



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



Facultad de Ciencias Químicas
Centro de Química del ICUAP
Laboratorio de Adsorción y Cromatografía

“Extracción y detección de bajas concentraciones de estrógenos en
muestras sólidas”

TESIS

Para obtener el grado de
Licenciado en Química

PRESENTA

Alexis Andrei Moreno Ayala

DIRECTORA

Dra. Lidia Esmeralda García Díaz

ASESORA INTERNA

Dra. María Ana Pérez Cruz

Puebla, Puebla.

Junio 2021

*“No es el conocimiento, sino el acto de aprendizaje; y no la posesión,
sino el acto de llegar allí, lo que nos concede el mayor disfrute”*

Carl Friedrich Gauss

Agradecimientos

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por brindarme cobijo durante mi estancia en ella y por proporcionar todas las condiciones para que me forjara como profesionista.

A la Dra. Lidia Esmeralda García Díaz, por su valioso tiempo y dedicación para compartirme sus conocimientos desde el primer día en que inicié este proyecto, así como por su acertada dirección.

A la Dra. María de la Paz Elizalde González, por abrirme las puertas de su laboratorio para aprender y ganar experiencia para mi formación como profesional.

A los integrantes de mi comisión revisora y miembros del jurado, por sus valiosas aportaciones durante la revisión final de este escrito:

Dra. María de la Paz Elizalde González	Instituto de Ciencias BUAP
----------------------------------------	----------------------------

Dra. María Ana Pérez Cruz	Facultad de Ciencias Químicas
---------------------------	-------------------------------

Dr. Sergio Alberto Sabinas Hernández	Instituto de Física BUAP
--------------------------------------	--------------------------

A todos los integrantes del laboratorio de Adsorción y Cromatografía que estuvieron durante mi estancia, por su compañerismo y amenidad en las horas de trabajo.

Al laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, por permitirme ocupar su centrifuga para tratar mis muestras y por el apoyo para el manejo del equipo.

A mis amigos: Aldemar, Alexa, Andrea, Ángel, Areli, Ayumi, Daniela, Edgar, Emanuel, Emiliano, Fernanda, Francisco, Guadalupe, Isabel, Janelli, Joel, Jonathan, María de Jesús, Omar, Pablo, Patricia, Salma, Sandra y Sara, por las innumerables risas e invaluable momentos de alegría a lo largo de estos años.

Dedicatoria

A mi madre, Amparo, quien, siempre con un inconmensurable amor y una profunda dedicación, me ha cuidado, educado y dado su apoyo absoluto en cada etapa de mi vida.

A mi padre, Roberto, quien me ha insuflado el placer de buscar y descubrir respuestas.

A mis abuelos, Amparo y Francisco, que a cada minuto de mi existencia me han llenado con su inmenso cariño y delicados cuidados.

A mis hermanos, Alaíde y Roberto, por estar a mi lado día a día respaldándome, aconsejándome y creando instantes inolvidables de enorme felicidad.

A Fernanda, porque, desde el primer segundo en que entró a mi vida, no ha hecho más que enriquecer cada aspecto con su amor y calidez. Porque, para mí, no hay una mejor compañía en toda la vastedad de la eternidad.

Índice

Resumen.....	vii
Objetivos.....	1
Hipótesis	2
Justificación	3
Introducción	4
1.1 Fundamentos de la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC).....	4
1.2 Estrógenos	14
1.3 Antecedentes	17
Metodología	19
2.1 Análisis de muestras de cascarón de huevo	20
2.2 Evaporación de disolvente al vacío.....	20
2.3 Extracción en fase sólida.....	21
2.4 Preparación de las disoluciones estándar	23
2.5 Desarrollo del método cromatográfico para la detección de estrógenos.....	24
2.6 Validación del método cromatográfico.....	30
Resultados y discusión.....	35
3.1 Análisis de muestras de cascarón de huevo	35
3.2 Extracción en fase sólida.....	37
3.3 Espectros de absorción de los estrógenos	38
3.4 Análisis por cromatografía de líquidos	40
3.5 Validación del método cromatográfico en columna semi-micro	44
Conclusiones	49
Referencias.....	50

Índice de figuras

Figura 1. Representación de la interacción de los analitos con la fase estacionaria de la columna cromatográfica.	6
Figura 2. Estructura molecular de una fase estacionaria C18 de fase reversa donde el sílice está enlazado a un octadecilsilano mediante un enlace siloxano.	8
Figura 3. Representación de los pasos de la extracción en fase sólida.	11
Figura 4. Esquema general de trabajo.	19
Figura 5. Sistema al vacío para la evaporación de metanol de la muestra.	21
Figura 6. Sistema de extracción en fase sólida al vacío.	22
Figura 7. Cromatogramas, obtenidos con el método cromatográfico en columna semi-micro, de las muestras de cascarón de huevo y de los cuatro estrógenos de estudio en mezcla.	35
Figura 8. Espectros de absorción en la región ultravioleta del espectro electromagnético de los cuatro estrógenos de estudio.	39
Figura 9. Cromatograma de los cuatro estrógenos obtenido con las condiciones del método cromatográfico en columna semi-micro.	40
Figura 10. Cromatograma de la mezcla de E2 y EE2 obtenido con el método cromatográfico en columna convencional.	43
Figura 11. Cromatogramas de los cuatro estrógenos inyectados individualmente y en mezcla obtenidos con el método cromatográfico en columna semi-micro.	45
Figura 12. Curvas de calibración correspondientes a los cuatro estrógenos obtenidas por el método cromatográfico en columna semi-micro.	46

Índice de tablas

Tabla 1. Interacciones de sorción y su mecanismo de retención [2].	7
Tabla 2. Condiciones de operación para el método cromatográfico en columna semi-micro.....	25
Tabla 3. Condiciones de operación del método cromatográfico en columna convencional.....	26
Tabla 4. Picos de interés de las muestras de cascarones de huevo de las marcas analizadas.	36
Tabla 5. Porcentaje de recuperación para la extracción en fase solida de cada uno de los cuatro estrógenos para las dos composiciones.....	37
Tabla 6. Parámetros de la prueba de aptitud del sistema del método cromatográfico en columna semi-micro.	41
Tabla 7. Parámetros de la prueba de aptitud del sistema del método cromatográfico en columna convencional.	43
Tabla 8. Parámetros para la validación obtenidos para el método cromatográfico en columna semi-micro.	47

Resumen

Los estrógenos son hormonas biológicamente activas y en los últimos años se han convertido en un contaminante emergente. Los estrógenos pueden actuar como disruptores endócrinos y los que presentan una mayor actividad estrogénica son el 17β -estradiol y el 17α -etinilestradiol. Además de lo anterior, los estrógenos pueden generar cáncer y problemas reproductivos. La contaminación del medio ambiente por estrógenos es debido a la orina y las heces de seres humanos y animales que son liberados directamente al medio ambiente, ya que no hay un proceso específico para su eliminación en las plantas tratadoras de aguas residuales. Esta contaminación puede llegar hasta los alimentos: frutas y verduras de consumo; las raíces de sus plantas son capaces de absorber los estrógenos. Pueden llegar a las tierras de cultivo ya sea por las aguas contaminadas o por el estiércol utilizado como abono. En los productos de origen animal, ya que los animales de granja reciben tratamientos hormonales para aumentar la eficiencia en la producción de alimentos derivados de ellos, y los estrógenos pueden quedar en los tejidos, por ende, en la carne o ser excretados por otros fluidos como la leche.

En el presente trabajo se desarrolló una metodología de extracción de estrógenos en muestras en fase sólida, como proceso de concentración de los estrógenos presentes en una muestra de cascarón de huevo previo al análisis por cromatografía de líquidos. Y por último se desarrollaron dos métodos analíticos por cromatografía de líquidos de alta eficiencia: uno de los cuales se validó para la detección y cuantificación de 17β -estradiol, 17α -etinilestradiol, progesterona y benzoato de estradiol en concentraciones de partes por billón; el otro se desarrolló como una propuesta para el análisis de 17β -estradiol y 17α -etinilestradiol.

Objetivos

General

Desarrollar un método para la extracción y detección de bajas concentraciones de estrógenos en sólidos.

Específicos

- Desarrollar un método de extracción en fase sólida (SPE) de bajas concentraciones de estrógenos.
- Desarrollar un método cromatográfico para la detección y cuantificación de concentraciones bajas de estrógenos del orden de partes por billón.
- Realizar la validación del método cromatográfico.

Hipótesis

El método desarrollado permite la extracción de estrógenos en sólidos, su concentración mediante extracción en fase sólida (SPE), detección y cuantificación por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) en el orden de partes por billón con el cumplimiento de los parámetros de selectividad, linealidad, precisión, exactitud, límite de cuantificación y límite de detección.

Justificación

Los estrógenos son indispensables para un funcionamiento correcto del cuerpo de los seres humanos y los animales. El equilibrio de las concentraciones de los estrógenos para que esto suceda se puede romper fácilmente debido a factores externos como la ingesta de alimentos contaminados (directa o indirectamente) con estos, provocando afectaciones sobre el sistema endócrino y problemas de salud como el cáncer. Por ello es necesario un método para poder detectar estrógenos en bajas concentraciones en sólidos.

Introducción

1.1 Fundamentos de la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC)

En 1903, Mikhail Tswett, químico y botánico ruso, desarrolló el concepto de separación de los componentes de una muestra en una columna. Tswett separó varios pigmentos de una planta como las clorofilas y las xantofilas al pasar una solución de estos componentes a través de una columna de vidrio empacada con carbonato de calcio. En 1906, introdujo el término de cromatografía (del griego *chroma* que significa “color” y *graphine* cuya traducción es “escribir”). Entre los contemporáneos de Tswett la técnica no causó gran interés y tuvieron que pasar casi treinta años para que Lederer y otros científicos en Alemania entendieran la magnitud del descubrimiento de la cromatografía de líquidos [1–3].

Las aplicaciones de la cromatografía incrementaron en los años posteriores y se desarrollaron nuevos tipos de técnicas cromatográficas como la de intercambio iónico, de líquido-líquido, de capa fina, de gases y de exclusión por tamaño. En 1952, A. Martin y R. Synge recibieron el Premio Nobel por la invención de la cromatografía de partición [1,3].

En la década de 1970, la cromatografía de líquidos tendría una revolución con el desarrollo de nuevas columnas e instrumentos. Desde el desarrollo temprano de la cromatografía de líquidos, era conocido que la eficiencia de la columna aumentaba a medida que el tamaño de partícula de la fase estacionaria se reducía. Sin embargo, sería en la década de 1970 que se tuvo la tecnología para producir y usar columnas empacadas con partículas de sorbente de un tamaño tan pequeño como de 3-10 μm . Con estas nuevas columnas, fueron necesarios instrumentos más sofisticados que operaran a altas presiones lo que generó una marcada diferencia respecto a las columnas clásicas de vidrio en las que el flujo estaba únicamente regido por la gravedad. Para distinguir a los nuevos procedimientos de los métodos originales con flujo por gravedad se usó el

nombre de cromatografía de líquidos de alta presión (High Pressure Liquid Chromatography en inglés o simplemente HPLC por sus siglas en este idioma). Tiempo después las siglas debieron ser cambiadas cuando los cromatografistas se dieron cuenta que la presión no constituía por sí misma una variable del sistema. Debido a la universalidad que ya tenían para ese momento las siglas, únicamente se le buscó otro significado que fue cromatografía de líquidos de alta eficiencia (High Performance Liquid Chromatography en inglés) [1,3,4].

La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) define a la cromatografía como un método físico de separación en el que los componentes a ser separados son distribuidos entre dos fases, una de las cuales es estacionaria (fase estacionaria) mientras que la otra (la fase móvil) se mueve en una dirección definida [5].

En general, la separación de los componentes de una mezcla se presenta cuando la muestra y la fase móvil son forzadas a atravesar la fase estacionaria, en este momento entran en juego interacciones (hidrofóbicas, por puentes de hidrógeno, dipolares y electrostáticas) que son las responsables de que cada uno de los componentes de la muestra sea más o menos afín por la fase móvil o la fase estacionaria. Las diferencias en las propiedades físicas y químicas de los componentes individuales determinan su afinidad relativa por la fase estacionaria y por la fase móvil. A consecuencia de las interacciones y propiedades antes descritas, el componente más afín a la fase estacionaria se retiene más y, por lo tanto, eluyen a mayor tiempo de la columna. Por otra parte, el más afín por la fase móvil se retiene un menor tiempo y, por ende, eluye más rápido. A la acción que realizan los componentes de salir de la columna se le conoce comúnmente como elución [2,4]. En la Figura 1 se muestra una representación simplificada del proceso de separación de unos compuestos mediante cromatografía:

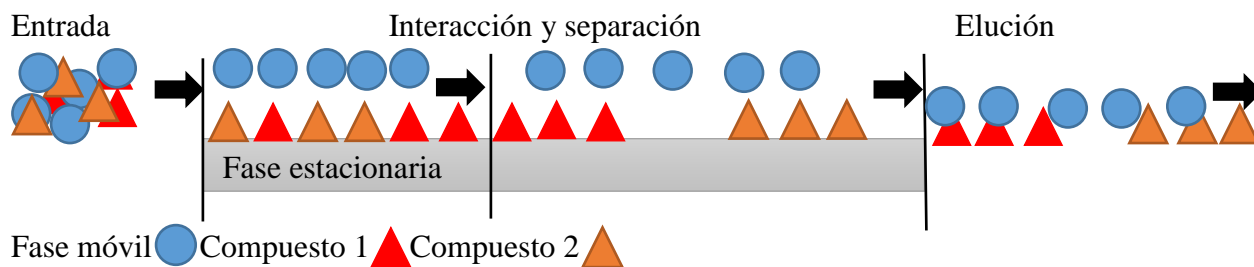


Figura 1. Representación de la interacción de los analitos con la fase estacionaria de la columna cromatográfica.

En cuanto a la elución se refiere, la IUPAC define dos técnicas: la cromatografía en fase normal y en fase reversa. En la cromatografía en fase normal se utilizan una fase estacionaria polar y disolventes relativamente no polares (como hexano y tetrahidrofurano) a medianamente polares. Un disolvente más polar tiene mayor fuerza de elución, considerando la fuerza de un disolvente o en general de la fase móvil como la habilidad que tiene para eluir los componentes. Estas condiciones generan que el orden en que eluyen los componentes de la muestra sea del menos polar al más polar. Por otra parte, en la cromatografía de fase reversa la fase estacionaria es no polar y la fase móvil es polar (mezcla de disolventes polares hidro-orgánicos como acetonitrilo:agua, metanol:agua, etc.). La polaridad de un disolvente surge de su dipolo y de su habilidad para donar o aceptar hidrógenos mediante puentes de hidrógeno. Por ejemplo, la polaridad del acetonitrilo se debe principalmente a su fuerte dipolo, mientras que la del metanol se debe a que puede formar puentes de hidrógeno. Un disolvente menos polar es una fase móvil más fuerte. En este caso, el orden se invertirá en comparación con la cromatografía de fase reversa, por lo que los compuestos eluyen del más polar al menos polar [3,5–7].

La separación en HPLC se logra mediante una variedad de procesos de sorción. En la separación de una mezcla de compuestos puede haber más de un mecanismo dominante de sorción que va a ser determinado principalmente por la naturaleza de la fase estacionaria, en

otras palabras, las interacciones de sorción nos son mutuamente exclusivas. El poder y utilidad que tiene la HPLC se deriva de dos cosas: por un lado, la variedad de interacciones de sorción disponibles y, por el otro, la facilidad de modificar radicalmente la naturaleza química y la fuerza de la fase móvil [2]. En la Tabla 1 se enlistan las interacciones de sorción y su mecanismo de retención asociado.

Tabla 1. Interacciones de sorción y su mecanismo de retención [2].

Interacciones de sorción	Mecanismo de retención
Adsorción líquido-sólido	Adsorción en superficie basándose en la polaridad.
Fase ligada	Ya sea por la partición entre las fases o interacciones de adsorción entre el soluto y la fase ligada polar.
Intercambio iónico	Interacción de cargas entre los iones solutos y contra ionóforos en el empaque.
Par iónico	Partición de los pares iónicos neutros entre las fases.
Exclusión de tamaño	Efecto de filtrado basado en el volumen hidrodinámico.
Quiral	Interacciones diastereoisoméricas entre los solutos enantiómeros y los sitios quirales dentro del empaque.
Afinidad	Unión bio-específica del soluto a un ligante inmovilizado.

La cromatografía líquido-sólido o de adsorción emplea una fase estacionaria polar, típicamente silicagel, y una fase móvil no polar, como puede ser el hexano, en general con algún aditivo que provee selectividad [4].

La cromatografía de fase ligada puede ser de fase normal así como de fase reversa. En fase reversa, la fase estacionaria está químicamente enlazada u órgano-enlazada a una matriz insoluble. La fase estacionaria más común es de octadecilsilano, este está enlazado covalentemente a un soporte de sílice mediante un enlace siloxano, Figura 2. También son

utilizadas cadenas hidrocarbonadas C_2 , C_4 , C_6 y C_8 . Con estos materiales se utiliza una fase móvil polar, como el metanol o metanol:agua. En fase normal, la fase estacionaria está modificada por la incorporación de grupos éter, nitrilo, nitro, diol y/o amino que se encuentran como sustituyentes normalmente al final de una cadena hidrocarbonada o en un anillo aromático. La elución se lleva a cabo mediante la utilización de disolventes relativamente no polares como: tetrahidrofurano, dietil éter, cloroformo y hexano [2,4,6].

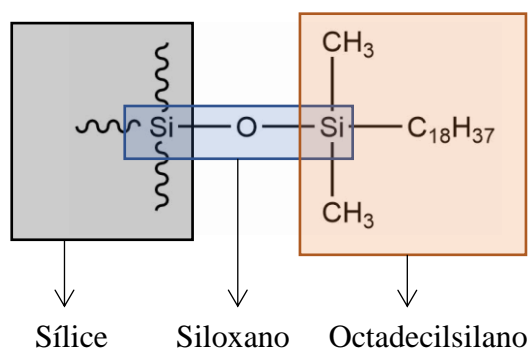


Figura 2. Estructura molecular de una fase estacionaria C18 de fase reversa donde el sílice está enlazado a un octadecilsilano mediante un enlace siloxano.

En la cromatografía de intercambio iónico se emplean columnas empacadas con partículas de un polímero o de gel de sílice, con un grupo funcional aniónico o catiónico enlazado (típicamente sulfónico para el intercambio de cationes, amonio cuaternario para el intercambio de aniones). La elección del tipo de grupo funcional da la facilidad para elegir entre intercambios débiles y fuertes [4].

La cromatografía de par iónico es complementaria a la de intercambio iónico, es esencialmente un tipo de cromatografía de fase reversa de partición que es usada para la separación de compuestos orgánicos ionizables [2].

Por su parte, la cromatografía de exclusión de tamaño emplea materiales de porosidad controlada, que funcionan como filtro o tamiz y clasifica las moléculas de la muestra según un orden decreciente de tamaño molecular (en este caso las moléculas más grandes son las que primero eluyen y posteriormente las de menor tamaño). Si se cuenta con estándares apropiados, es posible determinar el peso molecular de un compuesto desconocido o determinar la distribución de pesos moleculares de un polímero sintético [4].

La cromatografía quiral es utilizada para la resolución de mezclas enantioméricas. La separación depende de al menos tres puntos de interacción entre los enantiómeros y la fase estacionaria [2].

La HPLC es una herramienta potente para separar y cuantificar analitos en una mezcla compleja, sin embargo, no todas las muestras pueden ser analizadas sin un tratamiento previo por las siguientes razones:

- La muestra contiene compuestos que pueden interferir con la determinación de los analitos de interés.
- La concentración de los analitos de interés es demasiado baja y no puede ser detectada en el tamaño de muestra que es compatible con el sistema cromatográfico.
- La muestra contiene componentes que son perjudiciales para el sistema cromatográfico [1].

Las técnicas utilizadas en el tratamiento previo de la muestra para obtener una solución que se pueda inyectar en el sistema cromatográfico están en función de la naturaleza de la muestra. De manera general, en el caso de las muestras sólidas se necesita reducir a un tamaño de partícula con dos fines: 1) que la muestra sea homogénea permitiendo así un muestreo significativo, y/o 2) que se pueda disolver fácilmente o se pueda extraer la sustancia de interés de

una manera sencilla al haber aumentado su área de superficie. La reducción del tamaño se puede realizar mediante diversas operaciones como son la molienda con mortero o con un rotor, la homogenización, la maceración, el prensado, la pulverización, etc. Con algunas muestras sólidas es necesario un paso de secado. Por otro lado, las muestras líquidas suelen ser más fáciles de preparar que las muestras sólidas, debido a que la mayoría únicamente requieren unos cuantos de las siguientes operaciones: filtración, centrifugado, sedimentación, liofilización, microdiálisis, destilación, evaporación, dilución, extracción líquido-líquido, extracción en fase sólida, etc. Algunas muestras requieren de métodos específicos como son: la desproteización o la derivatización [4,8].

De entre estos métodos para el tratamiento previo de una muestra, la extracción en fase sólida (SPE) es el más importante. Este método, básicamente, concentra y purifica los analitos de una solución por medio de la sorción de estos en la fase sólida de un cartucho desechable, seguido de su elución con un disolvente apropiado. Usualmente, el volumen del disolvente necesario para completar la elución de los analitos es mucho menor que el volumen inicial, y la muestra se concentra. La fase sólida típicamente consiste en pequeñas partículas porosas, ya sea, de sílice enlazado a una fase orgánica o de un polímero orgánico como es el poliestireno reticulado [8–10].

La SPE consiste de un conjunto de cuatro pasos esenciales:

1. El acondicionamiento del empaque. Consiste en hacer pasar un cierto volumen de un disolvente orgánico (generalmente metanol o acetonitrilo) con tres fines: 1) remover cualquier impureza que pudiera haberse alojado en el cartucho, 2) solvatar el sorbente, y 3) llenar los espacios vacíos del sorbente. Después se hace un lavado con agua para preparar el cartucho para introducir la muestra acuosa.

2. La carga de la muestra. Es el paso en el que se hace pasar la muestra disuelta en un disolvente débil (agua o buffer con $\leq 10\%$ de disolvente orgánico) por el cartucho, ya sea por gravedad, con una bomba, aspirada por vacío, o con un sistema automatizado. Durante este paso, el analito es concentrado en el sorbente.
3. El lavado. Se centra en la eliminación de la matriz de la muestra de los espacios intersticiales de la columna mientras que se sigue reteniendo el analito mediante la adición de agua o un buffer acuoso.
4. La elución de los analitos. En este paso se ocupa un disolvente apropiado para interrumpir la interacción entre el analito y el sorbente y resultando así en la elución del analito [8,9].

En la Figura 3 se muestran los pasos necesarios para la extracción en fase sólida.

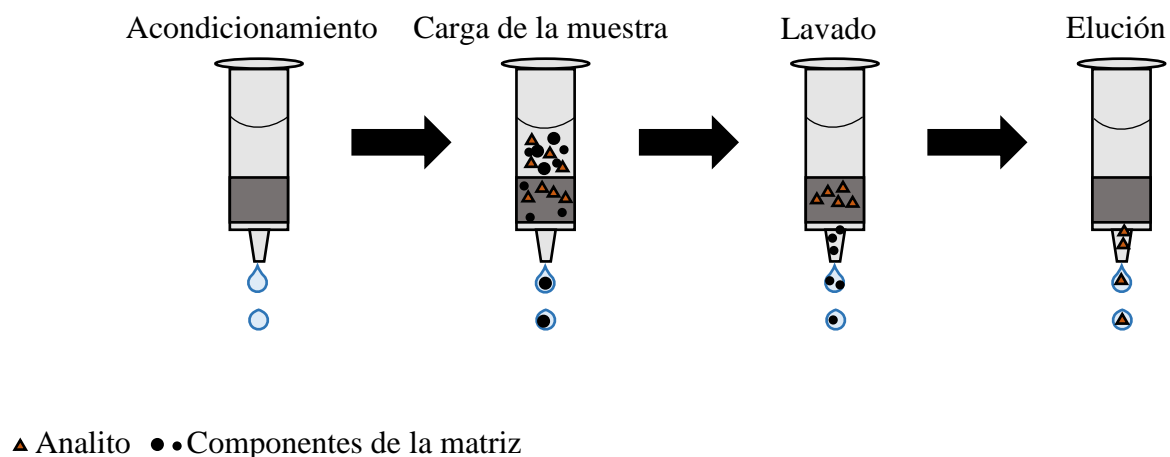


Figura 3. Representación de los pasos de la extracción en fase sólida.

Los detectores para HPLC son de dos tipos básicos. Los detectores de propiedades de volumen responden a las propiedades del volumen de la fase móvil, como a su índice de refracción, constante dieléctrica o densidad, que son afectadas por la presencia de los solutos. En contraposición, los detectores de propiedades del soluto responden a algunas de las propiedades de los solutos como puede ser la fluorescencia, corriente de difusión o absorción de luz ultravioleta (abreviado UV), las cuales no posee la fase móvil. El detector ultravioleta es el más utilizado para HPLC, aunque también son ampliamente usados los de fluorescencia, índice de refracción y electroquímicos; en los últimos años han ganado popularidad los de espectrometría de masas (detector MS) [3].

Los detectores de absorción UV/Vis responden a las sustancias que absorben radiación electromagnética en la región de los 180-800 nm. Los compuestos orgánicos poseen grupos funcionales responsables de la absorción de luz en esta región son llamados cromóforos. La absorción en la región del UV/Vis se debe a la interacción de los fotones provenientes de una fuente con las moléculas de la muestra. Cuando una molécula absorbe un fotón de la región UV/Vis, pasa de un estado de baja energía (el estado inicial o estado basal) a un estado de alta energía (estado excitado). La radiación electromagnética absorbida tiene una energía exactamente igual a la diferencia de energía entre el estado excitado y el estado basal. Las transiciones resultantes de la absorción en esta región se dan entre niveles de energía electrónica. Generalmente, la transición más probable es del orbital molecular más alto ocupado (HOMO) al orbital molecular más bajo desocupado (LUMO). Las transiciones más probables involucran electrones en orbitales moleculares π de enlace a orbitales π^* de antienlace o en orbitales de no enlace n a orbitales π^* y σ^* de antienlace debido a que requieren de una menor energía para llevarse a cabo [11–13].

Los detectores normalmente consisten de una celda cilíndrica pequeña que tiene una capacidad de entre 2 y 5 μL a través de la que pasa el eluente de la columna. La radiación UV/Vis también pasa a través de la celda y llega a una celda fotoeléctrica que genera una señal que posteriormente es registrada en un sistema de adquisición de información [13].

La cantidad de radiación absorbida por una muestra está descrita por la ley de Lambert-Beer, Ecuación (1), que establece la relación entre la absorbancia y la concentración [1,7].

$$A = \epsilon bc \quad (1)$$

donde ϵ es la absorptividad molar, b es ancho de la celda y c es la concentración [1].

Hay diferentes tipos de detectores UV/Vis, los de onda fija y los de onda múltiple. Existen dos tipos básicos de detectores de onda múltiple, el de dispersión y el de arreglo de diodos, que es el más popular. Ambos requieren de una fuente de luz de amplia emisión como una lámpara de deuterio o de xenón, siendo la de deuterio la más utilizada. En el detector de dispersión, la luz emitida por la lámpara se enfoca en un monocromador, habitualmente una red holográfica de difracción, después pasa a la celda y posteriormente a una fotocelda. Por su parte, el detector de arreglo de diodos tiene un sistema óptico invertido: la celda se ilumina con todas las longitudes de onda emitidas por la lámpara (es decir con luz no monocromada) y la luz que emerge de la celda llega a la red de difracción donde es dispersada hacia el elemento fotosensible. En lugar de una fotocelda se emplea un conjunto de fotoceldas o fotodiodos montados en un chip de silicio. Gracias a esto, es posible medir no solo la luz transmitida de una determinada longitud de onda, sino todo el espectro de absorción del eluente en tiempo real [4,13].

1.2 Estrógenos

Los estrógenos son hormonas esteroideas biológicamente activas que se derivan del colesterol y son liberadas por la corteza suprarrenal, los testículos, los ovarios y la placenta en humanos y animales; pueden clasificarse en hormonas naturales y sintéticas [14]. Los estrógenos comparten el mismo núcleo estructural llamado ciclopentanoperhidrofenantreno o también conocido como gonano que consiste de un tetraciclo de 17 carbonos [15] y se difieren por diversas sustituciones, principalmente en el carbono 17 [16].

La solubilidad de los estrógenos en agua es baja [14] y por ello la excreción es en forma conjugada mediante la vía urinaria o vía biliar. Antes de ser desechados, los estrógenos son conjugados enzimáticamente adicionando glucuronato o sulfato en la posición del carbono 3 y/o el carbono 17. Estos conjugados polares son biológicamente inactivos y más solubles en agua comparados con su correspondiente contraparte libre o no conjugada [16,17].

Los disruptores endócrinos son compuestos que interfieren con el funcionamiento usual del sistema endócrino en los humanos y en los animales. Cuando están presentes en el medioambiente por encima de cierta concentración, causan efectos adversos a la salud [16].

Los estrógenos pueden actuar como disruptores endócrinos y estudios indican que el 17α -etinilestradiol (EE2) y el 17β -estradiol (E2) son los más potentes, seguidos por la estrona (E1) y el estriol (E3). Estas hormonas naturales y sintéticas son de preocupación primaria [16], porque a pesar de que son importantes para el buen funcionamiento del cuerpo humano, en cantidades por encima de los intervalos normales aumentan el riesgo cáncer (mama o próstata) [18] y de problemas cardiovasculares [19]. De manera similar que en los animales, pueden generar un cierto grado de feminización, problemas reproductivos [20] y problemas oculares como riesgo de

desarrollo de glaucoma [21]. Algunos estudios sugieren la posible relación de los estrógenos con el desarrollo de la enfermedad de Parkinson [22].

Los estrógenos en el agua pueden generar problemas reproductivos en peces [23], problemas cardíacos en ranas [24] y la interrupción en la cadena alimenticia acuática [25], por citar algunos. En los animales domésticos como las vacas, pueden producir anomalías en las ubres y en los genitales, en las ovejas causan infertilidad [26]. En algunos otros animales, las altas concentraciones de estrógenos pueden provocar problemas oculares [21].

Se estima que la población mundial, de alrededor de 7 mil millones de habitantes, descarga al medio ambiente alrededor de 30,000 kg/año de estrógenos naturales (E1, E2 y E3) y además de 700 kg/año de estrógenos sintéticos provenientes del uso de anticonceptivos (EE2) [14,17]. Los humanos excretamos alrededor del 90-95% de los estrógenos como estrógenos conjugados [17]. Las mujeres embarazadas junto a las mujeres con menopausia que se encuentran con una terapia de remplazo hormonal, son quienes más estrógenos excretan, llegando a liberar 277 $\mu\text{g}/\text{día}$ y 59.20 $\mu\text{g}/\text{día}$ de E2 respectivamente, y en una cantidad similar liberan tanto E1 como E3. Y en menor cantidad en comparación con las antes mencionadas (<10 $\mu\text{g}/\text{día}$), también mujeres en cualquier momento de su ciclo menstrual, hombres y niños excretan estos estrógenos [14].

Los hospitales se han identificado como otra fuente mayor de contaminación de estrógenos. Varias investigaciones han revelado que estrógenos, especialmente altos niveles de E3, fueron encontrados en las muestras de los efluentes de todos los hospitales estudiados [14]. Sin embargo, la contribución potencial de estrógenos al medioambiente proveniente de las granjas de animales es mayor. Tan sólo en los Estados Unidos y el Reino Unido se han registrado 83,000 kg/año de estrógenos provenientes de la crianza de animales, el doble de la velocidad de

descarga de humanos [14,17]. El cerdo (*Sus scrofa domestica*), las aves de corral (*Gallus gallus*) y el ganado (*Bos taurus*) excretan los estrógenos en forma de estrógenos conjugados en un 96, 69 y 42%, respectivamente [17]. Se ha establecido una posible relación entre las Operaciones Concentradas de Alimentación Animal (OCAA) y la detección de estrógenos en ambientes acuáticos. La aplicación de estiércol de animales en tierras de cultivo, como fuente alternativa de nutrientes para la agricultura ecológica, ha sido identificada como el principal origen de estrógenos en el medio ambiente. Los estrógenos en el estiércol podrían potencialmente contaminar los ambientes acuáticos por medio de la lixiviación a través del suelo hasta los cuerpos de agua subterráneos poco profundos [27].

Las plantas tratadoras de aguas residuales son una fuente importante de estrógenos que se liberan al medioambiente. Los efluentes, los bio-sólidos y las aguas residuales, conteniendo concentraciones significativas de estrógenos, son directamente descargados en el medioambiente [17].

La mayoría de las investigaciones se centran en ambientes acuáticos y sedimentos superficiales, porque es el lugar final al que llegan los estrógenos que son excretados por humanos y animales. Sin embargo, estudios revelan que la leche puede contener estrógenos, que son transportados mediante el torrente sanguíneo a las glándulas mamarias y son excretados posteriormente a la leche [28]. También se han medido concentraciones de estrógenos (principalmente E2) en los músculos de las vacas (principal especie productora de alimento), así como en el hígado y riñones, pues se les da tratamiento hormonal, utilizando principalmente E2 [29].

Por otra parte, en ciertas frutas y vegetales se han encontrado estrógenos en concentraciones de entre 1.3 a 2.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, debido a que las plantas pueden absorberlos del suelo por medio de las raíces. Especialmente en la lechuga se encontraron las concentraciones más altas [14].

En 1988, el comité experto en aditivos de alimentos de la OMS y de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, en su trigésima segunda junta, revisó al 17β -estradiol, a la progesterona y a la testosterona. Se determinó que era innecesario el establecimiento de un consumo diario aceptado (ADI por sus siglas en inglés) para cada una de las sustancias antes mencionadas. En 2000 se determinó el consumo aceptado diario: 0-0.050 $\mu\text{g}/\text{kg}$ peso corporal para el 17β -estradiol, 0-30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ peso corporal para la progesterona y 0-2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ peso corporal para la testosterona [30].

1.3 Antecedentes

En 2006 Wang y colaboradores analizaron estrona, 17β -estradiol, estriol y progesterona en agua mediante extracción de punto de enturbiamiento y HPLC-UV con una columna Inertsil ODS-C18. Los límites de detección de este método fueron 0.23 $\mu\text{g}/\text{L}$ para estriol, 0.32 $\mu\text{g}/\text{L}$ para 17β -estradiol, 0.25 $\mu\text{g}/\text{L}$ para estrona y 5 $\mu\text{g}/\text{L}$ para progesterona [31].

En 2010 Kozlík y colaboradores desarrollaron un método para el análisis de muestras de agua provenientes de ríos en República Checa. Utilizando SPE (solid phase extraction) y cromatografía de líquidos con detector de masas, con una columna Zorbax SB C18 capilar, se detectó 17α -estradiol, 17β -estradiol, 17α -etinilestradiol y estriol con un límite de detección del orden de ng/L [32].

En 2015 Kobayashi y colaboradores extrajeron 17β -estradiol y testosterona de huevos de tortuga boba marina analizándolos con ensayo radio inmunológico. Obtuvieron 50.2 ng/L de 17β -estradiol y testosterona en el intervalo de 9.2 a 300.2 ng/L [33].

En este trabajo de investigación, se desarrolló un método para la extracción, concentración por SPE y análisis por HPLC de estrógenos en muestras sólidas.

Metodología

La metodología se dividió en 5 etapas: el tratamiento de las muestras reales; el tratamiento previo al análisis por cromatografía por extracción en fase sólida; la disolución estándar de 17β -estradiol, 17α -etinilestradiol, progesterona y benzoato de estradiol y la obtención de sus espectros de absorción UV de los analitos; el desarrollo del método cromatográfico así como la obtención de los parámetros para determinar su aptitud; la validación del método cromatográfico.



Figura 4. Esquema general de trabajo.

2.1 Análisis de muestras de cascarón de huevo

El análisis de estrógenos se realizó para cascarones de huevos de seis marcas de huevo: Bachoco, El Calvario, San Juan (huevo blanco y huevo rojo), Doña Pris, Tehuacán y huevos orgánicos. Los cascarones de huevo se almacenaron en bolsas de papel y en un lugar seco y oscuro hasta el momento en que se utilizaron.

En primer lugar, se trituraron los cascarones de huevo por separado para las diferentes marcas. Después, el cascarón de huevo triturado se tamizó con un tamaño de malla menor a 18 y se tomó una muestra de 20 g del cascarón de huevo y se adicionó a 50 mL de una disolución de 20% agua destilada y 80% metanol. La mezcla se mantuvo en agitación vortex durante 30 minutos. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos para separar la fase sólida de la fase líquida. La fase de interés para el análisis fue la fase líquida, la otra fase se desechó.

2.2 Evaporación de disolvente al vacío

Para la extracción de estrógenos de un sólido generalmente se utiliza metanol o un disolvente afín, sin embargo, el volumen de disolvente suele ser grande y no es posible concentrar los estrógenos en un cartucho SPE, pues el mismo disolvente arrastra los estrógenos del cartucho. Previo a la extracción en fase sólida, los 50 mL de la disolución obtenida la sección 2.1 se redujeron a un volumen de 20 mL a 40 °C y una presión de 285 mmHg. Posteriormente, se aforaron los 20 mL de la disolución a 100 mL con agua destilada, con el objetivo de tener mayor contenido de agua en el disolvente para favorecer que los estrógenos queden retenidos en el cartucho SPE. En la Figura 5 se muestra el esquema del sistema montado para este proceso:

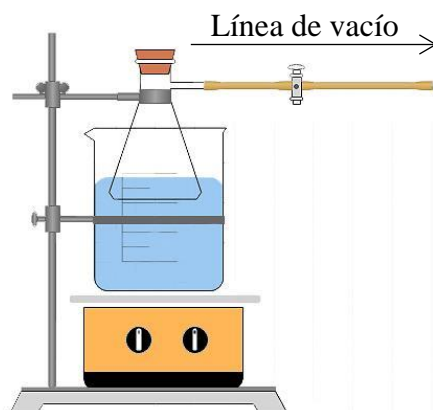


Figura 5. Sistema al vacío para la evaporación de metanol de la muestra.

2.3 Extracción en fase sólida

La extracción en fase sólida es un procedimiento que tiene como principal objetivo aumentar la concentración de la muestra antes del análisis por cromatografía. Se realizaron dos extracciones por triplicado, la primera conteniendo los 4 estrógenos a una concentración de 10 ppm disueltos en 50 mL (20:80) H₂O:MeOH, posterior a la extracción, se analizaron por cromatografía para determinar la concentración final. La segunda extracción se hizo con una disolución de E2 y EE2 10 ppm en 50 mL (20:80) H₂O-MeOH, que se redujo mediante evaporación al vacío el volumen de MeOH hasta obtener una disolución de 20 mL (50:50) H₂O-MeOH, después, ésta se aforó a 100 mL con agua destilada para así obtener una disolución de 100 mL de (90:10) H₂O-MeOH. Finalmente, la disolución de 100 mL se pasó por el cartucho SPE y se analizó por cromatografía para determinar la concentración final.

La extracción en fase sólida se llevó a cabo con cartuchos Strata-XL de 6 mL y de 200 mg de Phenomenex®, también se probaron los cartuchos Discovery® DSC-18. Se colocaron los cartuchos en los sitios del manifold ajustándolos de la mejor manera para mantener un buen vacío durante la extracción. A continuación, se prendió la bomba de vacío hasta una presión de 15

mmHg. Inmediatamente, se activaron los cartuchos adicionándoles 3 mL de metanol a cada uno y esperando a que el polímero del cartucho se impregnara bien para eluir compuestos apolares que pudieran encontrarse adsorbidos en su superficie, y después 3 mL de agua fueron adicionados con el fin de eliminar compuestos polares. Posteriormente, se hizo pasar la muestra a un flujo de 1 mL/min aproximadamente. Al terminar, se lavó dos veces con 10 mL de agua para eliminar las impurezas de la muestra (principalmente compuestos polares) y se dejó secar cinco minutos con el vacío. Para la elución se hicieron pasar 2 mL de MeOH de manera lenta para cada muestra en viales de cromatografía. En la Figura 6 se muestra un esquema del sistema de extracción en fase sólida con vacío:

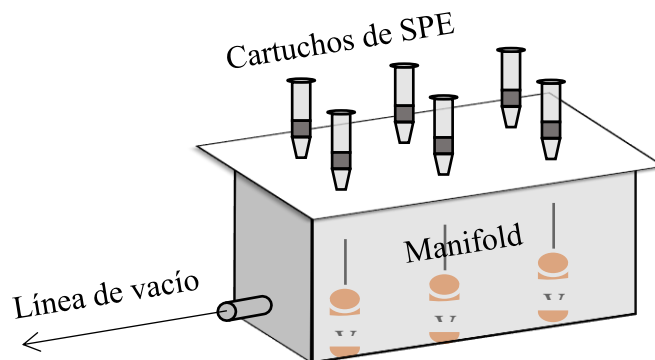


Figura 6. Sistema de extracción en fase sólida al vacío.

Se preparó una disolución de estándares a una concentración de 10 ppm, se hizo pasar por el método de extracción en fase sólida y se analizó mediante cromatografía de líquidos para determinar la concentración y mediante la Ecuación (2) se obtuvo el porcentaje de recuperación:

$$\%R = \frac{C_f \cdot V_f}{C_i \cdot V_i} \cdot 100 \quad (2)$$

donde:

$\%R$ = Porcentaje de recuperación de la SPE.

C_f = Concentración del producto de la SPE.

V_f = Volumen ocupado para la elución en la SPE.

C_i = Concentración de la disolución preparada.

V_i = Volumen de la disolución preparada.

El criterio de aceptación para la recuperación es que sea mayor al 85%.

2.4 Preparación de las disoluciones estándar

Inicialmente, se preparó una disolución de 100 ppm de 17β -estradiol (Sigma-Aldrich), 17α -etinilestradiol (Sigma-Aldrich), progesterona (Intercontinental fármacos) y benzoato de estradiol (Intercontinental fármacos) con agua destilada y metanol en una proporción de (20:80). A partir de esta disolución madre se realizaron diluciones para preparar el resto de las disoluciones estándar. La disolución se mantuvo en refrigeración en todo momento para evitar cambios de concentración debido a la evaporación de los disolventes. De igual manera, se preparó otra disolución de 17β -estradiol (Sigma-Aldrich) y 17α -etinilestradiol (Sigma-Aldrich) en mezcla a 100 ppm y se conservó bajo las mismas condiciones antes descritas. Los espectros de los estrógenos se obtuvieron cuando se inyectaron 5 μ L de la mezcla de estrógenos a una concentración de 20 ppm en cromatógrafo de líquidos acoplado a un detector de arreglo de diodos.

2.5 Desarrollo del método cromatográfico para la detección de estrógenos

Para el desarrollo del método cromatográfico en columna semi-micro, se realizaron inyecciones de 5 μ L de la mezcla de 17β -estradiol, 17α -etinilestradiol, progesterona y benzoato de estradiol a una concentración de 20 ppm en una columna Zorbax SB C18. Para la separación de los analitos, en primera instancia, se probó un programa isocrático para la fase móvil a diferentes porcentajes de composición. Ninguna composición de la fase móvil con el programa isocrático tuvo buenos resultados de separación para los cuatro estrógenos porque con algunas composiciones dos analitos se quedaban poco tiempo retenidos (17β -estradiol y 17α -etinilestradiol) y no se separaban, mientras que con otras composiciones sucedía que los otros dos analitos (progesterona y benzoato de estradiol) se quedaban retenidos por mucho tiempo en la columna, lo que produjo que los tiempos de análisis fueran largos. Para resolver esta situación, se utilizó un programa con un gradiente de composición de la fase móvil. También se tomaron en cuenta los factores temperatura y la velocidad de flujo para el desarrollo del método. Las condiciones de operación a las que se llegó se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones de operación para el método cromatográfico en columna semi-micro.

Cromatógrafo de líquidos:	Agilent 1260 infinity	
Detector:	Multionda a 230 nm	
Columna:	Zorbax SB-C18 2.1 x 50 mm, 1.8 μ m	
Fase móvil:	A: Agua desionizada con ácido fórmico 0.1 % B: Acetonitrilo con ácido fórmico 0.1 %	
Programa del gradiente:	Tiempo (minutos)	Porcentaje de B (%)
	0-2	40
	2-7	90
	7-10	40
Temperatura ($^{\circ}$ C):	30	
Flujo (mL/min):	0.25	
Tiempo de análisis (min):	15	
Volumen de inyección (μ L):	5	

Después de aproximadamente 300 análisis con el método cromatográfico en columna semi-micro, fue necesario desarrollar otro método cromatográfico debido a la imposibilidad técnica de seguir realizando análisis con la columna que se ocupó debido a que se observó que durante el análisis se rebasaba la presión máxima a la que opera el equipo, 400 bar, y en este punto el cromatógrafo se detenía completamente haciendo inviable el análisis. Se aprovechó el cambio de columna para optar por una columna que tuviera una fase estacionaria que redujera las interacciones secundarias con los silanoles para obtener mejores formas de pico, que los obtenidos con la columna anterior que eran asimétricos. La columna que se seleccionó fue una Zorbax Eclipse XDB-C18 porque tiene una fase estacionaria que cubre la mayor parte de los silanoles residuales y con un diámetro mayor (4.6 mm) para evitar trabajar a presiones altas. También se optó por reducir los estrógenos de interés del estudio, únicamente a E2 y EE2 con el

fin concentrarse en los estrógenos que tienen la mayor actividad estrogénica y que aún en concentraciones bajas causan efectos adversos reportados. Para el desarrollo del método cromatográfico en columna convencional, se partió de la base del método cromatográfico en columna semi-micro. Se realizaron inyecciones de 5 μ L de la mezcla de E2 y EE2 a una concentración de 100 ppm. En la Tabla 3 se resumen las condiciones del método cromatográfico en columna convencional.

Tabla 3. Condiciones de operación del método cromatográfico en columna convencional.

Cromatógrafo de líquidos:	Agilent 1260 infinity
Detector:	Multionda a 230 nm
Columna:	Zorbax Eclipse XDB-C18 4.6 x 150 mm, 5 μ m
Fase móvil:	A: Agua desionizada con ácido fórmico 0.1 % B: Acetonitrilo con ácido fórmico 0.1 %
Programa del gradiente:	Isocrático B 40 %
Temperatura (°C):	30
Flujo (mL/min):	1
Tiempo de análisis (min):	10
Volumen de inyección (μ L):	5

Prueba de aptitud del sistema cromatográfico

Es el procedimiento por el cual se verifica que el sistema cromatográfico es adecuado para el análisis de las sustancias de interés. Esta prueba se basa en el concepto de que el equipo, los sistemas electrónicos, las operaciones analíticas y las muestras analizadas constituyen un sistema integral que se puede evaluar como tal. Los parámetros analizados y los criterios de evaluación de estos se mencionan a continuación:

- **Factor de retención (k)**

Para determinar el factor de retención se midió el tiempo de retención del compuesto, así como el tiempo muerto y mediante la Ecuación (3) se calculó:

$$k = \frac{t_r - t_m}{t_m} \quad (3)$$

donde:

k = es el factor de retención.

t_r = es el tiempo de retención del analito.

t_m = es el tiempo muerto.

El criterio de aceptación para este parámetro es que debe ser mayor que 2 y menor que 20. Si es menor a dos indica que el compuesto no está interactuando lo suficiente con la columna y no ocurre una separación, por el otro lado, si este factor es mayor que veinte esto indica que el compuesto se está quedando retenido durante un largo periodo de tiempo y es mejor modificar las condiciones del método cromatográfico para que este eluya en un menor tiempo.

- **Factor de separación (α)**

Para calcular el factor de separación entre dos picos vecinos se hizo uso de la Ecuación (4):

$$\alpha = \frac{k_b}{k_a} \quad (4)$$

donde:

α = es el factor de separación.

k_b = factor de retención del pico más alejado del pico de inversión de la pareja de picos vecinos.

k_a = factor de retención del pico más cercano al pico de inversión de la pareja de picos vecinos.

El criterio de aceptación para este parámetro es que α debe ser mayor a 1 para que exista una separación entre ambos picos.

- **Resolución (R_s)**

Para determinar la resolución de una pareja de picos vecinos se midió el tiempo de retención de ambos, así como su ancho de pico medido en la base. Después se calculó la resolución por medio de la Ecuación (5):

$$R_s = 2 \frac{t_{r2} - t_{r1}}{w_{b1} + w_{b2}} \quad (5)$$

donde:

R_s = es la resolución entre dos picos vecinos.

t_{r1} = es el tiempo de retención del primer pico.

t_{r2} = es el tiempo de retención del segundo pico.

w_{b1} = es el ancho del primer pico.

w_{b2} = es el ancho del segundo pico.

Se considera que la resolución de los picos es total cuando el valor obtenido es mayor a 2.

- **Factor de asimetría (F)**

Para la determinación de este factor, a partir del ápice del pico se trazó una línea perpendicular hasta la base. Posteriormente, se midió el ancho hacia la derecha y hacia la izquierda a partir de la intersección de la línea marcada con la base. Por último, se ocupó la Ecuación (6):

$$F = \frac{b}{a} \quad (6)$$

donde:

F = es el factor de asimetría

b = es el ancho medido hacia la derecha

a = es el ancho medido hacia la izquierda.

Es deseable que el factor de asimetría sea cercano a 1 y no sea superior a 1.5.

- **Número efectivo de platos teóricos (N_{ef})**

Cada plato representa un equilibrio de distribución del analito entre las fases estacionaria y la fase móvil. El número total de platos teóricos de una columna representa el poder de separación de la columna. Una buena columna tiene un número alto de platos teóricos. Este parámetro se calcula con la siguiente Ecuación (7):

$$N_{ef} = \left(\frac{t_r - t_m}{0.425 \cdot w_{h/2}} \right)^2 \quad (7)$$

donde:

N_{ef} = es el número efectivo de platos teóricos.

t_r = es el tiempo de retención del analito.

t_m = es el tiempo de muerto.

$w_{h/2}$ = es el ancho del pico medido a la mitad de la altura del pico.

- **Altura equivalente de plato teórico (H_{ef})**

Se define como el segmento de columna que representa un plato teórico. Entre menor es H_{ef} el sistema cromatográfico es más eficiente. La altura equivalente de plato teórico se calcula aplicando la Ecuación (8):

$$H_{ef} = \frac{L}{N_{ef}} \quad (8)$$

donde:

H_{ef} = es la altura equivalente de plato teórico.

L = Longitud de la columna (μm).

N_{ef} = Número efectivo de platos teóricos.

- **Altura equivalente de plato teórico reducida (h_{ef})**

La altura equivalente a un plato teórico reducido es un parámetro en el cual se involucra el diámetro medio de partícula (medido en μm), determinando con este la cantidad de partículas que tendría de alto un plato teórico y por ende la cantidad de partículas necesarias para alcanzar un equilibrio de distribución del analito entre estas (fase estacionaria) y la fase móvil. La altura equivalente de plato teórico reducido se calcula aplicando la Ecuación (9):

$$h_{ef} = \frac{H_{ef}}{dp} \quad (9)$$

donde:

h_{ef} = es la altura equivalente de platos teóricos reducida.

H_{ef} = es la altura equivalente de platos teóricos (μm).

dp = diámetro medio de partícula (μm).

Es preferible utilizar la altura equivalente de plato reducida porque es un parámetro independiente de la longitud de la columna y de la granulometría del material de relleno. Se considera que una columna está en buen estado cuando h_{ef} tiene un valor ≤ 3 , la columna es aceptable cuando sus valores son $4 \leq h_{ef} \leq 5$ y, por último, la columna está muy deteriorada cuando el valor de $h_{ef} \geq 6$.

2.6 Validación del método cromatográfico

La validación de un método es el proceso de demostrar mediante pruebas de laboratorio que el procedimiento analítico es adecuado para su uso destinado. Las pruebas de laboratorio requeridas, así como los criterios para evaluarlas se enlistan a continuación:

- **Selectividad**

Con el fin de determinar la selectividad del método, se inyectaron cada uno de los estrógenos individualmente y en mezcla. Los datos obtenidos del análisis cromatográfico se graficaron en paralelo y se trazó una línea perpendicular a partir del ápice de los picos de los cromatogramas individuales hasta el cromatograma de la mezcla para relacionar los picos y constatar que cada uno de las señales obtenidas en la mezcla de estrógenos corresponde con uno de los estrógenos.

- **Linealidad**

Para la evaluación de la linealidad del método, se prepararon disoluciones de la mezcla de los cuatro compuestos a las concentraciones de 1, 10, 20, 30, 40 y 50 ppm y se analizaron con las condiciones del método cromatográfico en columna semi-micro. Después se elaboró la curva de calibración correspondiente graficando el área del pico en función de la concentración de cada compuesto y se obtuvo la ecuación de la recta por el método de mínimos cuadrados.

Posteriormente, se determinó el coeficiente de correlación (r) para cada compuesto y se analizó mediante un contraste t de dos colas, donde la hipótesis nula es que no hay una correlación lineal entre las concentración y el área de los picos (porque la desviación de la linealidad puede ser tanto negativa como positiva) en el que se calculó t_r con $n-2$ grados de libertad y se comparó con el valor de t en tablas para un nivel de confianza del 95%. El criterio de aceptación se basa en la hipótesis nula de la no correlación entre la concentración y el área del pico. Si el valor de t_r es mayor que t de la tabla, entonces se rechaza la hipótesis nula, por tanto, hay una correlación lineal significativa con la probabilidad del 95%. Para calcular t_r se ocupó la Ecuación (10):

$$t_r = \frac{|r|\sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}} \quad (10)$$

donde:

t_r = es el estadístico t para esta prueba.

r = es coeficiente de regresión lineal.

n = número de muestras

- **Precisión (Repetitividad)**

Para medir la precisión se realizaron 9 inyecciones de 5 μL de la mezcla de los cuatro compuestos a una concentración de 10 ppm. Se calculó la concentración de las muestras con ayuda de la ecuación de la recta a partir de la curva de calibración. A partir de lo anterior, se calculó la desviación estándar y la desviación estándar relativa con las Ecuaciones (11) y (12):

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} \quad (11)$$

donde:

s = es la desviación estándar del conjunto de concentraciones.

X_i = es cada uno de las concentraciones.

\bar{X} = Al promedio de las concentraciones.

n = número de muestras.

$$\text{RSD} = \frac{s \cdot 100}{\bar{X}} \quad (12)$$

donde:

RSD = es la desviación estándar relativa del conjunto de concentraciones.

S = es la desviación estándar del conjunto de concentraciones.

\bar{X} = es el promedio de las concentraciones.

La precisión se expresa con la desviación estándar relativa (%), y el criterio de aceptación es que sea igual o menor que 2%.

- **Exactitud**

Con el fin de evaluar la exactitud se tomaron los datos antes obtenidos de las 9 inyecciones de 5 μL de la mezcla de los cuatro compuestos a una concentración de 10 ppm. Posteriormente, se realizó un contraste t, con los datos de concentración obtenidos. El criterio de aceptación se basa en que si la t experimental, t_{ob} , es menor que la t de las tablas, entonces el método cromatográfico tiene la exactitud requerida para ese intervalo de confianza. La t_{ob} se puede calcular mediante la Ecuación (13):

$$t_{ob} = \frac{[\hat{X} - \bar{X}] \cdot \sqrt{n}}{s} \quad (13)$$

donde:

t_{ob} = es el estadístico t experimental para esta prueba.

\bar{X} = es el promedio de las concentraciones.

\hat{X} = es el valor verdadero de la concentración.

s = es la desviación estándar de las concentraciones.

n = número de muestras.

- **Límite de cuantificación y detección**

El límite de cuantificación corresponde a la menor concentración de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse en una muestra, en las condiciones establecidas y se expresa en unidades de concentración. Por su parte, el límite de detección corresponde a la menor concentración de analito que puede determinarse con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas. Para la determinación de estos parámetros se utilizaron la Ecuación (14) para el límite de detección y la Ecuación (15) para el límite de detección para cada uno de

los análisis. También se ocupó la Ecuación (16) para determinar el error estándar de estimación del intercepto en y. Se ocuparon los datos de las curvas de calibración de los analitos para realizar los cálculos [4,34].

$$LDD = \frac{a + 3S_{y/x}}{b} \quad (14)$$

$$LDC = \frac{a + 10S_{y/x}}{b} \quad (15)$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}} \quad (16)$$

donde:

a = intercepto en y de la curva de calibración.

b = pendiente de la curva de calibración.

$S_{y/x}$ = Error estándar de estimación del intercepto en y.

n = es el número de muestras.

y_i = área del pico.

\hat{y}_i = área del pico ajustada (se obtiene con la ecuación de la curva de calibración a una concentración dada).

Resultados y discusión

3.1 Análisis de muestras de cascarón de huevo

En la Figura 7 se muestran los cromatogramas obtenidos de las muestras de cascarón de huevo, así como un cromatograma de una mezcla de los cuatro estrógenos a una concentración de 30 ppm.

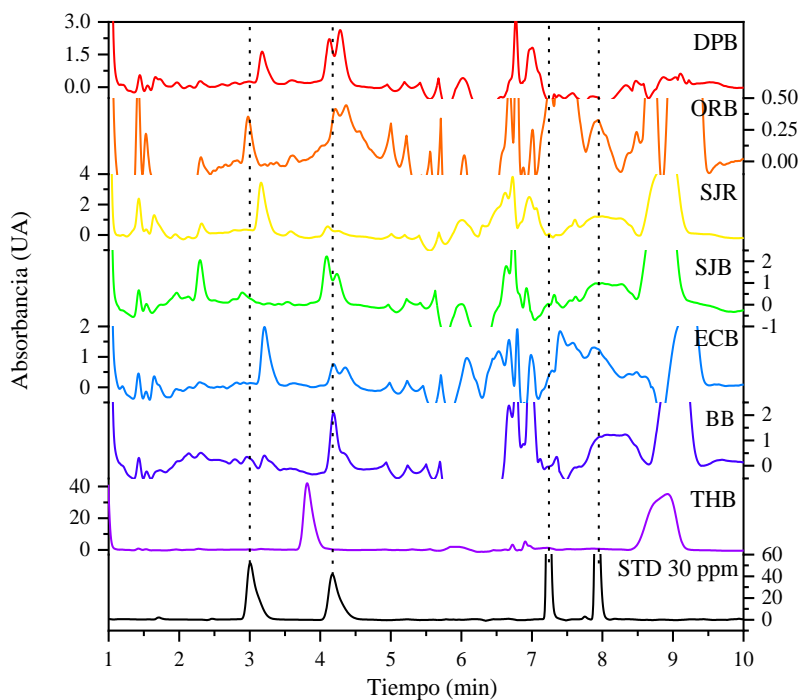


Figura 7. Cromatogramas, obtenidos con el método cromatográfico en columna semi-micro, de las muestras de cascarón de huevo y de los cuatro estrógenos de estudio en mezcla.

En la Tabla 4 se enlistan los picos de interés.

Tabla 4. Picos de interés de las muestras de cascarones de huevo de las marcas analizadas.

Analito	Marca de la muestra						
	DPB	ORB	SJR	SJB	ECB	BB	THB
17- β Estradiol	+	+	+	x	+	x	x
17- α Etinilestradiol	+	+	x	+	x	+	+
Progesterona	x	x	x	x	x	x	x
Benzoato de estradiol	x	x	x	x	x	x	x

+ Indica la aparición de un pico de la muestra cercano a un tiempo de retención de los estándares de los estrógenos.

x Indica la ausencia de picos de la muestra cercanos a los tiempos de retención de los estándares de los estrógenos.

Con una revisión visual, se aprecia en los cromatogramas de las 7 muestras de cascarón de huevo picos en la región de tiempo de 3 a 4.5 minutos que coincide con los tiempos de retención de los picos de E2 y EE2 en el cromatograma de los estándares. Las muestras de los cascarones de las marcas Doña Pris y Orgánicos presenta dos picos que están cercanos a los tiempos de retención tanto de E2 como de EE2. Por su parte, las muestras de las marcas San Juan (huevos rojos) y El Calvario presentan un pico cercano al tiempo de retención del E2. Por otro lado, las muestras de las marcas San Juan (huevo blanco), Bachoco y Tehuacán presentan un pico cercano al tiempo de retención del pico de EE2. En los cromatogramas se aprecia que el pico de las muestras cercano al tiempo de retención de EE2 (exceptuando el pico de la muestra de la marca Tehuacán) no está resuelto, y parece un compuesto con una polaridad similar que eluye en un tiempo cercano.

Es de especial interés la muestra de cascara de huevo de la marca Tehuacán porque presenta un pico en el minuto 3.8 con un área de 6.637 min·UA, que es grande comparado con los picos de las otras muestras, si bien no coincide ni con el tiempo de retención de E2 ni con el de EE2, sí está cercano al tiempo de retención éstos.

Es necesario hacer más análisis para determinar si los picos que presentan las muestras son o no los estrógenos que en este estudio se analizaron. Podrían analizarse las muestras por HPLC, pero esta vez acoplado a un detector de arreglo de diodos para comparar el espectro UV-Vis, o bien, a un espectrómetro de masas se podría conocer la masa exacta del compuesto, así como su espectro de masas y determinar su identidad.

3.2 Extracción en fase sólida

Los resultados del porcentaje de recuperación de extracción en fase sólida para las dos muestras se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5. Porcentaje de recuperación para la extracción en fase solida de cada uno de los cuatro estrógenos para las dos composiciones.

	Muestra en (20:80) H ₂ O- MeOH	Muestra en (90:10) H ₂ O- MeOH
	Recuperación (%)	Recuperación (%)
17-β Estradiol	3.516	87.118
17-α Etinilestradiol	8.526	88.236
Progesterona	25.696	
Benzoato de estradiol	32.302	

La extracción en fase sólida comparte grandes similitudes con la cromatografía de líquidos, la diferencias entre ambos es el objetivo: mientras que en cromatografía de líquidos se quiere que los analitos interactúen lo suficiente con la fase estacionaria para separarse y en un tiempo corto eluyan, en la extracción en fase sólida se necesita que los analitos se queden

retenidos en la fase estacionaria hasta que pase en su totalidad la fase móvil, sin que sean arrastrados por ella, para posteriormente hacer que los analitos eluyan con un volumen menor de un disolvente que los desorba de la fase estacionaria. De lo anterior, se deduce que el medio en el que estén disueltos los analitos juega un rol importante en la extracción en fase sólida. En este estudio, los porcentajes de recuperación con la muestra en (20:80) H₂O-MeOH fueron bajos debido a que los cuatro estrógenos tuvieron una mayor afinidad por la fase móvil que por la fase estacionaria del cartucho de SPE y no logró retenerlos. Al cambiar la polaridad de la fase móvil con la evaporación al vacío del metanol y posterior aforo con agua en la muestra en (90:10) H₂O-MeOH, los estrógenos tuvieron una mayor afinidad por la fase estacionaria del cartucho que por la fase móvil y quedaron retenidos, lo cual se refleja en el porcentaje de recuperación que es de 87 y 88% para E2 y EE2 respectivamente, que es mayor al criterio de aceptación del 85% de recuperación. Con los cartuchos Discovery® DSC-18 la recuperación fue de entre 0.1 a 5 % respectivamente.

3.3 Espectros de absorción de los estrógenos

Inicialmente, se midieron los espectros de absorción de ultravioleta de los cuatro estrógenos (Figura 8), con el fin de determinar una longitud de onda a la que todos los analitos tuvieran la mayor absorbancia posible para el análisis por cromatografía de líquidos con el detector de multi-onda.

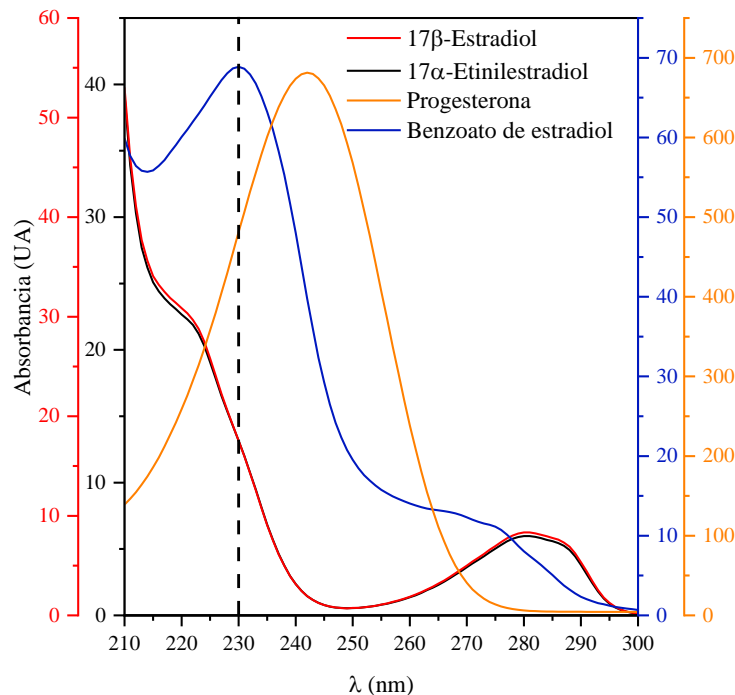


Figura 8. Espectros de absorción en la región ultravioleta del espectro electromagnético de los cuatro estrógenos de estudio.

Los máximos de absorción no coinciden entre los cuatro estrógenos debido a las diferencias estructurales que presentan, lo que provoca absorción en diferentes regiones del espectro ultravioleta porque existen diferentes transiciones electrónicas. Los espectros de absorción de 17β -estradiol y 17α -etinilestradiol coinciden en gran medida, debido a que su estructura es similar, pues únicamente varían los grupos funcionales enlazados en el carbono 17. Se buscó una longitud en la que los cuatro estrógenos presentaran una absorbancia alta y el mejor punto posible, se determinó en 230 nm, porque es una longitud en la que todos absorben y que coincide con el máximo de absorción del benzoato de estradiol (línea discontinua en Figura 8).

3.4 Análisis por cromatografía de líquidos

La Figura 9 muestra el cromatograma obtenido con la columna Zorbax SB C18 y en la Tabla 5 se presentan los tiempos de retención para cada uno de los estrógenos analizados, así como los parámetros de la aptitud del sistema cromatográfico.

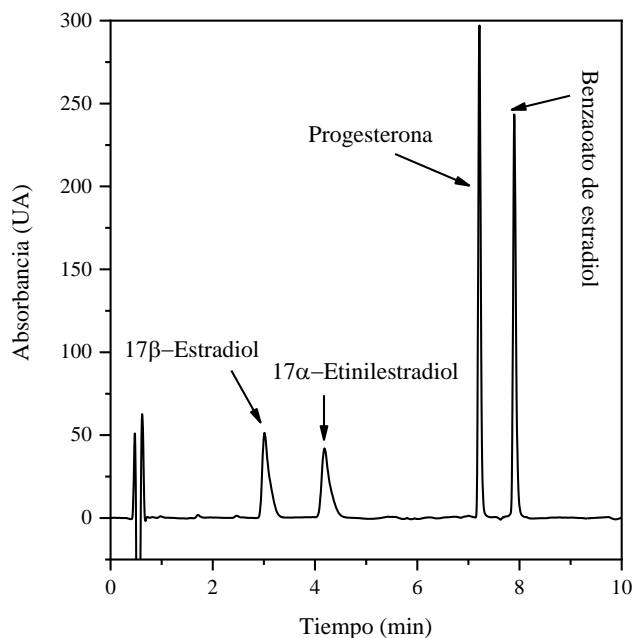


Figura 9. Cromatograma de los cuatro estrógenos obtenido con las condiciones del método cromatográfico en columna semi-micro.

En cromatografía de líquidos fase reversa, los analitos eluyen en orden del más polar al menos polar. La columna utilizada contiene una fase estacionaria de base de sílica recubierta con cadenas alifáticas de 18 carbonos que son grupos no polares. Los analitos más polares tienen una menor afinidad por la fase estacionaria de la columna por lo que eluyen primero que los analitos menos polares. De los estrógenos analizados, el 17β-estradiol es el más polar y eluye en primer

lugar. La polaridad de los estrógenos del estudio, se encuentra en el siguiente orden decreciente: 17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol, progesterona y benzoato de estradiol.

La altura de los picos está en función de la absorbancia que a su vez está regida por la absorptividad molar, que es única para cada sustancia. En la Tabla 6 se resumen los tiempos de retención de los cuatro estrógenos de estudio, así como los parámetros de la prueba de aptitud del sistema cromatográfico.

Tabla 6. Parámetros de la prueba de aptitud del sistema del método cromatográfico en columna semi-micro.

Analito	Tiempo de retención (min)	k	α	R _s	F	N _{ef}	H _{ef} (μm)	h _{ef}
17- β Estradiol	3.17	4.76	1.47	3.70	2.09	2883	17.3	9.6
17- α Etinilestradiol	4.39	6.97			1.83			
Progesterona	7.20	12.09	1.10	3.45	1.60			
Benzoato de estradiol	7.89	13.34			2.09			

α y R únicamente se determinaron para picos vecinos cercanos.
N_{ef}, H_{ef} y h_{ef} se determinó a partir del pico de 17 α -etinilestradiol.

De los datos de la Tabla 4 es posible asegurar que los cuatro estrógenos cumplen con los criterios para el factor de retención el cuál se fijó entre 2 y 20. Esto indica que están interactuando el suficiente tiempo con la fase estacionaria de la columna y no se están quedando demasiado tiempo con las condiciones del método cromatográfico en columna semi-micro.

En el caso del factor de separación, este es aceptable para los picos vecinos cercanos de estrógenos debido a que ambos factores son mayores a uno, lo cual indica que los ápices de cada pareja de picos están separados. Este factor únicamente es necesario calcularlo en el caso de

picos cercanos, la pareja de 17α -etinilestradiol y progesterona es un ejemplo, ya que la separación es grande.

Es posible afirmar que los cuatros picos correspondientes a los estrógenos de este estudio, están completamente resueltos ya que ambos valores de resolución son mayores a dos.

La forma de un pico idealmente se debería de asemejarse a un pico gaussiano. Ninguno de los picos de los estrógenos es simétrico pues los valores de factor de asimetría son mayores a 1.5. Adicionalmente a esto, se aprecia de manera visual en el cromatograma de la Figura 8 que los picos tienen una cola, esto es especialmente evidente en los primeros dos picos. Los picos asimétricos dificultan la integración del pico debido a la indefinición de sus límites, y producen baja precisión y bajar repetitividad entre ensayos. La asimetría en este caso, se puede atribuir a que hay interacciones secundarias dentro de la columna. La columna puede tener silanoles residuales que, bajo condiciones de pH medio, suelen ser activos y generar interacciones secundarias por puentes de hidrógeno entre el grupo silanol y los analítos.

La Figura 10 muestra el cromatograma obtenido con la columna Zorbax Eclipse XDB C18 para HPLC.

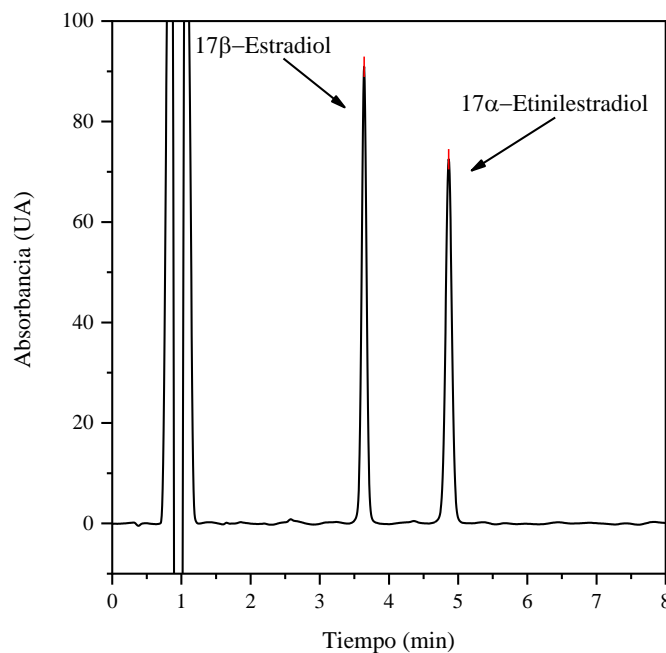


Figura 10. Cromatograma de la mezcla de E2 y EE2 obtenido con el método cromatográfico en columna convencional.

En la Tabla 7 se resumen los tiempos de retención de E2 y EE2 así como los parámetros de la prueba de para determinar la aptitud del sistema cromatográfico del método cromatográfico en columna convencional.

Tabla 7. Parámetros de la prueba de aptitud del sistema del método cromatográfico en columna convencional.

Analito	Tiempo de retención (min)	k	α	R_s	F	N_{ef}	H_{ef} (μm)	h_{ef}
17- β Estradiol	3.64	2.86	1.45	5.40	0.91	8555	17.5	3.5
17- α Etinilestradiol	4.87	4.16			0.98			

α y R únicamente se determinaron para picos vecinos cercanos.
 N_{ef} , H_{ef} y h_{ef} se determinó a partir del pico de 17 α -etinilestradiol.

Ambos picos cumplen con el criterio para el factor de retención, cuyo valor debe ser entre 2-20. El factor de separación es aceptable pues es mayor a uno. A su vez, los dos picos están totalmente resueltos de acuerdo al criterio de aceptación de la resolución ($R_s > 2$). Finalmente, el factor de asimetría de los picos es cercano a uno y no sobre pasa 1.5 por lo que es posible afirmar que los picos se desvían poco de la simetría.

Si bien, no hay un criterio universal para evaluar la eficiencia de un sistema cromatográfico, es posible comparar dos sistemas cromatográficos entre sí para determinar cuál es más eficiente uno respecto al otro, siempre y cuando se realice bajo las mismas condiciones experimentales. En este caso, ambos sistemas cromatográficos se pueden comparar por medio de la altura equivalente de plato teórico reducida debido a que este parámetro es independiente de la longitud de la columna y del tamaño de partícula. Para la columna semi-micro (SB-C18) tuvo un valor de 9.6 en este parámetro, esto se traduce a que los analitos deben interactuar con 9-10 partículas para alcanzar un equilibrio entre la fase estacionaria y la fase móvil. Este valor nos indica, según el criterio establecido, que la columna está muy deteriorada. Por otra parte, para la columna (XDB-C18) obtuvo un valor de 3.5. Esta columna se puede considerar que es aceptable. Por lo anterior, la columna más eficiente es la columna XDB-C18 del método cromatográfico en columna convencional.

3.5 Validación del método cromatográfico en columna semi-micro

La validación de un método se realizó únicamente para el método cromatográfico en columna semi-micro y a continuación se muestran los resultados.

La selectividad de un método analítico es la propiedad para producir una señal sólo a la presencia del analito. La Figura 11 muestra los cuatro cromatogramas de los estrógenos inyectados por

separado, así como un cromatograma obtenido de la mezcla de todos, analizados con las condiciones primer método.

La selectividad del método cromatográfico en columna semi-micro es aceptable ya que cada pico de los estrógenos inyectados individualmente corresponde con un pico del cromatograma de los estrógenos inyectados en mezcla sin interferir las señales de unos con otros, los picos están resueltos de frente a cola, por lo que en el método cada analito da una señal medible y sólo para cada analito, respectivamente.

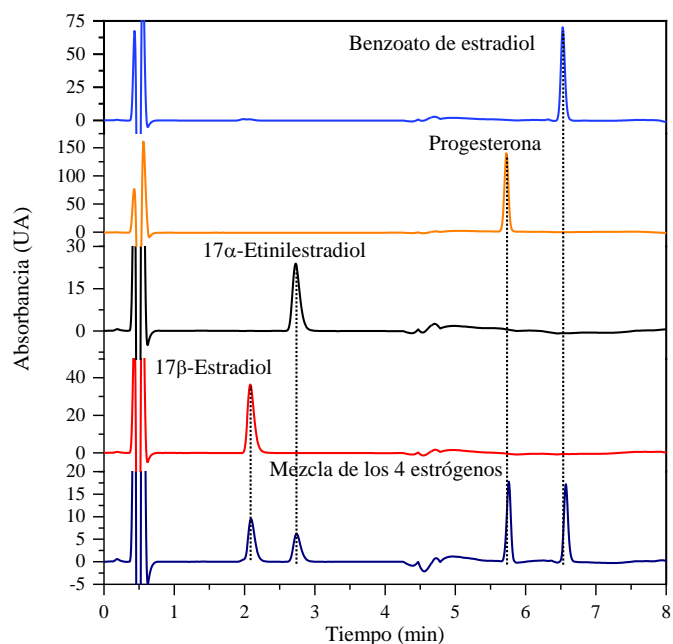


Figura 11. Cromatogramas de los cuatro estrógenos inyectados individualmente y en mezcla obtenidos con el método cromatográfico en columna semi-micro.

En la Figura 12 se presentan las curvas de calibración de los estrógenos obtenidas con el método cromatográfico en columna semi-micro.

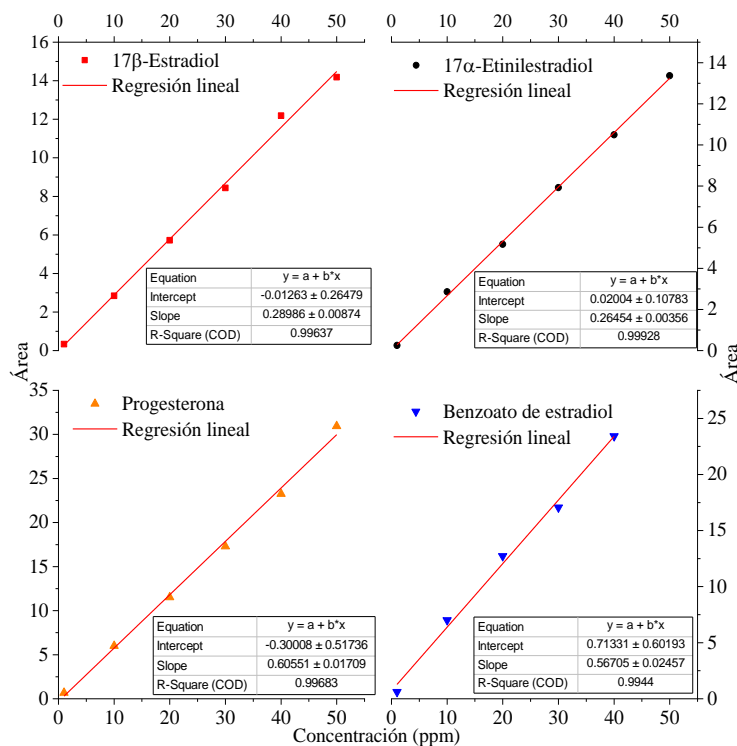


Figura 12. Curvas de calibración correspondientes a los cuatro estrógenos obtenidas por el método cromatográfico en columna semi-micro.

La linealidad de un método analítico se relaciona a la proporcionalidad que hay entre la concentración de un analito y su respuesta. En cromatografía, el área de un pico, correspondiente a un analito, está directamente relacionada con su concentración. El analito al salir de la columna pasa a un detector que mide la absorbancia a una longitud de onda concreta en un instante del tiempo (en el caso del detector de multi-onda). Las moléculas de un mismo analito no eluyen todas justo en el mismo momento, idealmente la elución describe una distribución normal de cantidad en función del tiempo. Cuando se grafica la absorbancia en función del tiempo se forman picos con forma gaussiana correspondientes a cada analito.

En la curva de calibración del benzoato de estradiol se omitió el punto en 50 ppm debido a que a esta concentración no había una relación lineal entre la concentración y el área del pico, debido a la desviación de la Ley de Lambert-Beer a dicha concentración.

En la Tabla 8 se resumen los parámetros de la validación del método cromatográfico: contraste t para la linealidad, desviación estándar relativa para la precisión, los resultados del contraste t para comprobar la exactitud y los límites de cuantificación y detección.

Tabla 8. Parámetros para la validación obtenidos para el método cromatográfico en columna semi-micro.

Analitos	Linealidad (t_r)	Precisión RDS(%)	Exactitud (t_{ob})	Límite de cuantificación (ppm)	Límite de detección (ppm)
17- β Estradiol	33.273	5.464	4.677	12.399	3.689
17- α Etinilestradiol	75.566	5.322	4.621	5.628	1.741
Progesterona	35.299	3.661	1.952	11.142	2.996
Benzoato de estradiol	23.081	1.118	37.565	14.688	5.287

Se observó una correlación lineal entre el área de los picos y la concentración para los cuatro estrógenos del método cromatográfico en columna semi-micro y todos superaron el criterio de aceptación de 2.776 para E2, EE2 y progesterona, y 3.182 para el benzoato de estradiol, por ende, se rechazó la hipótesis de no linealidad con una de confianza del 95%. Por lo anterior, se puede afirmar que el método cromatográfico en columna semi-micro es lineal en el intervalo de concentraciones estudiadas para los cuatro estrógenos.

La precisión de un método analítico indica el grado de concordancia entre los resultados obtenidos al aplicar el mismo proceso experimental de manera repetida sobre la misma muestra

bajo condiciones constantes establecidas. El método únicamente es preciso para el benzoato de estradiol porque su desviación estándar relativa fue inferior al criterio de aceptación. Por otro lado, los valores de desviación estándar relativa para E2, EE2 y progesterona fueron mayores al criterio de aceptación que es del 2 %. Si bien, esta falta de precisión puede deberse a errores aleatorios, también se pueden atribuir con la asimetría que tienen los picos cromatográficos en este primer método. Como se mencionaba en la sección anterior 3.4, la asimetría de los picos puede provocar baja repetitibilidad debido a que es difícil saber dónde comienza y donde acaban los picos, causando error en la medición del área del pico entre mediciones, lo que conduce a variaciones significativas en el cálculo de concentración entre muestras con una concentración igual.

La exactitud de un método analítico es la capacidad de dar resultados cercanos al valor verdadero. Se demostró que el método es exacto para progesterona según el criterio $t_{ob} < t_{\alpha}$ en este caso 2.306, para un intervalo de confianza del 95%. Por otro lado, el valor de t_{ob} para el E2, EE2 y benzoato de estradiol no cumplieron con el criterio de aceptación por lo que el método no es exacto para estos estrógenos. Esta inexactitud se pudo deber a errores sistemáticos al momento de preparar la disolución.

El límite de cuantificación de un método analítico es la menor cantidad del analito que se puede cuantificar con precisión y exactitud con el método. En este sentido, el método cromatográfico en columna semi-micro tuvo unos límites de cuantificación de entre 5.628-14.688 ppm para los estrógenos analizados. Por su parte, el límite de detección de un método analítico es la menor cantidad del analito que se puede detectar de manera confiable, en este método el límite de detección estuvo entre 1.741-5.287 ppm para los estrógenos que se analizaron.

Conclusiones

Se desarrolló una metodología para la extracción y cuantificación de estrógenos en muestras sólidas, empleando la extracción en fase sólida para concentrar los estrógenos y la cromatografía HPLC para la cuantificación. Con la metodología desarrollada, se lograron rendimientos superiores al 85 % en comparación con los porcentajes de recuperación (de 3-32%) que se obtienen empleando las metodologías que se reportan cuando los estrógenos se extraen en agua, donde es posible la utilización casi directa de los cartuchos de SPE.

El método cromatográfico en columna semi-micro es lineal y selectivo para los 17β -estradiol, 17α -etinilestradiol, progesterona y benzoato de estradiol, sin embargo, únicamente es preciso para el benzoato de estradiol y exacto para progesterona.

El método cromatográfico en columna semi-micro permitió la detección de 17β -estradiol, 17α -etinilestradiol, progesterona y benzoato de estradiol en concentraciones del orden de las partes por millón.

Se propuso el método cromatográfico en columna convencional para 17β -estradiol y 17α -etinilestradiol que resuelve la principal causa de la imprecisión del método cromatográfico en columna semi-micro que se atribuyó a la asimetría de los picos.

Referencias

- [1] E. Lundanes, L. Reubsaet, T. Greibrokk, *Chromatography: Basic Principles, Sample Preparations and Related Methods*, First Edit, Wiley, 2013.
- [2] A. Braithwaite, J.F. Smith, *Chromathographic methods*, Fifth Edit, Klumer Academic, 1999.
- [3] D.A. Skoog, J. Hanlan, D.M. West, *Principles of Instrumental Analysis*, Seventh Ed, Cengage Learning, 2016.
- [4] O.A. Quattrocchi, S.A. de Andrizzi, F.R. Laba, *Introducción a la HPLC: Aplicación y Práctica*, Primera Ed, Edición del autor, 1992.
- [5] L.S. Ettre, *Nomenclature for chromatography (iupac recommendations 1993)*, *Pure Appl. Chem.* 65 (1993) 819–872. doi:10.1351/pac199365040819.
- [6] D. Harris, C. Lucy, *Quantitative Chemical Analysis*, Ninth Edit, W. H. Freeman & Company, 2016.
- [7] G. Christian, P. Dasgupta, K. Schug, *Analytical chemistry*, Seventh Ed, Wiley, 2014.
- [8] L. Snyder, J. Kirkland, J. Dolan, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, Third Edit, Wiley, 2010.
- [9] E.M. Thurman, M.S. Mills, *Solid-Phase Extraction: principles and practice*, First Edit, Wiley, 1998.
- [10] J.S. Fritz, *Analytical Solid Phase Extraction*, First Edit, Wiley, 2004.
- [11] D.L. Pavia, G.M. Lampman, G.S. Kriz, *Introduction to Spectroscopy*, Third Edit, Thomson Learning, 2001.
- [12] F. Rouessac, A. Rouessac, *Chemical analysis: modern instrumentation methods and techniques*, Second Edi, Wiley, n.d.
- [13] R.P.W. Scott, *Chromatographic detectors: design, function, and operation*, First Edit, Marcel Dekker, Inc., 1996.
- [14] M. Adeel, X. Song, Y. Wang, D. Francis, Y. Yang, *Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: A critical review*, *Environ. Int.* 99 (2017) 107–119. doi:10.1016/j.envint.2016.12.010.
- [15] R.A. Edgren, F.Z. Stanczyk, *Nomenclature of the gonane progestins*, *Contraception.* 60 (1999) 313. doi:10.1016/S0010-7824(99)00101-8.
- [16] H. Hamid, C. Eskicioglu, *Fate of estrogenic hormones in wastewater and sludge*

- treatment: A review of properties and analytical detection techniques in sludge matrix, *Water Res.* 46 (2012) 5813–5833. doi:10.1016/j.watres.2012.08.002.
- [17] S.L. Shrestha, F.X.M. Casey, H. Hakk, D.J. Smith, G. Padmanabhan, Fate and transformation of an estrogen conjugate and its metabolites in agricultural soils, *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 11047–11053. doi:10.1021/es3021765.
- [18] S.C. Moore, C.E. Matthews, X. Ou Shu, K. Yu, M.H. Gail, X. Xu, B.T. Ji, W.H. Chow, Q. Cai, H. Li, G. Yang, D. Ruggieri, J. Boyd-Morin, N. Rothman, R.N. Hoover, Y.T. Gao, W. Zheng, R.G. Ziegler, Endogenous Estrogens, Estrogen Metabolites, and Breast Cancer Risk in Postmenopausal Chinese Women, *J. Natl. Cancer Inst.* 108 (2016) 1–12. doi:10.1093/jnci/djw103.
- [19] I. Wocławek-Potocka, C. Mannelli, D. Boruszewska, I. Kowalczyk-Zieba, T. Waśniewski, D.J. Skarzyński, Diverse effects of phytoestrogens on the reproductive performance: Cow as a model, *Int. J. Endocrinol.* 2013 (2013). doi:10.1155/2013/650984.
- [20] N. Bolong, A.F. Ismail, M.R. Salim, T. Matsuura, A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal, *Desalination.* 238 (2009) 229–246. doi:10.1016/j.desal.2008.03.020.
- [21] L.S. Shemesh, M. and Shore, Effects of Environmental Estrogens on Reproductive Parameters in Domestic Animals, *Isr. J. Vet. Med.* 67 (2012) 6–10.
- [22] N.M. Gatto, D. Deapen, S. Stoyanoff, R. Pinder, S. Narayan, Y. Bordelon, B. Ritz, Parkinsonism and Related Disorders Lifetime exposure to estrogens and Parkinson's disease in California teachers, *Park. Relat. Disord.* 20 (2014) 1149–1156. doi:10.1016/j.parkreldis.2014.08.003.
- [23] E. Rose, K.A. Paczolt, A.G. Jones, The effects of synthetic estrogen exposure on pre mating and post mating episodes of selection in sex-role-reversed Gulf pipefish, *Evol. Appl.* 6 (2013) 1160–1170. doi:10.1111/eva.12093.
- [24] R.F. Salla, F.U. Gamero, R.Z. Rissoli, S.E. Dal-Medico, L.M. Castanho, C. dos S. Carvalho, E.C.M. Silva-Zacarin, A.L. Kalinin, F.C. Abdalla, M.J. Costa, Impact of an environmental relevant concentration of 17 α -ethinylestradiol on the cardiac function of bullfrog tadpoles, *Chemosphere.* 144 (2016) 1862–1868. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.10.042.
- [25] P. Hallgren, A. Nicolle, L.A. Hansson, C. Brönmark, L. Nikoleris, M. Hyder, A. Persson,

- Synthetic estrogen directly affects fish biomass and may indirectly disrupt aquatic food webs, *Environ. Toxicol. Chem.* 33 (2014) 930–936. doi:10.1002/etc.2528.
- [26] A.K. Hotchkiss, C. V. Rider, C.R. Blystone, V.S. Wilson, P.C. Hartig, G.T. Ankley, P.M. Foster, C.L. Gray, L.E. Gray, Fifteen years after “wingspread” - Environmental endocrine disruptors and human and wildlife health: Where we are today and where we need to go, *Toxicol. Sci.* 105 (2008) 235–259. doi:10.1093/toxsci/kfn030.
- [27] J. Kjær, P. Olsen, K. Bach, H.C. Barlebo, F. Ingerslev, M. Hansen, B.H. Sørensen, Leaching of estrogenic hormones from manure-treated structured soils, *Environ. Sci. Technol.* 41 (2007) 3911–3917. doi:10.1021/es0627747.
- [28] W. Yan, Y. Li, L. Zhao, J.M. Lin, Determination of estrogens and bisphenol A in bovine milk by automated on-line C30 solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 7539–7545. doi:10.1016/j.chroma.2009.05.002.
- [29] J. Kay, *Analyses for Hormonal Substances in Food Producing Animals*, 2009. doi:10.1039/9781849730723.
- [30] Fifty-second report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Evaluation of certain veterinary drug residues in food, 2000.
- [31] L. Wang, Y.Q. Cai, B. He, C.G. Yuan, D.Z. Shen, J. Shao, G. Bin Jiang, Determination of estrogens in water by HPLC-UV using cloud point extraction, *Talanta.* 70 (2006) 47–51. doi:10.1016/j.talanta.2006.01.013.
- [32] P. Kozlík, Z. Bosáková, E. Tesařová, P. Coufal, R. Čabala, Development of a solid-phase extraction with capillary liquid chromatography tandem mass spectrometry for analysis of estrogens in environmental water samples, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 2127–2132. doi:10.1016/j.chroma.2010.10.033.
- [33] S. Kobayashi, Y. Saito, A. Osawa, E. Katsumata, I. Karaki, K. Nagaoka, K. Taya, G. Watanabe, Embryonic sex steroid hormones accumulate in the eggshell of loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*), *Gen. Comp. Endocrinol.* 224 (2015) 11–17. doi:10.1016/j.ygcen.2015.05.013.
- [34] J. Miller, J. Miller, *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*, Cuarta Edición, Pearson Education Limited, 2002.