE	0.0014	0.0096	1.89	8.96	10.45

DE = Desviación estándar

Actividad estrogénica (EEQ_{ng/L}) en sedimentos

	4NP	BPA	E2	EE2	Σ EEQ (ng/L)
EEQ (ng/L)	2.70E-04	3.90E-04	1	1.25	
CPTC	7.70E-09	6.62E-08	2.64E-03	0.00E+00	0.003
TTL	3.26E-07	1.45E-06	2.24E-01	3.20E-04	0.22
TMC1	2.63E-06	3.78E-06	4.22E-02	3.60E-04	0.04
TMC2	1.79E-07	1.26E-05	2.11E-01	2.80E-04	0.21
JTPC	1.06E-05	5.77E-05	4.22E-02	1.53E-01	0.20
Promedio	2.75E-06	0.0000	0.10	0.03	0.14
DE	0.0000	0.0000	0.10	0.07	0.10

DE = Desviación estándar

Apéndice D

Riesgo ecológico (HI) aportado por cada compuesto en agua

Agua					
Sitio	4NP	BPA	E2	EE2	ΣHI
CPTC	0.00	0.42	0.00	0.00	0.42
TTL	0.02	8.69	0.00	1.50	10.21
TMC1	0.02	8.71	0.00	0.90	9.63
TMC2	0.00	4.56	0.00	1.20	5.76
JTPC	0.02	28.68	0.00	481.80	510.51

Riesgo ecológico (HI) aportado por cada compuesto en sedimentos

Sedimento					
Sitio	4NP	BPA	E2	EE2	ΣHI
CPTC	0.00	0.40	0.00	0.00E+00	0.40
TTL	0.03	8.80	0.10	5.76	14.69
TMC1	0.14	22.87	0.02	6.48	29.51
TMC2	0.01	76.54	0.10	5.04	81.69
JTPC	0.29	349.27	0.02	2760.00	3109.58

Bibliografía

- AC01769567. 1996. Technical guidance document in support of Commission directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances and Commission regulation (EC) No. 1488/94 on risk assessment for existing substances.
- Agarwal, A., M. S. de los Angeles, R. Bhatia, I. Chéret, S. Davila-Poblete, M. Falkenmark, F. González-Villarreal, T. Jønch-Clausen, T. Kadi, y Kindler J. 2000. Integrated Water Resources Management. Global Water Partnership (GWP); Tack Background Papers No. 4; Global Water Partnership Technical Advisory Committee (TAC): Stockholm, Sweden. 2000.
- Agüera, Ana, María Jesús Martínez Bueno, y Amadeo R. Fernández-Alba. 2013. "New trends in the analytical determination of emerging contaminants and their transformation products in environmental waters". *Environmental Science and Pollution Research* 20(6):3496–3515. doi: 10.1007/s11356-013-1586-0.
- Agunbiade, Foluso O., y Brenda Moodley. 2016. "Occurrence and Distribution Pattern of Acidic Pharmaceuticals in Surface Water, Wastewater, and Sediment of the Msunduzi River, Kwazulu-Natal, South Africa: Acidic Pharmaceuticals in Kwazulu-Natal Water and Sediments". *Environmental Toxicology and Chemistry* 35(1):36–46. doi: 10.1002/etc.3144.
- Albero, Beatriz, Consuelo Sánchez-Brunete, Ana I. García-Valcárcel, Rosa A. Pérez, y José L. Tadeo. 2015. "Ultrasound-assisted extraction of emerging contaminants from environmental samples". *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 71:110–18. doi: 10.1016/j.trac.2015.03.015.
- Álvarez-Muñoz, D., B. Huerta, M. Fernández-Tejedor, S. Rodríguez-Mozaz, y D. Barceló. 2015. "Multi-residue method for the analysis of pharmaceuticals and some of their metabolites in bivalves". *Talanta* 136:174–82. doi: 10.1016/j.talanta.2014.12.035.
- Amos Sibeko, Pheko, Devrani Naicker, Phumlane Selby Mdluli, y Lawrence Mzukisi Madikizela. 2019. "Naproxen, ibuprofen, and diclofenac residues in river water, sediments and *Eichhornia crassipes* of Mbokodweni river in South Africa: An initial screening". *Environmental Forensics* 20(2):129–38. doi: 10.1080/15275922.2019.1597780.
- Anderson, Paul D., Andrew C. Johnson, Danielle Pfeiffer, Daniel J. Caldwell, Robert Hannah, Frank Mastrocco, John P. Sumpter, y Richard J. Williams. 2012. "Endocrine disruption due to estrogens derived from humans predicted to be low in the majority of U.S. surface waters". *Environmental Toxicology and Chemistry* 31(6):1407–15. doi: 10.1002/etc.1824.
- Aneck-Hahn, Nh, Ms Bornman, y C. De Jager. 2009. "Oestrogenic Activity in Drinking Waters from a Rural Area in the Waterberg District, Limpopo Province, South Africa". *Water SA* 35(3). doi: 10.4314/wsa.v35i3.76760.
- AOAC. 2002. "Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures To Validate Characteristics of a Method of Analysis". *Interlaboratory Collaborative Study Appendix D*:1–12.

- Arguello-Pérez, Miguel ángel, Jorge Alberto Mendoza-Pérez, Adrián Tintos-Gómez, Eduardo Ramírez-Ayala, Enrique Godínez-Domínguez, y Francisco de Asís Silva-Bátiz. 2019. "Ecotoxicological analysis of emerging contaminants from wastewater discharges in the Coastal Zone of Cihuatlán (Jalisco, Mexico)". *Water (Switzerland)* 11(7). doi: 10.3390/w11071386.
- Azpilcueta Pérez, María Elizabeth, Aurelio Pedroza Sandoval, Ignacio Sánchez Cohen, María del Rosario Salcedo Jacobo, y Ricardo Trejo Calzada. 2017. "Calidad química de agua en un área agrícola de maíz forrajero (*Zea Mays* L.) en la Comarca Lagunera, México." *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 33(1):75–83. doi: 10.20937/RICA.2017.33.01.07.
- Azzouz, A. 2010. "Continuous solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry determination of pharmaceuticals and hormones in water samples." *Journal of Chromatography A* 1217(17):2956–63.
- Azzouz, A, y Evaristo Ballesteros. 2014. "Trace analysis of endocrine disrupting compounds in environmental water samples by use of solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometry detection". *Journal of Chromatography A* 1360:248–57. doi: 10.1016/j.chroma.2014.07.059.
- Azzouz, Abdelmonaim, y Evaristo Ballesteros. 2014a. "Trace analysis of endocrine disrupting compounds in environmental water samples by use of solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometry detection". *Journal of Chromatography A* 1360:248–57. doi: 10.1016/j.chroma.2014.07.059.
- Azzouz, Abdelmonaim, y Evaristo Ballesteros. 2014b. "Trace Analysis of Endocrine Disrupting Compounds in Environmental Water Samples by Use of Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography with Mass Spectrometry Detection". *Journal of Chromatography A* 1360:248–57. doi: 10.1016/j.chroma.2014.07.059.
- Azzouz, Abdelmonaim, y Evaristo Ballesteros. 2016. "Determination of 13 endocrine disrupting chemicals in environmental solid samples using microwave-assisted solvent extraction and continuous solid-phase extraction followed by gas chromatography-mass spectrometry". *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 408(1):231–41. doi: 10.1007/s00216-015-9096-1.
- Basaglia, Giulia, y Maria Chiara Pietrogrande. 2012. "Optimization of a SPME/GC/MS method for the simultaneous determination of pharmaceuticals and personal care products in waters". *Chromatographia* 75(7–8):361–70. doi: 10.1007/s10337-012-2207-7.
- Biel-maeso, Miriam, Carmen Corada-Fernández, y Pablo A. Lara-martín. 2017. "Chemosphere Determining the distribution of pharmaceutically active compounds (PhACs) in soils and sediments by pressurized hot water extraction (PHWE)". *Chemosphere* 185:1001–10. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.07.094.
- Caldas, Sergiane Souza, Caroline Rombaldi, Jean Lucas De Oliveira Arias, Liziane Cardoso Marube, y Ednei Gilberto Primel. 2016. "Multi-residue method for determination of 58 pesticides, pharmaceuticals and personal care products in water using solvent demulsification dispersive liquid-liquid microextraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry". *Talanta* 146:676–88. doi: 10.1016/j.talanta.2015.06.047.

- Calderón, Aarón, Mónica Meraz, y Araceli Tomasini. 2019. "Pharmaceuticals Present in Urban and Hospital Wastewaters in Mexico City". *Journal of Water Chemistry and Technology* 41(2):105–12. doi: 10.3103/S1063455X19020073.
- Calderón-Moreno, Griselda Marissa, Josefina Vergara-Sánchez, Hugo Saldarriaga-Noreña, Maria Luisa García-Betancourt, Martha Lilia Domínguez-Patiño, Gabriela Eleonora Moeller-Chávez, José Gustavo Ronderos-Lara, Mónica Ivonne Arias-Montoya, Iris Janet Montoya-Balbas, y Mario Alfonso Murillo-Tovar. 2019. "Occurrence and risk assessment of steroidal hormones and phenolic endocrine disrupting compounds in surface water in Cuautla River, Mexico". *Water (Switzerland)* 11(12). doi: 10.3390/W11122628.
- Carmona, Eric, y Yolanda Picó. 2018. "The Use of Chromatographic Methods Coupled to Mass Spectrometry for the Study of Emerging Pollutants in the Environment". *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 48(4):305–16. doi: 10.1080/10408347.2018.1430555.
- Casals-Casas, Cristina, y Béatrice Desvergne. 2011. "Endocrine Disruptors: From Endocrine to Metabolic Disruption". *Annual Review of Physiology* 73(1):135–62. doi: 10.1146/annurev-physiol-012110-142200.
- Celiz, Mary D., Jerry Tso, y Diana S. Aga. 2009. "Pharmaceutical metabolites in the environment: Analytical challenges and ecological risks". *Environmental Toxicology and Chemistry* 28(12):2473–84. doi: 10.1897/09-173.1.
- Chacón, Karla Ozuky, Carmelo Pinedo, y Marusia Rentería. 2016. "Evaluación de elementos traza en agua de río y manantial del área minera de Ocampo, Chihuahua, México". *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 32(4):375–84. doi: 10.20937/RICA.2016.32.04.01.
- Cheng, Zhipeng. 2016. "Atmospheric pressure gas chromatography quadrupole-time-of-flight mass spectrometry for simultaneous determination of fifteen organochlorine pesticides in soil and water". *Journal of Chromatography A* 1435:115–24. doi: 10.1016/j.chroma.2016.01.025.
- Chuang, Ya Hui, Yingjie Zhang, Wei Zhang, Stephen A. Boyd, y Hui Li. 2015. "Comparison of accelerated solvent extraction and quick, easy, cheap, effective, rugged and safe method for extraction and determination of pharmaceuticals in vegetables". *Journal of Chromatography A* 1404:1–9. doi: 10.1016/j.chroma.2015.05.022.
- Comisión Nacional del Agua (CONAGUA). 2013. *Inventario nacional de plantas municipales de potabilización y de tratamiento de aguas residuales en operación*. editado por Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). México.
- CONAGUA. 2012. *El saneamiento del río Apatlaco. De lo crítico a lo sustentable*. Primera. México, D.F.: Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales.
- CONAGUA. 2014. *Estadísticas del agua en México*. 2014a ed. editado por CONAGUA. CONAGUA.
- Cruz-López, Arquímedes, René Alberto Dávila-Pórcel, Héctor de León-Gómez, Juan Manuel Rodríguez-Martínez, Santiago I. Suárez-Vázquez, Antonio Cardona-Benavides, Guillermo Javier Castro-Larragoitia, Lorenzo Boreselli, María de Lourdes Villalba, Adán Pinales-Munguía, Humberto Silva-

- Hidalgo, Rodrigo de la Garza, y María del Socorro Espino-Valdés. 2020. "Exploratory study on the presence of bisphenol A and bis(2-ethylhexyl) phthalate in the Santa Catarina River in Monterrey, N.L., Mexico". *Environmental Monitoring and Assessment* 192(8). doi: 10.1007/s10661-020-08446-4.
- Dan Liu, Shengmin Wu, Huaizhou Xu, Qin Zhang, Shenghu Zhang, Lili Shi, Cheng Yao, Yanhua Liu, y Jie Cheng. 2017. "Distribution and Bioaccumulation of Endocrine Disrupting Chemicals in Water, Sediment and Fishes in a Shallow Chinese Freshwater Lake: Implications for Ecological and Human Health Risks". *Ecotoxicology and Environmental Safety* 140:222–29. doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.02.045.
- Dasenaki, Marilena E., y Nikolaos S. Thomaidis. 2015. "Multi-residue determination of 115 veterinary drugs and pharmaceutical residues in milk powder, butter, fish tissue and eggs using liquid chromatography-tandem mass spectrometry". *Analytica Chemical Acta* 880:103–21. doi: 10.1016/j.aca.2015.04.013.
- Daughton, C. G. 2004. "PPCPs in the Environment: Future Research — Beginning with the End Always in Mind". *Pharmaceuticals in the Environment* 463–95. doi: 10.1007/978-3-662-09259-0_33.
- Díaz, Alejandro, y Araceli Peña-Álvarez. 2017. "A Simple Method for the Simultaneous Determination of Pharmaceuticals and Personal Care Products in River Sediment by Ultrasound-Assisted Extraction Followed by Solid-Phase Microextraction Coupled with Gas Chromatography-Mass Spectrometry". *Journal of Chromatographic Science* 55(9):946–53. doi: 10.1093/chromsci/bmx058.
- Díaz-Torres, E., R. Gibson, F. González-Farías, A. E. Zarco-Arista, y M. Mazari-Hiriart. 2013. "Endocrine disruptors in the Xochimilco Wetland, Mexico City". *Water, Air, and Soil Pollution* 224(6):1–11. doi: 10.1007/s11270-013-1586-1.
- Dimpe, K. Mogoldi, y Philiswa N. Nomngongo. 2016a. "Current sample preparation methodologies for analysis of emerging pollutants in different environmental matrices". *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 82:199–207. doi: 10.1016/j.trac.2016.05.023.
- Dimpe, K. Mogoldi, y Philiswa N. Nomngongo. 2016b. "Current Sample Preparation Methodologies for Analysis of Emerging Pollutants in Different Environmental Matrices". *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 82:199–207. doi: 10.1016/j.trac.2016.05.023.
- Donk, Ellen Van, Scott Peacor, Katharina Grosser, Lisette N. De Senerpont Domis, y Miquel Lu. 2016. "Pharmaceuticals May Disrupt Natural Chemical Information Flows and Species Interactions in Aquatic Systems: Ideas and Perspectives on a Hidden Global Change". doi: 10.1007/398.
- Duong, Cuong N., Jin Sung Ra, Jaeweon Cho, Sang D. Kim, Hoon K. Choi, Ji Hyung Park, Kyoung W. Kim, Edu Inam, y Sang Don Kim. 2010. "Estrogenic chemicals and estrogenicity in river waters of South Korea and seven Asian countries". *Chemosphere* 78(3):286–93. doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.10.048.
- Duong, Cuong N., Jin Sung Ra, Jaeweon Cho, Sang D. Kim, Hoon K. Choi, Ji-Hyung Park, Kyoung W. Kim, Edu Inam, y Sang Don Kim. 2010. "Estrogenic Chemicals and Estrogenicity in River Waters of South Korea and Seven Asian Countries". *Chemosphere* 78(3):286–93. doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.10.048.

- Durán-Alvarez, Juan C., Elías Becerril-Bravo, Vanessa Silva Castro, Blanca Jiménez, y Richard Gibson. 2009. "The analysis of a group of acidic pharmaceuticals, carbamazepine, and potential endocrine disrupting compounds in wastewater irrigated soils by gas chromatography-mass spectrometry". *Talanta* 78(3):1159–66. doi: 10.1016/j.talanta.2009.01.035.
- Eggen, Trine, Monika Moeder, y Augustine Arukwe. 2010. "Municipal landfill leachates: A significant source for new and emerging pollutants". *Science of the Total Environment* 408(21):5147–57. doi: 10.1016/j.scitotenv.2010.07.049.
- EPA. 1997. "Ecological Risk Assessment Guidance for Superfund: Process for Designing and Conducting Ecological Risk Assessments". 239.
- EPA. 2005. "EPA-822-R-05-005: Aquatic life ambient water quality criteria nonylphenol." 35.
- EPA. 2011. "EPA-HQ-OPPT-2010-0812-0001 (Testing of Bisphenol A)". Recuperado el 20 de abril de 2017 (<https://www.regulations.gov/document?D=EPA-HQ-OPPT-2010-0812-0001>).
- EPA, United States Environmental Protection Agency. 1997. "Ecological Risk Assessment Guidance for Superfund: Process for Designing and Conducting Ecological Risk Assessments - Interim Final". EPA 540-R-97-006 239.
- Errico, Sonia, Carla Nicolucci, Marina Migliaccio, Valeria Micale, Damiano G. Mita, y Nadia Diano. 2017. "Analysis and occurrence of some phenol endocrine disruptors in two marine sites of the northern coast of Sicily (Italy)". *Marine Pollution Bulletin* 120(1–2):68–74. doi: 10.1016/j.marpolbul.2017.04.061.
- Evans, Sian E., Paul Davies, Anneke Lubben, y Barbara Kasprzyk-Hordern. 2015. "Determination of chiral pharmaceuticals and illicit drugs in wastewater and sludge using microwave assisted extraction, solid-phase extraction and chiral liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry". *Analytical Chemistry* 87(1):112–26. doi: 10.1016/j.aca.2015.03.039.
- Félix-Cañedo, Thania E., Juan C. Durán-Álvarez, y Blanca Jiménez-Cisneros. 2013. "The occurrence and distribution of a group of organic micropollutants in Mexico City's water sources". *Science of the Total Environment* 454–455:109–18. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.02.088.
- Gago-Ferrero, Pablo, Viola Borova, Marilena E. Dasenaki, y Nikolaos S. Thomaidis. 2015. "Simultaneous determination of 148 pharmaceuticals and illicit drugs in sewage sludge based on ultrasound-assisted extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry". *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407(15):4287–97. doi: 10.1007/s00216-015-8540-6.
- Gao, Pei, Zhengyan Li, Mark Gibson, y Huiwang Gao. 2014. "Ecological risk assessment of nonylphenol in coastal waters of China based on species sensitivity distribution model". *Chemosphere* 104:113–19. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.10.076.
- Gibson, Douglas A., y Philippa T. K. Saunders. 2014. "Endocrine Disruption of Oestrogen Action and Female Reproductive Tract Cancers". *Endocrine-Related Cancer* 21(2): T13–31. doi: 10.1530/ERC-13-0342.

- Gibson, Richard. 2007. "Determination of acidic pharmaceuticals and potential endocrine disrupting compounds in wastewaters and spring waters by selective elution and analysis by gas chromatography-mass spectrometry". *Journal of Chromatography A* 1169(1-2):31-39. doi: 10.1016/j.chroma.2007.08.056.
- Gibson, Richard, Juan C. Durán-Álvarez, Karina León Estrada, Alma Chávez, y Blanca Jiménez Cisneros. 2010. "Accumulation and leaching potential of some pharmaceuticals and potential endocrine disruptors in soils irrigated with wastewater in the Tula Valley, Mexico". *Chemosphere* 81(11):1437-45. doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.09.006.
- Giger, Walter, Paul H. Brunner, y Christian Schaffner. 1984. "4-Nonylphenol in Sewage Sludge: Accumulation of Toxic Metabolites from Nonionic Surfactants Abstract." *Science* 390(225):623-25.
- Giulivo, Monica, Miren Lopez de Alda, Ettore Capri, y Damià Barceló. 2016. "Human Exposure to Endocrine Disrupting Compounds: Their Role in Reproductive Systems, Metabolic Syndrome and Breast Cancer. A Review". *Environmental Research* 151:251-64. doi: 10.1016/j.envres.2016.07.011.
- Gomes, Rachel L., Mark D. Scrimshaw, Elise Cartmell, y John N. Lester. 2011. "The Fate of Steroid Estrogens: Partitioning during Wastewater Treatment and onto River Sediments". *Environmental Monitoring and Assessment* 175(1-4):431-41. doi: 10.1007/s10661-010-1541-1.
- Gómez-Álvarez, A., A. Villalba-Atondo, G. Acosta-Ruíz, M. Castañeda-Olivares, y D. Kamp. 2004. "Metales pesados en el agua superficial del Río San Pedro durante 1997 y 1999". *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 20(1):5-12.
- Gong, Jian, Yong Ran, Dainan Zhang, Diyun Chen, Haiyan Li, y Youda Huang. 2019a. "Vertical Profiles and Distributions of Aqueous Endocrine-Disrupting Chemicals in Different Matrices from the Pearl River Delta and the Influence of Environmental Factors". *Environmental Pollution* 246:328-35. doi: 10.1016/j.envpol.2018.12.015.
- Gong, Jian, Yong Ran, Dainan Zhang, Diyun Chen, Haiyan Li, y Youda Huang. 2019b. "Vertical profiles and distributions of aqueous endocrine-disrupting chemicals in different matrices from the Pearl River Delta and the influence of environmental factors". *Environmental Pollution* 246:328-35. doi: 10.1016/j.envpol.2018.12.015.
- Guerrero, Mtra. Alicia Batllori. 2001. "LOS PROBLEMAS ECOLÓGICOS DEL ESTADO DE MORELOS: LA EDUCACIÓN COMO PARTE DE LA SOLUCIÓN". *Gaceta Ecológica* 61:47-60.
- Guerrero-Estévez, S. M., y E. López-López. 2016. "Effects of Endocrine Disruptors on Reproduction in Viviparous Teleosts with Intraluminal Gestation". *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 26(3):563-87. doi: 10.1007/s11160-016-9443-0.
- Gumbi, Bhekumuzi P., Brenda Moodley, Grace Birungi, y Patrick G. Ndungu. 2017. "Assessment of nonsteroidal anti-inflammatory drugs by ultrasonic-assisted extraction and GC-MS in Mgeni and Msunduzi river sediments, KwaZulu-Natal, South Africa". *Environmental Science and Pollution Research* 24(24):20015-28. doi: 10.1007/s11356-017-9653-6.

- Guzmán-Colis, G., F. Thalasso, E. M. Ramírez-López, S. Rodríguez-Narciso, A. L. Guerrero-Barrera, y F. J. Avelar-González. 2011. "Evaluación espacio-temporal de la calidad del agua del río San Pedro en el Estado de Aguascalientes, México". *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental* 27(2):115–27.
- Halket, John M., y Vladimir G. Zaikin. 2003. "Derivatization in mass spectrometry - 1. Silylation". *European Journal of Mass Spectrometry* 9(1):1–21. doi: 10.1255/ejms.527.
- Hallgren, Per, Alice Nicolle, Lars Anders Hansson, Christer Brönmark, Lina Nikoleris, Murtaza Hyder, y Anders Persson. 2014. "Synthetic estrogen directly affects fish biomass and may indirectly disrupt aquatic food webs". *Environmental Toxicology and Chemistry* 33(4):930–36. doi: 10.1002/etc.2528.
- Helenkár, A., Á. Sebk, Gy Záray, I. Molnár-Perl, y A. Vasánits-Zsigrai. 2010. "The role of the acquisition methods in the analysis of the non-steroidal anti-inflammatory drugs in Danube River by gas chromatography-mass spectrometry". *Talanta* 82(2):600–607. doi: 10.1016/j.talanta.2010.05.014.
- Henriques, Marta, Vítor Vale Cardoso, Alexandre Mourão Rodrigues, Elisabete Ferreira, Maria João Benoliel, y Cristina M. M. Almeida. 2010. "Simultaneous Determination of Ten Endocrine Hormone Disrupters in Water Using SPE/LC-(ESI)MS-MS". *Journal of Water Resource and Protection* 02(09):818–29. doi: 10.4236/jwarp.2010.29097.
- Hernández-Quiroz, Manuel, Diego Ruiz-Meza, Francisco Rojo-Callejas, y Claudia Ponce De León-Hill. 2019. "Determination of the distribution of emerging pollutants in interstitial water from wetland sediments through the optimization and validation of an analytical method". *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental* 35(2):407–19. doi: 10.20937/RICA.2019.35.02.12.
- Huang, Bin, Xue Jun Pan, Xing Wan, Jing Liang Liu, Shi Min Zhao, Ping Hu, y Fa Rong Li. 2011. "Simultaneous determination of steroid endocrine disrupting chemicals in water by solid phase extraction-derivatization-gas chromatographic-mass spectrometry". *Fenxi Huaxue/ Chinese Journal of Analytical Chemistry* 39(4):449–54. doi: 10.1016/S1872-2040(10)60431-8.
- Huerta, B., S. Rodríguez-Mozaz, C. Nannou, L. Nakis, A. Ruhí, V. Acuña, S. Sabater, y D. Barcelo. 2016. "Determination of a broad spectrum of pharmaceuticals and endocrine disruptors in biofilm from a wastewater treatment plant-impacted river". *Science of the Total Environment* 540:241–49. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.05.049.
- Jiao, Zhe, Zongning Guo, Suling Zhang, Hongwei Chen, Hongqin Xie, y Shaohan Zeng. 2015. "Novel Extraction for Endocrine Disruptors in Atmospheric Particulate Matter". *Analytical Letters* 48(8):1355–66. doi: 10.1080/00032719.2014.981821.
- Jin, Shiwei, Fangxing Yang, Ying Xu, Heping Dai, y Weiping Liu. 2013a. "Risk Assessment of Xenoestrogens in a Typical Domestic Sewage-Holding Lake in China". *Chemosphere* 93(6):892–98. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.05.037.
- Jin, Shiwei, Fangxing Yang, Ying Xu, Heping Dai, y Weiping Liu. 2013b. "Risk assessment of xenoestrogens in a typical domestic sewage-holding lake in China". *Chemosphere* 93(6):892–98. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.05.037.

- Kabir, Eva Rahman, Monica Sharfin Rahman, y Imon Rahman. 2015. "A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health". *Environmental Toxicology and Pharmacology* 40(1):241–58. doi: 10.1016/j.etap.2015.06.009.
- Kolpin, Dana W., Edward T. Furlong, Michael T. Meyer, E. Michael Thurman, Steven D. Zaugg, Larry B. Barber, y Herbert T. Buxton. 2002. "Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: A national reconnaissance". *Environmental Science and Technology* 36(6):1202–11. doi: 10.1021/es011055j.
- Kumirska, Jolanta, Paulina Łukaszewicz, Magda Caban, Natalia Migowska, Alina Plenis, Anna Białk-Bielińska, Małgorzata Czerwicka, Fei Qi, y Stepnowski Piotr. 2019. "Determination of twenty pharmaceutical contaminants in soil using ultrasound-assisted extraction with gas chromatography-mass spectrometric detection". *Chemosphere* 232:232–42. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.05.164.
- Kumirska, Jolanta, Alina Plenis, Paulina Łukaszewicz, Magda Caban, Natalia Migowska, Anna Białk-Bielińska, Małgorzata Czerwicka, y Piotr Stepnowski. 2013a. "Chemometric Optimization of Derivatization Reactions Prior to Gas Chromatography–Mass Spectrometry Analysis". *Journal of Chromatography A* 1296:164–78. doi: 10.1016/j.chroma.2013.04.079.
- Kumirska, Jolanta, Alina Plenis, Paulina Łukaszewicz, Magda Caban, Natalia Migowska, Anna Białk-Bielińska, Małgorzata Czerwicka, y Piotr Stepnowski. 2013b. "Chemometric optimization of derivatization reactions prior to gas chromatography-mass spectrometry analysis". *Journal of Chromatography A* 1296:164–78. doi: 10.1016/j.chroma.2013.04.079.
- Kummerer, K. 2011. 3.04—Emerging contaminants. *Treatise on Water Science*. Oxford: Elsevier, 69-87.
- Lesser, Luis E., Abraham Mora, Cristina Moreau, Jürgen Mahlke, Arturo Hernández-Antonio, Aldo I. Ramírez, y Héctor Barrios-Piña. 2018. "Survey of 218 organic contaminants in groundwater derived from the world's largest untreated wastewater irrigation system: Mezquital Valley, Mexico". *Chemosphere* 198:510–21. doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.01.154.
- Li, Yan, Jie Ding, Luyan Zhang, Xianshu Liu, y Guangyuan Wang. 2019. "Occurrence and ranking of pharmaceuticals in the major rivers of China". *Science of the Total Environment* 696:133991. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.133991.
- Liu, Dan, Jining Liu, Min Guo, Huaizhou Xu, Shenghu Zhang, Lili Shi, y Cheng Yao. 2016. "Occurrence, distribution, and risk assessment of alkylphenols, bisphenol A, and tetrabromobisphenol A in surface water, suspended particulate matter, and sediment in Taihu Lake and its tributaries". *Marine Pollution Bulletin* 112(1–2):142–50. doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.08.026.
- Löffler, Dirk, y Thomas A. Ternes. 2003. "Determination of Acidic Pharmaceuticals, Antibiotics and Ivermectin in River Sediment Using Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry". *Journal of Chromatography A* 1021(1–2):133–44. doi: 10.1016/j.chroma.2003.08.089.
- López-Darias, Jessica, Mónica Germán-Hernández, Verónica Pino, y Ana M. Afonso. 2010. "Dispersive liquid-liquid microextraction versus single-drop microextraction for the determination of several endocrine-disrupting phenols from seawaters". *Talanta* 80(5):1611–18. doi: 10.1016/j.talanta.2009.09.057.

- López-Roldán, Ramón, Miren López de Alda, Meritxell Gros, Mira Petrovic, Jordi Martín-Alonso, y Damià Barceló. 2010. "Advanced Monitoring of Pharmaceuticals and Estrogens in the Llobregat River Basin (Spain) by Liquid Chromatography–Triple Quadrupole-Tandem Mass Spectrometry in Combination with Ultra Performance Liquid Chromatography–Time of Flight-Mass Spectrometry". *Chemosphere* 80(11):1337–44. doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.06.042.
- López-Serna, Rebeca, Sandra Pérez, Antoni Ginebreda, Mira Petrović, y Dami Barceló. 2010. "Fully automated determination of 74 pharmaceuticals in environmental and waste waters by online solid phase extraction-liquid chromatography- electrospray-tandem mass spectrometry". *Talanta* 83(2):410–24. doi: 10.1016/j.talanta.2010.09.046.
- López-Velázquez, Khirbet, Jorge L. Guzmán-Mar, Hugo A. Saldarriaga-Noreña, Mario A. Murillo-Tovar, Laura Hinojosa-Reyes, y Minerva Villanueva-Rodríguez. 2021. "Occurrence and seasonal distribution of five selected endocrine-disrupting compounds in wastewater treatment plants of the Metropolitan Area of Monterrey, Mexico: The role of water quality parameters". *Environmental Pollution* 269. doi: 10.1016/j.envpol.2020.116223.
- Lu, G. H., W. T. Song, C. Wang, y Z. H. Yan. 2010. "Assessment of in vivo estrogenic response and the identification of environmental estrogens in the Yangtze River (Nanjing section)". *Chemosphere* 80(9):982–90. doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.05.038.
- Luis, Sílvia, Maria Luísa Lima, Lucía Poggio, Juan Ignacio Aragonés, Audrey Courtier, Benoit Roig, y Carole Blanchard. 2020. "Lay people and experts' risk perception of pharmaceuticals in the environment in Southwestern Europe". *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 117(February). doi: 10.1016/j.yrtph.2020.104783.
- Magnusson, B., y U. Örnemark. 2014. "Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (2nd ed. 2014)". Recuperado (<http://www.eurachem.org/>).
- Maldaner, Liane, y Isabel C. S. F. Jardim. 2012. "Determination of some organic contaminants in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry". *Talanta* 100:38–44. doi: 10.1016/j.talanta.2012.08.006.
- Mancilla-Villa, Óscar Raúl, Héctor Manuel Ortega-Escobar, Carlos Ramírez-Ayala, Rosalía Ramos-Bello, y Amada Laura Reyes-Ortigoza. 2012. "Metales pesados totales y arsénico en el agua para riego de Puebla y Veracruz, México". *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 28(1):39–48.
- Marsik, Petr, Jan Rezek, Monika Židková, Barbora Kramulová, Jan Tauchen, y Tomáš Vaněk. 2017. "Non-steroidal anti-inflammatory drugs in the watercourses of Elbe basin in Czech Republic". *Chemosphere* 171:97–105. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.12.055.
- Martínez-Moral, María P., y María T. Tena. 2011. "Focused ultrasound solid-liquid extraction and selective pressurised liquid extraction to determine bisphenol A and alkylphenols in sewage sludge by gas chromatography-mass spectrometry". *Journal of Separation Science* 34(18):2513–22. doi: 10.1002/jssc.201100159.

- Melo, Suzyéth M., y Natilene M. Brito. 2014. "Analysis and occurrence of endocrine disruptors in Brazilian water by HPLC-fluorescence detection". *Water, Air, and Soil Pollution* 225(1). doi: 10.1007/s11270-013-1783-y.
- Mijangos, L., E. Bizkarguenaga, A. Prieto, L. A. Fernández, y O. Zuloaga. 2015. "Simultaneous determination of a variety of endocrine disrupting compounds in carrot, lettuce and amended soil by means of focused ultrasonic solid-liquid extraction and dispersive solid-phase extraction as simplified clean-up strategy". *Journal of Chromatography A* 1389:8–18. doi: 10.1016/j.chroma.2015.02.036.
- Miller, James N., y Jane C. Miller. 2002. *Estadística y quimiometría para química analítica*. 4a edición. Pearson Prentice Hall.
- Mishalanie, Elizabeth A., Barry Lesnik, Roy Araki, y Robin Segall. 2016. "Validation and peer review of US Environmental Protection Agency chemical methods analysis." 1–23. Recuperado (<https://www.epa.gov/measurements-modeling/method-validation-and-peer-review-policies-and-guidelines>).
- Moeller-Chávez, G., Luis Seguí-Amórtequi, O. Alfranca-Burriel, V. Escalante-Estrada, F. Pozo-Román, y A. Rivas-Hernández. 2004. "Water reuse in the Apatlaco River Basin (México): A feasibility study". *Water Science and Technology* 50(2):329–37. doi: 10.2166/wst.2004.0149.
- Mohd Amin, M. F., S. G. J. Heijman, y L. C. Rietveld. 2016. "Clay–Starch Combination for Micropollutants Removal from Wastewater Treatment Plant Effluent". *Water Science and Technology* 73(7):1719–27. doi: 10.2166/wst.2016.001.
- Monneret, Claude. 2017. "What Is an Endocrine Disruptor?" *Comptes Rendus Biologies* 340(9–10):403–5. doi: 10.1016/j.crvi.2017.07.004.
- Murillo-Torres, Rosa, Juan C. Durán-Álvarez, y Blanca Jiménez-Cisneros. 2012. "Retención de 4-nonilfenol y di(2-etilhexil) ftalato en suelos del Valle de Tula, Hidalgo, México". 14.
- Naldi, A. C., P. B. Fayad, M. Prévost, y S. Sauvé. 2016. "Analysis of steroid hormones and their conjugated forms in water and urine by on-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry". *Chemistry Central Journal* 10(1):1–17. doi: 10.1186/s13065-016-0174-z.
- Nieto, Antonio, Francesc Borrull, Eva Pocurull, y Rosa Maria Marcé. 2010. "Pressurized liquid extraction: A useful technique to extract pharmaceuticals and personal-care products from sewage sludge". *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 29(7):752–64. doi: 10.1016/j.trac.2010.03.014.
- NMX-AA-112-1995 - SCFI. 1996. "Análisis de agua y sedimentos - evaluación de toxicidad aguda con photobacterium phosphoreum - método de prueba".
- OECD. 2013. *Getting It Right Una Agenda Estratégica Para las Reformas en México (An Strategic Agenda for the Mexican Reforms)*. México.
- Ohoru, C. R., A. O. Adeniji, A. I. Okoh, y O. O. Okoh. 2019. "Distribution and chemical analysis of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the environmental systems: A review".

International Journal of Environmental Research and Public Health 16(17). doi: 10.3390/ijerph16173026.

Patel, N., MD. Z. A. Khan, S. Shahane, D. Rai, D. Chauhan, C. Kant, y V. K. Chaudhary. 2020. "Emerging Pollutants in Aquatic Environment: Source, Effect, and Challenges in Biomonitoring and Bioremediation- A Review". *Pollution* 6(1). doi: 10.22059/poll.2019.285116.646.

Patrolecco, Luisa, Nicoletta Ademollo, Paola Grenni, Antonella Tolomei, Anna Barra Caracciolo, y Silvio Capri. 2013. "Simultaneous determination of human pharmaceuticals in water samples by solid phase extraction and HPLC with UV-fluorescence detection". *Microchemical Journal* 107:165–71. doi: 10.1016/j.microc.2012.05.035.

Peña-Álvarez, Araceli, y Alejandra Castillo-Alanís. 2015. "Identificación y cuantificación de contaminantes emergentes en aguas residuales por microextracción en fase sólida-cromatografía de gases-espectrometría de masas (MEFS-CG-EM)". *Tip* 18(1):29–42. doi: 10.1016/j.recqb.2015.05.003.

Pignotti, Emanuela, y Enrico Dinelli. 2018. "Distribution and partition of endocrine disrupting compounds in water and sediment: Case study of the Romagna area (North Italy)". *Journal of Geochemical Exploration* 195(July 2017):66–77. doi: 10.1016/j.gexplo.2018.02.008.

Prados, Julien, Ludwig Stenz, Emmanuel Somm, Christelle Stouder, Alexandre Dayer, y Ariane Paoloni-Giacobino. 2015. "Prenatal Exposure to DEHP Affects Spermatogenesis and Sperm DNA Methylation in a Strain-Dependent Manner" editado por W. Shen. *PLOS ONE* 10(8): e0132136. doi: 10.1371/journal.pone.0132136.

Praveena, Sarva Mangala, Tang Seok Lui, Nur'Aqilah Hamin, Siti Quistina Noorain Abdul Razak, y Ahmad Zaharin Aris. 2016. "Occurrence of Selected Estrogenic Compounds and Estrogenic Activity in Surface Water and Sediment of Langat River (Malaysia)". *Environmental Monitoring and Assessment* 188(7):442. doi: 10.1007/s10661-016-5438-5.

Prosser, Ryan S., Stefan Trapp, y Paul K. Sibley. 2014. "Modeling uptake of selected pharmaceuticals and personal care products into food crops from biosolids-amended soil". *Environmental Science and Technology* 48(19):11397–404. doi: 10.1021/es503067v.

Ramis-Ramos, Guillermo, y Ma. Celia Garcia-Álvarez-Coque. 2001. *Quimiometría*. 1a ed. España: Síntesis.

Rashid H, Alqahtani SS, Alshahrani S. 2020. "Diet: A Source of Endocrine Disruptors." *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 20(5):633–45. doi: 10.2174/1871530319666191022100141.

Reichert, Gabriela, Stephan Hilgert, Stephan Fuchs, y Júlio César Rodrigues Azevedo. 2019. "Emerging Contaminants and Antibiotic Resistance in the Different Environmental Matrices of Latin America". *Environmental Pollution* 255:113140. doi: 10.1016/j.envpol.2019.113140.

Rivera-Jaimes, José Abraham, Cristina Postigo, Rosa María Melgoza-Alemán, Jaume Aceña, Damia Barceló, y Miren López de Alda. 2018. "Study of pharmaceuticals in surface and wastewater from Cuernavaca, Morelos, Mexico: Occurrence and environmental risk assessment". *Science of the Total Environment* 613–614:1263–74. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.09.134.

- Rocha, Maria João, Catarina Cruzeiro, Mário Reis, Miguel Ângelo Pardal, y Eduardo Rocha. 2015. "Toxicological relevance of endocrine disruptors in the Tagus River estuary (Lisbon, Portugal)". *Environmental Monitoring and Assessment* 187(8). doi: 10.1007/s10661-015-4679-z.
- Ronderos-Lara, José Gustavo, Hugo Saldarriaga-Noreña, Mario Alfonso Murillo-Tovar, y Josefina Vergara-Sánchez. 2018. "Optimization and application of a gc-ms method for the determination of endocrine disruptor compounds in natural water". *Separations* 5(3). doi: 10.3390/separations5020033.
- Rose, Emily, Kimberly A. Paczolt, y Adam G. Jones. 2013. "The effects of synthetic estrogen exposure on pre mating and post mating episodes of selection in sex-role-reversed Gulf pipefish". doi: 10.1111/eva.12093.
- Ruhí, Albert, Vicenç Acuña, Damià Barceló, Belinda Huerta, Jordi Rene Mor, Sara Rodríguez-Mozaz, y Sergi Sabater. 2016. "Bioaccumulation and trophic magnification of pharmaceuticals and endocrine disruptors in a Mediterranean river food web". *Science of the Total Environment* 540:250–59. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.06.009.
- Ruhí, Albert, Vicenç Acuña, Damià Barceló, Belinda Huerta, Jordi-Rene Mor, Sara Rodríguez-Mozaz, y Sergi Sabater. 2016. "Bioaccumulation and Trophic Magnification of Pharmaceuticals and Endocrine Disruptors in a Mediterranean River Food Web". *Science of The Total Environment* 540:250–59. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.06.009.
- SAGARPA. 2017. Guía de validación de métodos para el análisis de residuos de plaguicidas en productos vegetales por espectrometría de masas/masas.
- Salea, Rinaldi, Bambang Veriansyah, y Raymond R. Tjandrawinata. 2017. "Optimization and Scale-up Process for Supercritical Fluids Extraction of Ginger Oil from Zingiber Officinale Var. Amarum". *The Journal of Supercritical Fluids* 120:285–94. doi: 10.1016/j.supflu.2016.05.035.
- Salgueiro-González, N., I. Turnes-Carou, V. Besada, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, y D. Prada-Rodríguez. 2015. "Occurrence, Distribution and Bioaccumulation of Endocrine Disrupting Compounds in Water, Sediment and Biota Samples from a European River Basin". *Science of The Total Environment* 529:121–30. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.05.048.
- Salla, Raquel F., Fernando U. Gamero, Rafael Z. Rissoli, Samuel E. Dal-Medico, Luciano Mendes Castanho, Cleoni dos Santos Carvalho, Elaine C. M. Silva-Zacarin, Ana L. Kalinin, Fabio C. Abdalla, y Monica J. Costa. 2016. "Impact of an environmental relevant concentration of 17 α -ethinylestradiol on the cardiac function of bullfrog tadpoles". *Chemosphere* 144:1862–68. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.10.042.
- Samaras, Vasilios G., Nikolaos S. Thomaidis, Athanasios S. Stasinakis, y Themistokles D. Lekkas. 2011. "An analytical method for the simultaneous trace determination of acidic pharmaceuticals and phenolic endocrine disrupting chemicals in wastewater and sewage sludge by gas chromatography-mass spectrometry". *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 399(7):2549–61. doi: 10.1007/s00216-010-4607-6.
- Sanchez, Juan M. 2018. "Estimating detection limits in chromatography from calibration data: Ordinary least squares regression vs. weighted least squares". *Separations* 5(4). doi: 10.3390/separations5040049.

- SCHER (Scientific Committee on Health and Environmental Risks). 2011a. "Opinion on draft environmental quality standards under the Water Framework Directive – 17 β -estradiol".
- SCHER (Scientific Committee on Health and Environmental Risks). 2011b. Opinion on draft environmental quality standards under the Water Framework Directive – Ethinylestradiol.
- Schmidt, Wiebke, y Clare H. Redshaw. 2015. "Evaluation of Biological Endpoints in Crop Plants after Exposure to Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs): Implications for Phytotoxicological Assessment of Novel Contaminants". *Ecotoxicology and Environmental Safety* 112:212–22. doi: 10.1016/j.ecoenv.2014.11.008.
- Schummer, Claude, Olivier Delhomme, Brice M. R. Appenzeller, Robert Wennig, y Maurice Millet. 2009. "Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis". *Talanta* 77(4):1473–82. doi: 10.1016/j.talanta.2008.09.043.
- Sebok, Á., A. Vasanits-Zsigrai, Gy Palkó, Gy Záray, y I. Molnár-Perl. 2008. "Identification and quantification of ibuprofen, naproxen, ketoprofen and diclofenac present in waste-waters, as their trimethylsilyl derivatives, by gas chromatography mass spectrometry". *Talanta* 76(3):642–50. doi: 10.1016/j.talanta.2008.04.008.
- Sghaier, Rafika Ben, Sopheak Net, Ibtissem Ghorbel-Abid, Salma Bessadok, Maiwen Le Coz, Dalila Ben Hassan-Chehimi, Malika Trabelsi-Ayadi, Michele Tackx, y Baghdad Ouddane. 2017. "Simultaneous Detection of 13 Endocrine Disrupting Chemicals in Water by a Combination of SPE-BSTFA Derivatization and GC-MS in Transboundary Rivers (France-Belgium)". *Water, Air, and Soil Pollution* 228(1). doi: 10.1007/s11270-016-3195-2.
- Shareef, Ali, Michael J. Angove, y John D. Wells. 2006. "Optimization of silylation using N-methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide, N,O-bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide and N-(tert-butyltrimethylsilyl)-N-methyltrifluoroacetamide for the determination of the estrogens estrone and 17 α -ethinylestradio". *Journal of Chromatography A* 1108(1):121–28. doi: 10.1016/j.chroma.2005.12.098.
- Solís, C., J. Sandoval, H. Pérez-Vega, y M. Mazari-Hiriart. 2006. "Irrigation water quality in southern Mexico City based on bacterial and heavy metal analyses". *Beam Interactions with Matter & Atoms* 249:592–95. doi: 10.1016/j.nimb.2006.03.062.
- Swartz, Christopher H., Sharanya Reddy, Mark J. Benotti, Haifei Yin, Larry B. Barber, Bruce J. Brownawell, y Ruthann A. Rudel. 2006. "Steroid estrogens, nonylphenol ethoxylate metabolites, and other wastewater contaminants in groundwater affected by a residential septic system on cape cod, MA". *Environmental Science and Technology* 40(16):4894–4902. doi: 10.1021/es052595+.
- Tadeo, José, Consuelo Sánchez-Brunete, Beatriz Albero, Ana García-Valcárcel, y Rosa Pérez. 2012. "Analysis of Emerging Organic Contaminants in Environmental Solid Samples". *Open Chemistry* 10(3):480–520. doi: 10.2478/s11532-011-0157-9.
- Tan, Ruijie, Ruixia Liu, Bin Li, Xiaoling Liu, y Zongsheng Li. 2018a. "Typical Endocrine Disrupting Compounds in Rivers of Northeast China: Occurrence, Partitioning, and Risk Assessment". *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 75(2):213–23. doi: 10.1007/s00244-017-0482-x.

- Tan, Ruijie, Ruixia Liu, Bin Li, Xiaoling Liu, y Zongsheng Li. 2018b. "Typical Endocrine Disrupting Compounds in Rivers of Northeast China: Occurrence, Partitioning, and Risk Assessment". *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 75(2):213–23. doi: 10.1007/s00244-017-0482-x.
- Tasho, Reep Pandi, y Jae Yong Cho. 2016. "Veterinary Antibiotics in Animal Waste, Its Distribution in Soil and Uptake by Plants: A Review". *Science of The Total Environment* 563–564:366–76. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.04.140.
- Ternes, Thomas A., Henrik Andersen, Daniel Gilberg, y Matthias Bonerz. 2002. "Determination of Estrogens in Sludge and Sediments by Liquid Extraction and GC/MS/MS". *Analytical Chemistry* 74(14):3498–3504. doi: 10.1021/ac015717z.
- Thompson, Michael, Stephen L. R. Ellison, y Roger Wood. 2002. *Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report)*. Vol. 74. doi: 10.1351/pac200274050835.
- Thurman, E. Michael. 1998. *Solid Phase Extraction*. United States of America: A Wiley-Interscience Publications.
- Tijani, Jimoh O., Ojo O. Fatoba, Omotola O. Babajide, y Leslie F. Petrik. 2016. "Pharmaceuticals, Endocrine Disruptors, Personal Care Products, Nanomaterials and Perfluorinated Pollutants: A Review". *Environmental Chemistry Letters* 14(1):27–49. doi: 10.1007/s10311-015-0537-z.
- Toppari, Jorma, Anne Maarit Haavisto, y Markku Alanen. 2002. *Changes in male reproductive health and effects of endocrine disruptors in Scandinavian countries*. Vol. 18. doi: 10.1590/S0102-311X2002000200005.
- Valcárcel, Y., S. González Alonso, J. L. Rodríguez-Gil, A. Castaño, J. C. Montero, J. J. Criado-Alvarez, I. J. Mirón, y M. Catalá. 2013. "Seasonal variation of pharmaceutically active compounds in surface (Tagus River) and tap water (Central Spain)". *Environmental Science and Pollution Research* 20(3):1396–1412. doi: 10.1007/s11356-012-1099-2.
- Valles-Aragón, María Cecilia, Dámaris Leopoldina Ojeda-Barrios, Víctor Manuel Guerrero-Prieto, Jesús Alejandro Prieto-Amparan, y Esteban Sánchez-Chávez. 2017. "Calidad del agua para riego en una zona nogalera del Estado de Chihuahua". *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 33(1):85–97. doi: 10.20937/RICA.2017.33.01.08.
- Vargas-Berrones, Karla, Lorena Díaz de León-Martínez, Luis Bernal-Jácome, Maribel Rodríguez-Aguilar, Alfredo Ávila-Galarza, y Rogelio Flores-Ramírez. 2020. "Rapid analysis of 4-nonylphenol by solid phase microextraction in water samples". *Talanta* 209(November):120546. doi: 10.1016/j.talanta.2019.120546.
- Vega-Morales, T., Z. Sosa-Ferrera, y J. J. Santana-Rodríguez. 2013. "Evaluation of the presence of endocrine-disrupting compounds in dissolved and solid wastewater treatment plant samples of Gran Canaria Island (Spain)". *BioMed Research International* 2013. doi: 10.1155/2013/790570.
- Verenitch, Sergei S., Christopher J. Lowe, y Asit Mazumder. 2006. "Determination of acidic drugs and caffeine in municipal wastewaters and receiving waters by gas chromatography-ion trap tandem mass

spectrometry". *Journal of Chromatography A* 1116(1–2):193–203. doi: 10.1016/j.chroma.2006.03.005.

Vilela, Caren Leite Spindola, João Paulo Bassin, y Raquel Silva Peixoto. 2018. "Water contamination by endocrine disruptors: Impacts, microbiological aspects and trends for environmental protection". *Environmental Pollution* 235:546–59. doi: 10.1016/j.envpol.2017.12.098.

Villarreal-Morales, Romeo, Laura Hinojosa-Reyes, Aracely Hernández-Ramírez, Edgar Ruíz-Ruíz, María de Lourdes Maya Treviño, y Jorge Luis Guzmán-Mar. 2020. "Automated SPE-HPLC-UV methodology for the on-line determination of plasticisers in wastewater samples". *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 0(0):1–14. doi: 10.1080/03067319.2020.1742891.

Wagner, Martin, y Jörg Oehlmann. 2011. "Endocrine disruptors in bottled mineral water: Estrogenic activity in the E-Screen". *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 127(1–2):128–35. doi: 10.1016/j.jsbmb.2010.10.007.

Wang, Li, Guang-Guo Ying, Jian-Liang Zhao, Shan Liu, Bin Yang, Li-Jun Zhou, Ran Tao, y Hao-Chang Su. 2011. "Assessing Estrogenic Activity in Surface Water and Sediment of the Liao River System in Northeast China Using Combined Chemical and Biological Tools". *Environmental Pollution* 159(1):148–56. doi: 10.1016/j.envpol.2010.09.017.

Wang, Wenfeng, Anne Wairimu Ndungu, y Jun Wang. 2016. "Monitoring of Endocrine-Disrupting Compounds in Surface Water and Sediments of the Three Gorges Reservoir Region, China". *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 71(4):509–17. doi: 10.1007/s00244-016-0319-z.

Watanabe, Naoko, Brian A. Bergamaschi, Keith A. Loftin, Michael T. Meyer, y Thomas Harter. 2010. "Use and environmental occurrence of antibiotics in freestall dairy farms with manured forage fields". *Environmental Science and Technology* 44(17):6591–6600. doi: 10.1021/es100834s.

Waters. 2021. "Productos Oasis para extracción de muestras | Waters". Recuperado el 29 de octubre de 2021 (https://www.waters.com/waters/es_MX/Oasis-Sample-Extraction-Products/nav.htm?cid=513209&locale=es_MX).

Xiong, Lin, Ping Yan, Min Chu, Ya Qin Gao, Wei Hong Li, y Xiao Ling Yang. 2018. "A rapid and simple HPLC–FLD screening method with QuEChERS as the sample treatment for the simultaneous monitoring of nine bisphenols in milk". *Food Chemistry* 244:371–77. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.10.030.

Xu, Jian, Ping Wang, Weifeng Guo, Junxing Dong, Lei Wang, y Shugui Dai. 2006. "Seasonal and spatial distribution of nonylphenol in Lanzhou Reach of Yellow River in China". *Chemosphere* 65(9):1445–51. doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.04.042.

Yang, Oneyeol, Hye Lim Kim, Jong-Il Weon, y Young Rok Seo. 2015. "Endocrine-disrupting Chemicals: Review of Toxicological Mechanisms Using Molecular Pathway Analysis". *Journal of Cancer Prevention* 20(1):12–24. doi: 10.15430/jcp.2015.20.1.12.

Yu, Zirui, Sigrid Peldszus, y Peter M. Huck. 2007. "Optimizing gas chromatographic-mass spectrometric analysis of selected pharmaceuticals and endocrine-disrupting substances in water using factorial

- experimental design". *Journal of Chromatography A* 1148(1):65–77. doi: 10.1016/j.chroma.2007.02.047.
- Yuan, Xuyin, Tianyuan Li, Ling Zhou, y Xueqiang Zhao. 2014. "Characteristics and Risk Assessment of Estrogenic Compounds in Rivers of Southern Jiangsu Province, China". *IERI Procedia* 9:176–84. doi: 10.1016/j.ieri.2014.09.059.
- Zha, Jinmiao, Liwei Sun, Yiqi Zhou, Philip A. Spear, Mei Ma, y Zijian Wang. 2008. "Assessment of 17 α -ethinylestradiol effects and underlying mechanisms in a continuous, multigeneration exposure of the Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*)". *Toxicology and Applied Pharmacology* 226(3):298–308. doi: 10.1016/j.taap.2007.10.006.
- Zhang, Zifeng, Nanqi Ren, Kurunthachalam Kannan, Jun Nan, Liyan Liu, Wanli Ma, Hong Qi, y Yifan Li. 2014. "Occurrence of endocrine-disrupting phenols and estrogens in water and sediment of the Songhua River, Northeastern China". *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 66(3):361–69. doi: 10.1007/s00244-014-9998-5.
- Zhao, Jian Liang, Guang Guo Ying, Li Wang, Ji Feng Yang, Xiao Bing Yang, Li Hua Yang, y Xu Li. 2009. "Determination of phenolic endocrine disrupting chemicals and acidic pharmaceuticals in surface water of the Pearl Rivers in South China by gas chromatography-negative chemical ionization-mass spectrometry". *Science of the Total Environment* 407(2):962–74. doi: 10.1016/j.scitotenv.2008.09.048.
- Zhao, Jian Liang, Guang Guo Ying, Bin Yang, Shan Liu, Li Jun Zhou, Zhi Feng Chen, y Hua Jie Lai. 2011. "Screening of multiple hormonal activities in surface water and sediment from the Pearl River system, South China, using effect-directed in vitro bioassays". *Environmental Toxicology and Chemistry* 30(10):2208–15. doi: 10.1002/etc.625.
- Zhao, Xiaomin, Kassandra L. Grimes, Lisa M. Colosi, y Wu Seng Lung. 2019. "Attenuation, transport, and management of estrogens: A review". *Chemosphere* 230:462–78. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.05.086.
- ZHOU, Yi qi, Zi jian WANG, y Ning JIA. 2007. "Formation of multiple trimethylsilyl derivatives in the derivatization of 17 α -ethinylestradiol with BSTFA or MSTFA followed by gas chromatography-mass spectrometry determination". *Journal of Environmental Sciences* 19(7):879–84. doi: 10.1016/S1001-0742(07)60146-6.