

**UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN**

**Escuela de Posgrado**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN GESTIÓN  
AMBIENTAL Y DESARROLLO SOSTENIBLE**

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE MÉTODO POR UHPLC-DAD,  
PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE RESIDUOS  
DE ESTRONA Y PROGESTERONA EN EL AFLUENTE  
Y EFLUENTE DE LA PTAR - ILO**

**TESIS**

**PRESENTADA POR:**

**CLARA NELY CAMPOS QUIRÓZ**

Para optar el Grado Académico de:

**MAESTRO EN CIENCIAS (*MAGISTER SCIENTIAE*) CON MENCIÓN  
EN GESTIÓN AMBIENTAL Y DESARROLLO SOSTENIBLE**

**TACNA – PERÚ**

**2023**

**UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN**

**Escuela de Posgrado**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN GESTIÓN AMBIENTAL  
Y DESARROLLO SOSTENIBLE**

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE MÉTODO POR UHPLC-DAD,  
PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE RESIDUOS  
DE ESTRONA Y PROGESTERONA EN EL AFLUENTE  
Y EFLUENTE DE LA PTAR - ILO**

Tesis sustentada y aprobada el 16 de febrero del 2023; estando el jurado calificador integrado por:

PRESIDENTE :



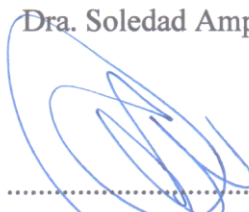
.....  
Dr. Edilberto Pablo Mamani López

SECRETARIA :



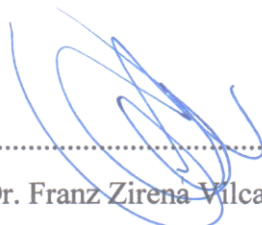
.....  
Dra. Soledad Amparo Bornás Acosta

MIEMBRO :



.....  
Dr. Franz Zirena Vilca

ASESOR :



.....  
Dr. Franz Zirena Vilca

## CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, Franz Zirena Vilca, en mi condición de asesor acreditado por Resolución Escuela de Posgrado N° 11510-2022-ESPG/UNJBG con fecha 28 de junio de 2022, de la tesis titulado Desarrollo y validación de método por UHPLC-DAD, para la detección y cuantificación de estrona y progesterona en el afluente y efluente de la PTAR-Ilo.

Presentado por la Ingeniera Clara Nely Campos Quiróz, para optar el grado académico de Maestro en Ciencias (Magister Scientiae) con mención en Gestión Ambiental y Desarrollo Sostenible.

Habiendo cumplido con lo establecido en el reglamento de originalidad y de similitud de trabajos de investigación y producción intelectual, considerando que según su revisión, evaluación y análisis realizado a través del software de similitud textual TURNITIN, cuenta con el nivel de similitud permitido, cuyo porcentaje es 9%. Por lo que CERTIFICO LA SIMILARIDAD de la TESIS, está de acuerdo al nivel permitido para continuar con los trámites correspondientes y para su publicación en el repositorio institucional.

Se emite el presente certificado, con fines de continuar con los trámites respectivos de obtención del grado académico.



---

Dr. Franz Zirena Vilca

DNI 01341834

Asesor

**DEDICATORIA**

*A mis abuelitos Evelinda y Tomás  
por su apoyo incondicional y ser artífices  
de quien soy.*

*Con mucho cariño a mi esposo Franz,  
y mis hijos Jesús y Dereck,  
por ser mi gran soporte, y por  
su gran amor y cariño.*

*A mis hermanos:  
Annie, Jorge, Walter y Euler,  
Mis padres Rosa y Walter,  
por ser ejemplo de superación y  
perseverancia.*

## **AGRADECIMIENTO**

A mi asesor Franz Zirena Vilca, por la orientación en el desarrollo del presente trabajo de investigación.

Al Laboratorio de Contaminantes Orgánicos y Ambiente del Instituto de Investigación para el Desarrollo del Perú, de la Universidad Nacional de Moquegua, por permitirme ser parte del proyecto “Presencia de residuos de antibiótico en el río Osmore, en agua potable de las ciudades de Ilo y Moquegua y su relación con la salud de la población”.

A los que forman parte del equipo del GICOA: Gina, Jack, Donald, Yoselin, Anyela, Ing. José Luis, Dra. Ingrid, por el apoyo constante en la ejecución del presente trabajo de investigación.

A la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Escuela de posgrado, por ser esencial en nuestra formación académica.

A los docentes miembros del jurado, el Dr. Edilberto Pablo Mamani López, la M. Sc. Soledad Amparo Bornás Acosta, y el Dr. Carlos Huisa Ccori, por las recomendaciones y aportes, que contribuyeron con el presente trabajo de investigación.

## ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA .....	iv
AGRADECIMIENTO .....	v
RESUMEN .....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
INTRODUCCIÓN .....	1
CAPÍTULO I .....	4
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	4
1.1 FORMULACIÓN DE LOS PROBLEMAS .....	4
1.1.1. Problema general .....	4
1.1.2. Problemas específicos .....	4
1.2 JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN .....	4
1.3 OBJETIVOS .....	5
1.4.1. Objetivo General .....	5
1.4.2. Objetivos específicos .....	5
1.4 HIPÓTESIS.....	6
1.5.1.HipótesisGeneral.....	6
1.5.2.Hipótesis Específicas .....	6
CAPÍTULO II.....	7
MARCO TEÓRICO .....	7
2.1 ANTECEDENTES DEL ESTUDIO.....	7
2.1.1. Internacionales .....	7
2.1.2. Nacionales.....	9
2.2 TEORÍAS QUE SUSTENTAN LA INVESTIGACIÓN.....	10
2.2.1. Contaminantes emergentes (CE).....	10

2.2.2.Los compuestos disruptores endocrinos .....	11
2.2.3.Las hormonas esteroides .....	15
2.2.4.Hormonas estudiadas .....	17
2.2.5.Presencia de hormonas esteroides en aguas residuales.....	22
2.2.6.Degradación de hormonas .....	22
2.2.7.Fotodegradación de hormonas .....	23
2.2.8.Cromatografía .....	23
2.3 MARCO CONCEPTUAL .....	26
2.3.1.Definición de términos.....	26
CAPÍTULO III.....	31
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN .....	31
3.1 Caracterización o tipo del diseño de investigación.....	31
3.2 Población y/o muestra de estudio .....	31
3.2.1. Población.....	31
3.2.2. Tipo de muestra.....	31
3.2.3. Tamaño de muestra .....	31
3.3 Ámbito de estudio.....	31
3.4 Instrumentos.....	33
3.4.1. Reactivos y materiales .....	33
3.4.2. Equipos .....	33
3.4.3. Materiales, equipos de campo e indumentaria de protección .....	33
3.5 Procedimientos.....	34
3.5.1. Preparación de Fase Móvil .....	34
3.5.2. Fase estacionaria .....	34
3.5.3. Preparación de soluciones estándar .....	35
3.5.4. Preparación de mix de E1 y P4.....	35

3.5.5. Desarrollo del método cromatográfico para el análisis de agua de afluente y efluente en PTAR .....	36
3.5.6. Condiciones cromatográficas.....	36
3.5.7. Validación del Método analítico.....	37
3.5.8. Etapa de monitoreo .....	39
3.5.9. Protocolo para la extracción de muestras .....	40
3.6 Tratamiento de datos (análisis estadísticos).....	41
CAPÍTULO IV .....	42
RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	42
4.1 Análisis de campo .....	42
4.2 Validación del método cromatográfico.....	43
4.2.1 Selectividad.....	44
4.2.2 Linealidad.....	45
4.2.3 LÍMITE DE DETECCIÓN (LD) .....	48
4.2.4 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LQ).....	48
4.2.5 Recuperación.....	48
4.3 Concentración de hormonas encontradas en los puntos de monitoreo .....	52
4.4 Análisis estadístico.....	53
DISCUSIÓN .....	55
CONCLUSIONES .....	62
RECOMENDACIONES.....	63
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	64
ANEXOS .....	82

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 <i>Tipos de compuestos disruptores endocrinos</i> .....	13
Tabla 2 <i>Hormonas esteroides naturales y sintéticas más importantes</i> .....	16
Tabla 3 <i>Características físico-químicas de las hormonas estudiadas</i> .....	21
Tabla 4 <i>Evaluación de la selectividad</i> .....	27
Tabla 5 <i>Cálculo de la recta de regresión lineal</i> .....	28
Tabla 6 <i>Análisis fisicoquímicos de muestras de agua residual del afluente de la PTAR Ilo</i> .....	42
Tabla 7 <i>Análisis fisicoquímicos de muestras de agua residual del efluente de la PTAR Ilo</i> .....	43
Tabla 8 <i>Cálculo de la curva de calibración para la E1</i> .....	46
Tabla 9 <i>Cálculo de la curva de calibración para la P4</i> .....	47
Tabla 10 <i>Cálculo del LD y LQ de la E1 y P4</i> .....	48
Tabla 11 <i>Cálculos de la recuperación de E1 y P4</i> .....	50
Tabla 12 <i>Cálculo de la segunda recuperación de E1 y P4 (Repetibilidad)</i> .....	51
Tabla 13 <i>Concentraciones de E1 en el afluente y efluente de la PTAR de Ilo</i> .....	52

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 <i>Glándulas del sistema endocrino humano y sus respectivas hormonas segregadas</i> .....	11
Figura 2 <i>Producción de estrógeno en mujer y hombre</i> .....	18
Figura 3 <i>Estructura química de la Estrona</i> .....	20
Figura 4 <i>Estructura química de la progesterona</i> .....	21
Figura 5 <i>Componentes de un cromatograma, de dos picos correspondientes a los analitos (A y B)</i> .....	24
Figura 6 <i>Mapa de ubicación para la recolección de muestras en la PTAR-Ilo</i> .....	32
Figura 7 <i>Cromatograma del blanco de matriz para la selectividad</i> .....	44
Figura 8 <i>Cromatograma de hormonas estudiadas</i> .....	45
Figura 9 <i>Prueba de linealidad para la curva de calibración de la E1</i> .....	46
Figura 10 <i>Prueba de linealidad para la curva de calibración de la P4</i> .....	47
Figura 11 <i>Prueba de Wilcoxon para E1 en afluente y efluente de la PTAR de Ilo</i> .....	54
Figura 12 <i>Cromatógrafo UHPLC</i> .....	82
Figura 13 <i>Bomba de vacío</i> .....	82
Figura 14 <i>Centrífuga refrigerada</i> .....	83
Figura 15 <i>Balanza analítica</i> .....	83
Figura 16 <i>Purificador de agua</i> .....	84
Figura 17 <i>Equipo multiparámetro</i> .....	84
Figura 18 <i>Analitos estudiados</i> .....	85
Figura 19 <i>Propanol, Acetonitrilo y Metanol</i> .....	85
Figura 20 <i>Columna cromatográfica</i> .....	86
Figura 21 <i>Cartucho empleado para SPE</i> .....	86
Figura 22 <i>Punteras</i> .....	87
Figura 23 <i>Jeringas de 5 mL y filtros de 13 mm, con poros de 0,22 µm</i> .....	87
Figura 24 <i>Pesado de patrones analíticos, en balanza analítica</i> .....	88
Figura 25 <i>Solución madre para cada analito</i> .....	88
Figura 26 <i>Soluciones obtenidas para la curva de calibración</i> .....	89
Figura 27 <i>Desarrollo del método analítico cromatográfico por UHPLC-DAD</i> .....	89
Figura 29 <i>Toma de muestras de agua del afluente</i> .....	90

Figura 30	<i>Medición de parámetros fisicoquímicos en muestras de agua del afluyente...</i>	90
Figura 31	<i>Efluente de la PTAR-Ilo .....</i>	91
Figura 32	<i>Medición de parámetros fisicoquímicos en muestras de agua del afluyente...</i>	92
Figura 33	<i>Frascos con la toma de las muestras de agua residual .....</i>	92
Figura 34	<i>Filtrado de las muestras .....</i>	93
Figura 35	<i>Acondicionamiento de los cartuchos para extracción .....</i>	93
Figura 36	<i>Extracción de fase sólida de las muestras de agua de la PTAR-Ilo.....</i>	94
Figura 37	<i>Centrifugado de las muestras .....</i>	94
Figura 38	<i>Secado de muestras con concentrador de nitrógeno.....</i>	95
Figura 39	<i>Filtrado de muestras .....</i>	95
Figura 40	<i>Disposición en el vial para su posterior inyección en el equipo cromatográfico .....</i>	96
Figura 41	<i>Muestra final lista para su corrida en el cromatógrafo.....</i>	96

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A <i>Equipos y materiales usados en el desarrollo del presente trabajo</i> ..	82
Anexo B <i>Secuencia del desarrollo del proyecto</i> .....	88
Anexo C <i>Fichas de registro de campo utilizadas</i> .....	97
Anexo D <i>Cromatogramas de las muestras analizadas</i> .....	99

## RESUMEN

Los compuestos disruptores endocrinos, tienen impactos nocivos en la salud de los seres vivos, así como en el ambiente; además, estos compuestos, así como las hormonas esteroides estrogénicas y progestágenas, pueden alterar la calidad y el adecuado equilibrio de los ecosistemas acuáticos y la biodiversidad, aún en concentraciones ambientales muy bajas, estos alteran el crecimiento y el normal desarrollo de los seres vivos expuestas a estos compuestos, reportándose incluso la feminización de algunas poblaciones. Por tal razón, se desarrolló y validó un método de análisis cromatográfico por UHPLC-DAD, con el fin de detectar y cuantificar residuos de estrona y progesterona en aguas residuales de la PTAR de Ilo, para ello, se usó un sistema UHPLC-DAD con una columna InfinityLab Poroshell HPH-C18 (2,1 X 150 mm, 1,9  $\mu\text{m}$ ), a una temperatura de 25 °C, volumen de inyección 5  $\mu\text{L}$ . Para la fase móvil, se utilizó agua ultra pura y ACN, y la detección de los analitos se realizó con una longitud de onda a 230 nm. La validación del método se basó en el DOQ-CGCRE-008 donde se determinó que el mismo es selectivo y adecuado para este tipo de análisis. Las muestras de agua residual del afluente y efluente de la PTAR- Ilo analizadas, presentan residuos de estrona en un rango de (1,3 a 11,5 $\mu\text{g/L}$ ) y (1,8 a 8,2  $\mu\text{g/L}$ ) respectivamente. Sin embargo, estas no presentan residuos de progesterona.

**Palabras clave:** Disruptores endocrinos, agua contaminada, riesgo ambiental, salud pública y UHPLC-DAD

## **ABSTRACT**

Endocrine-disrupting compounds have harmful impacts on the health of living beings, as well as on the environment; in addition, these compounds, as well as estrogenic and progestogenic steroid hormones, can alter the quality and proper balance of aquatic ecosystems and biodiversity, even at very low environmental concentrations, they alter the growth and normal development of living beings exposed to these compounds, even reporting the feminization of some populations. For this reason, a chromatographic analysis method was developed and validated by UHPLC-DAD, to detect and quantify residues of estrone and progesterone in wastewater from the Ilo WWTP, using a UHPLC-DAD system with an InfinityLab Poroshell HPH-C18 column (2,1 X 150 mm, 1,9  $\mu\text{m}$ ), at a temperature of 25 °C, injection volume 5  $\mu\text{L}$ . For the mobile phase, ultrapure water and ACN were used, and analyte detection was performed with a wavelength of 230 nm. Method validation was based on DOQ-CGCRE-008 where the method was found to be selective and suitable for this type of analysis. The wastewater samples from the influent and effluent of the Ilo WWTP analyzed showed estrone residues in the range of (1,3 to 11,5  $\mu\text{g/L}$ ) and (1,8 to 8,2  $\mu\text{g/L}$ ), respectively. However, they do not show progesterone residues.

**Keywords:** Endocrine disruptors, contaminated water, environmental risk, public health, public health and UHPL-DAD

## INTRODUCCIÓN

Los residuos de estrógenos naturales y sintéticos, han sido detectada en diversos medios acuáticos (Guedes-Alonso et al., 2014; Torres et al., 2021), cuyas concentraciones encontradas en este ambiente se expresan en mg/L,  $\mu\text{g/L}$  y ng/L (Louros et al., 2021; Windsor et al., 2018). Las hormonas producidas naturalmente por animales y humanos como; estrona (E1), estradiol (E2) y estriol (E3), en el ambiente presentan medias vidas cortas (Adeel et al., 2017). Una de las hormonas sintéticas más utilizadas en humanos así como en animales, es el 17  $\alpha$ -etinilestradiol (EE2), esta se deriva del E2 (Ramírez-Montero et al., 2022), siendo la elaboración de píldoras anticonceptivas, la principal actividad que usa en su proceso de fabricación este ingrediente activo (Gao et al., 2017; Ramírez-Montero et al., 2022); por ende, el EE2, es el más potente, teniendo una concentración prevista sin efecto (PNEC) de 0,1 ng /L para la toxicidad crónica (Adeel et al., 2017). Después de ser administrados, los fármacos pueden ser metabolizados y/o excretados por medio de orina y heces, en forma de metabolitos (de França et al., 2020). En promedio el 60 % de mujeres del mundo entre 20 y 44 años usan métodos anticonceptivos orales, cuya dosis está comprendida entre 15 y 50 mg de EE2 (Islam et al., 2020); además, tiene otros usos como las terapias de sustitución hormonal en la etapa de menopausia, tratamiento del hipogonadismo femenino (Ramírez-Montero et al., 2022; Torres et al., 2021), tratamiento paliatorio ante el cáncer de mama y próstata (Moorthy et al., 2019), lociones para prevenir caída de cabello dependiente de andrógenos en mujeres (Gorito et al., 2017), tratamiento ante el acné y también en el Síndrome de Turner (Aris et al., 2014; Ramírez-Montero et al., 2022). Asimismo, la EE2 es utilizada en la agricultura (Adeel et al., 2017a; Whitman, 2017), y ganadería para aumentar tanto el crecimiento como la productividad del ganado (Islam et al., 2020).

Los compuestos estrogénicos, se liberan constantemente a través de los excrementos de humanos y animales (Bilal et al., 2021). Las principales fuentes de estrógenos naturales y sintéticos son las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTARs) (Peña-Guzmán et al., 2019; Vilela et al., 2018), por causa de la eliminación incompleta de estos compuestos en las PTARs convencionales (Michiels et al., 2019; Nasri et al., 2021; Vilela et al., 2018). Además, hospitales como industrias farmacéuticas han sido identificadas como fuente importante de contaminación, originadas por desechos

hospitalarios, efluentes de plantas de fabricación y eliminación o mala disposición de medicamentos caducados (Nasri et al., 2021b; Syed et al., 2021). Por otro lado, la escorrentía proveniente de ganadería y actividades agrícolas (Barbosa et al., 2016) terminan llegando tanto a agua como a suelo por medio del estiércol de campo (Havens et al., 2020). De modo que, sustancias químicas que tienen la capacidad de ser disruptores endócrinos (EDC) han sido detectados en el ecosistema acuático (Azizi et al., 2021; Torres et al., 2021), inclusive pudiendo ser encontradas en agua potable (Nasri et al., 2021).

En los últimos tiempos, los químicos Compuestos Disruptores Endócrinos, vienen recibiendo atención creciente (Azizi et al., 2021), puesto que tiene impactos nocivos sobre la salud de los seres vivos y ambiente (de Oliveira et al., 2020). Tanto estos compuestos, como las hormonas esteroides estrogénicas, podrían comprometer la calidad del agua, interfiriendo con el adecuado equilibrio de los ecosistemas acuáticos y biodiversidad (Forio & Goethals, 2020). Entre estos, podemos encontrar estrógenos naturales como E1, E2, E3 (R. Jiang et al., 2020) y el estrógeno sintético EE2, siendo uno de los EDC con mayor persistencia en el ambiente (Astrahan et al., 2021), teniendo una mayor actividad estrogénica (Almeida et al., 2020). En efecto, la presencia en el medio acuático se ha vuelto un problema importante, alterando al sistema endocrino de animales y seres humanos, acarreando así varios problemas de salud (Torres et al., 2021; Vilela et al., 2018), aun en concentraciones ambientales muy bajas (Syed et al., 2021). Sus niveles de contaminantes han sido relacionados con la susceptibilidad de cáncer de mama (Syed et al., 2021); ya que se ha observado una mayor proliferación en mujeres posmenopáusicas que reciben tratamiento con estrógeno más terapia de reemplazo hormonal con progestágenos (TRH). La acción de la progestina está mediada por dos receptores de progesterona (PR) isoformas, PRA y PRB, con actividad y función transcripcional únicas (Aupperlee et al., 2018), también se ha relacionado con cáncer de próstata en varones (Syed et al., 2021). Incluso, afectan el crecimiento y desarrollo en humanos, animales y vegetales a niveles significativos (Adeel et al., 2017); por otro lado, tienen efectos adversos en organismos acuáticos como perturbación fisiológica, crecimiento y desarrollo de los peces (Adeel et al., 2017; Sacdal et al., 2020), al igual la feminización en algunas poblaciones silvestres (Jackson & Klerks, 2020), como el caballito de mar rayado

*Hippocampus erectus*, muestran inhibición significativa del desarrollo de la bolsa de cría masculina interrumpiendo la matriz extracelular y las vías de la membrana basal; además, perjudican la expresión de genes asociados con la espermatogénesis en los testículos, una vez que fueron expuestos a concentraciones ambientalmente relevantes de EE2, 5, 50, 10 y 100 ng/L respectivamente o progesterona, durante 60 días, e incluso estos compuestos provocan la feminización masculina (Qin et al., 2020). Por otro lado la hormona EE2 interviene en el correcto desarrollo del sistema nervioso, teniendo así efectos negativos sobre la regeneración y comportamiento natatorio, por tal razón una disminución de la población y reproducción (Sacdal et al., 2020).

De acuerdo con la SUNASS (2008), se estima que el 70 % de aguas residuales del Perú, no reciben tratamiento alguno; por tal motivo, es necesario identificar y evaluar la eficiencia de otras tecnologías para tratar el agua, cuyo enfoque a futuro debe ser el uso de microorganismos potenciales con capacidades ya mejoradas para poder hacer frente al problema (Syed et al., 2021). Por otro lado, los medicamentos tienen que ser diseñados utilizando principios de química verde, para que estén disponibles biológicamente para el metabolismo del cuerpo, así como la biodegradación ambiental. De la misma manera, el control y eliminación de compuestos estrogénicos, se debe a la regulación de la prescripción y uso excesivo de estrógenos en humanos como en animales. Es más, las normas que regulan la eliminación e iniciativas de recolección pueden ser mejores prácticas para descartar el camino de las píldoras anticonceptivas vencidas y sin usar. A esto se incluye monitoreo regular y eficiente de la calidad de efluentes de las PTARs. Por otra parte, estos compuestos aparecen en orden de nanogramos, siendo así compleja su detección (de Oliveira et al., 2020). A tal efecto, se desarrolló y validó, un método analítico usando un sistema cromatográfico de fase líquida acoplado a detector de arreglo de diodos (UHPLC – DAD) para detectar y cuantificar residuos de estrona y progesterona, mediante el cual se analizó las muestras de agua residual del afluyente y efluente de la PTAR de Ilo.

## CAPÍTULO I

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

#### 1.1 FORMULACIÓN DE LOS PROBLEMAS

##### *1.1.1. Problema general*

¿A través del método de análisis cromatográfico desarrollado y validado será posible detectar y cuantificar los residuos de estrona y progesterona en el afluente y efluente de la PTAR de Ilo?

##### *1.1.2. Problemas específicos*

- a) ¿Es el método de análisis por UHPLC–DAD, selectivo para la detección y cuantificación de residuos de estrona y progesterona en agua residual?
- b) ¿Será el método de análisis por UHPLC – DAD, para residuos de estrona y progesterona lineal y mostrando un coeficiente de correlación  $R^2 \geq 0,99$ ?
- c) ¿Mostrará el método de análisis por UHPLC–DAD, para residuos de estrona y progesterona un límite de detección y cuantificación de 0,01 y 0,1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  respectivamente?
- d) ¿El método de análisis por UHPLC–DAD, para residuos de estrona y progesterona presentes en agua residual presentará un porcentaje de recuperación de 70% a 120%?
- e) ¿Existirá presencia de residuo de estrona y progesterona en el afluente y efluente de la PTAR de Ilo?

#### 1.2 JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN

Los contaminantes emergentes, tienen mayor presencia en los ecosistemas de todo el mundo, la contaminación producida por estos estrógenos, son causal de preocupación; es por ello que, se busca la atención para la mejora de su investigación práctica sobre estos; asimismo, tratamiento y eliminación (Rasheed et al., 2019). Tanto la presencia en el ambiente como el efecto en la salud de los organismos vivos es aún poco conocida por la sociedad (de Oliveira et al., 2020). El incremento en el uso de medicamentos contribuye con la producción de hormonas, puesto que las PTARs no eliminan en su totalidad todos los residuos de medicamentos. Siendo así que estos residuos se liberan en los efluentes de las aguas residuales que potencialmente pueden contaminar a las aguas receptoras, y

en última instancia, se puede encontrar en el agua potable (Nasri et al., 2021), actuando como EDC.

En los diversos estudios realizados, han sido detectados diversos EDC en aguas superficiales y residuales, encontrado con mayor frecuencia; E3, E2, E1 y EE2, en concentraciones de ng/L a mg/L (R. Jiang et al., 2020), perjudicando no solo al ambiente, sino a la salud humana (Rout et al., 2021), razón por la que la Comisión Europea indica que estas sustancias deben ser objeto de vigilancia (Almeida et al., 2020).

En el caso de Perú, existe un retraso en la detección de contaminantes emergentes en los diversos ecosistemas y esto puede obedecer a un lento desarrollo de técnicas analíticas sensibles y/o nuevos métodos que puedan detectar concentraciones muy bajas en muestras ambientales. Por tal razón, se desarrolló un método analítico cromatográfico de mayor selectividad, sensibilidad, reproducibilidad, tanto para la detección como la cuantificación de estrona y progesterona; asimismo, realizar investigaciones para poder determinar si las concentraciones de estas hormonas tienen efectos adversos en la fauna residente, como vertebrados bentónicos y peces. Los datos obtenidos pueden ayudar al establecimiento de límites de seguridad para proteger la vida silvestre y salud de las personas.

### **1.3 OBJETIVOS**

#### ***1.4.1. Objetivo General***

Desarrollar y validar un método de análisis cromatográfico por UHPLC-DAD para la detección y cuantificación de residuos de estrona y progesterona en el afluente y efluente de la PTAR de Ilo.

#### ***1.4.2. Objetivos específicos***

- a) Determinar la selectividad del método analítico por UHPLC-DAD, para la detección y cuantificación de residuos de estrona y progesterona en agua residual.
- b) Establecer el coeficiente de correlación del método analítico por UHPLC-DAD, para la detección y cuantificación de residuos de estrona y progesterona en agua residual.

- c) Calcular el límite de detección y cuantificación del método analítico por UHPLC-DAD, para la detección y cuantificación residuos de estrona y progesterona en agua residual.
- d) Estimar el porcentaje de recuperación del método analítico por UHPLC-DAD, para la detección y cuantificación de residuos de estrona y progesterona en agua residual.
- e) Detectar y cuantificar residuos de estrona y progesterona en muestras del afluente y efluente de la PTAR de Ilo, a través de la técnica UHPLC-DAD.

## **1.4 HIPÓTESIS**

### ***1.5.1. Hipótesis General***

El método de análisis cromatográfico por UHPLC-DAD, permite detectar y cuantificar los residuos de estrona y progesterona en el afluente y efluente de la PTAR de Ilo.

### ***1.5.2. Hipótesis Específicas***

- a) El método de análisis por UHPLC–DAD, es selectivo para la detección y cuantificación de residuos de estrona y progesterona en agua residual.
- b) El método de análisis por UHPLC – DAD, para residuos de estrona y progesterona es lineal y muestra un coeficiente de correlación  $R^2 \geq 0,99$
- c) El método de análisis por UHPLC–DAD, para residuos de estrona y progesterona muestra un límite de detección y cuantificación de 0,01 y 0,1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  respectivamente
- d) El método de análisis por UHPLC–DAD, para residuos de estrona y progesterona en agua residual presenta un porcentaje de recuperación de 70% a 120%
- e) Existe presencia de residuo de estrona y progesterona en el afluente y efluente de la PTAR de Ilo

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1 ANTECEDENTES DEL ESTUDIO

##### 2.1.1. Internacionales

Zhang & Fent. (2018), desarrollaron un método analítico para análisis de rutina de dos metabolitos de progestina,  $17\alpha$ -hidroxipregnanolona ( $17\text{OH-}\Delta 5\text{P}$ ) y pregnanediol (PD), y otros 31 esteroides naturales y sintéticos y relacionados metabolitos (estrógenos, andrógenos, corticoides, progestágenos) en aguas de ríos, así como afluentes y efluentes de PTARs municipales mediante HPLC-MS/MS, combinado con el método de extracción en fase sólida. Para las diversas matrices consideradas, el método optimizado mostró un desempeño satisfactorio con recuperaciones de 70-120% para la mayoría de los esteroides objetivo. Los límites de detección del método (LD) oscilaron entre 0,01 y 3 ng/L para agua de río, 0,02 a 10 ng/L para efluentes de EDAR y 0,1 a 40 ng/L para afluentes con buena linealidad y reproducibilidad.

Este método fue aplicado con éxito para el análisis de esteroides en ríos y afluentes y efluentes de PTAR. Las concentraciones de  $17\text{OH-}\Delta 5\text{P}$  y PD en los afluentes de la PTAR fueron de 51–256 ng/L y hasta 400 ng/L, respectivamente, junto con androstenediona (rango de concentración: 38–220 ng/L), testosterona (11–26 ng/L), estrona (2,3–37 ng/L),  $17\beta$ - estradiol (N.D.–8,7 ng/L),  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona (N.D.–66 ng/L), acetato de medroxiprogesterona (N.D.–5,3 ng/L), y progesterona (2,0–22 ng/L), mientras que solo se detectaron androstenediona (ADD), estrona (E1) y estriol (E3) en efluente con concentraciones que van hasta 1,7 ng/L, 0,90 ng/L y 0,8 ng/L, respectivamente. En muestras de agua de río, sólo se detectaron ADD y E1 con concentraciones de hasta 1,0 ng/L y 0,91 ng/L. Dicho procedimiento representa el primer método para analizar  $17\text{OH-}\Delta 5\text{P}$  y PD en muestras ambientales junto con una gran serie de esteroides. Por otro lado, se necesitan más estudios sobre el destino, el comportamiento y la toxicidad del  $17\text{OH-}\Delta 5\text{P}$ , PD y otros metabolitos de progestina y esteroides en general para aprender más sobre la relevancia de estos esteroides en el medio ambiente.

Olatunji et al. (2017), realizaron la determinación de hormonas esteroides seleccionadas en superficies de agua, alrededor de granjas de animales en la ciudad del Cabo usando HPLC-DAD. En este estudio, un método para la simultánea determinación de dos hormonas esteroides, E2 y E3, y una hormona que imita al policarbonato, bisfenol-A (BPA), fue desarrollado y validado. Esto fue utilizado posteriormente para detectar y cuantificar los niveles de hormonas en el agua superficial recolectadas alrededor de algunas granjas de animales. La sensibilidad del método permitió que los LOD y LOQ de las hormonas e imitar la hormona en el rango 1,14–2,510 y 3,42–7,53  $\mu\text{g/L}$ , respectivamente. Los resultados revelaron una amplia variabilidad en las concentraciones de E2 y E3, mientras que Bisfenol A (BPA) no fue detectado en ninguna de las estaciones de muestreo.

La concentración de E3 osciló entre <1,14 y 45,5  $\mu\text{g/L}$  (N= 120) en agua de estación 2. La concentración más alta de E2 (15,7  $\mu\text{g/L}$ , N=80) se observó en agua de estación 1. Las concentraciones variadas pueden estar conectadas con la naturaleza y fuentes de liberación, inconsistencias en el analito distribución debido a la dinámica del patrón de flujo de agua y la propiedades físico-químicas de cuerpos de agua.

Peñalver et al. (2002), determinaron un grupo de compuestos estrogénicos por microextracción en fase sólida (SPME) acoplada a cromatografía en fase líquida (HPLC) con detección ultravioleta (UV) y electroquímica (ED). Utilizaron fibras de poliacrilato (85  $\mu\text{m}$ ) para la extracción los analitos de las muestras acuosas. Un modo dinámico y estático de desorción fue comparado y las variables afectan el proceso de absorción y desorción en SPME-HPLC fue optimizado. La desorción estática dio las mejores recuperaciones y formas de pico. El método SPME-HPLC-UV-ED permitió determinar compuestos estrogénicos a concentraciones bajas  $\mu\text{g L}^{-1}$  en muestras reales de agua. Los límites de detección estuvieron entre 0,3 y 1,1  $\mu\text{g L}^{-1}$  usando la detección de UV y entre 0,06 y 0,08  $\mu\text{g L}^{-1}$  utilizando ED. B-estradiol fue encontrado en muestras de la PTAR en las concentraciones de 1,9 y 2,2  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Gonzales. (2020), desarrolló y validó un método por UHPLC para la detección y cuantificación de Etinilestradiol y Levonorgestrel (LG) en aguas residuales de la PTAR de la Facultad de Estudios Superiores Acatlán, UNAM. El método cromatográfico fue desarrollado para determinar los parámetros de analíticos en el rango de concentración de 47 a 700 µg/L para EE2 y de 20 a 300 µg para LG. Además, el método de MEDLL se adaptó para extraer los analitos utilizando: diclorometano (DCM) y metanol en proporción 60:40 respectivamente. Mostrando que el método es selectivo, lineal, y cumple los criterios para la validación de método Eurachem, los cuales son: LD, LQ, repetibilidad y reproductibilidad

### **2.1.2. Nacionales**

Alejandro et al. (2021) desarrollaron una investigación en aguas de la bahía interior del lago Titicaca y en agua potable de la ciudad de Puno (Perú). Teniendo como objetivo principal evaluar presencia de hormonas esteroideas en estas aguas, a través de UHPLC. En cuanto a la preparación de las muestras, se utilizó el método de SPE, cuyos análisis se realizaron HPLC-DAD, en el laboratorio Centro de Energía Nuclear na Agricultura (CENA-USP-Brasil). Evidenciando concentraciones de hormonas esteroides: E1 1,56, E2 2,27, EE2 13,88 ng /L respectivamente. Concluyéndose que dichas concentraciones varían en los diferentes puntos de monitoreo, pudiendo ocasionar efectos ecotoxicológicos a la biota endémica que habita este ecosistema; paralelo a esto, pudiendo afectar la salud de la población alrededor de este lago.

Ruiz. (2019), desarrolló y validó una técnica analítica, de acuerdo a los estándares de la química verde, de esta manera determinar diazepam en tabletas a través de HPLC. Teniendo como población un piloto de formulación de tabletas de diazepam de 10 mg. La fase móvil fue una mezcla de etanol-agua (70:30), con un flujo de 1 mL/min, longitud de onda de 254 nm y temperatura 60 °C; la columna cromatográfica empleada fue (C18) de 5 µm de diámetro y 250 mm. El diazepam tiene como TR 2,96 min y el de corrida analítica 5 minutos, con un porcentaje de recuperación del 97 %, y una RSD menores al 2 %. Por tal razón, el método desarrollado es selectivo, preciso, exacto y robusto, para detectar y cuantificar diazepam presente en tabletas. Por otro lado, este método facilita la detección de diazepam, usando pocos solventes.

Alcántara (2018), desarrolló un método analítico por UHPLC, para cuantificar etinilestradiol y desogestrel en comprimidos. Para la separación cromatográfica se usó un sistema HPLC Thermo Scientific™ UltiMate™ 3000 UHPLC y una columna BDS Hypersil C18 150 MM x 4,6 mm y 5 µm. La fase móvil estuvo comprendida por dos mezclas A y B, siendo que A estuvo compuesta por agua purificada y acetonitrilo (90:10) y B comprendida de mezcla de agua purificada y acetonitrilo (5:95); con un flujo de 1,0 mL/min, la longitud de onda de 208 nm; los tiempos de retención fueron de: 3,092 min y 8,958 min para etinilestradiol y desogestrel respectivamente. Obteniendo un ( $R^2$ ) mayor de 0,99, LD (0,42 µg/mL e 1,29 µg/mL) y LQ (3,29 µg/mL e 9,99 µg/mL) para etinilestradiol y desogestrel respectivamente.

## **2.2 TEORÍAS QUE SUSTENTAN LA INVESTIGACIÓN**

### **2.2.1. Contaminantes emergentes (CE)**

Los (CE) son sustancias químicas, en lo general estos no son reguladas, y pueden ser detectadas en concentraciones bajas o muy bajas, a través de técnicas analíticas, lo que genera una gran preocupación debido a sus efectos negativos a largo plazo tanto en el ambiente como en la salud humana aún no es conocido. Dichos compuestos se encuentran en aguas residuales, suelo, aguas subterráneas o agua potable en concentraciones bajas o muy bajas ( $\text{pg L}^{-1}$  a  $\text{ng L}^{-1}$ ). La principal característica de los CE, es la producción y consumo continuo, por ende, su permanente introducción al ambiente (Bell et al., 2011).

En cuanto a las organizaciones internacionales y agencias nacionales de ciertos países han desarrollado algunas definiciones de CE, que muestran diversos aspectos relacionados con la temática y que ayuda a comprender mejor la dimensión del problema y sus consecuencias (Bell et al., 2011). De acuerdo con la red NORMAN de la Unión Europea, dichas sustancias químicas han sido detectadas en el ambiente; sin embargo, estas no vienen siendo consideradas en programas de seguimiento rutinarios a nivel de la Unión Europea y cuyo destino, comportamiento ambiental y efectos tóxicos no son bien conocidos (García, 2017).

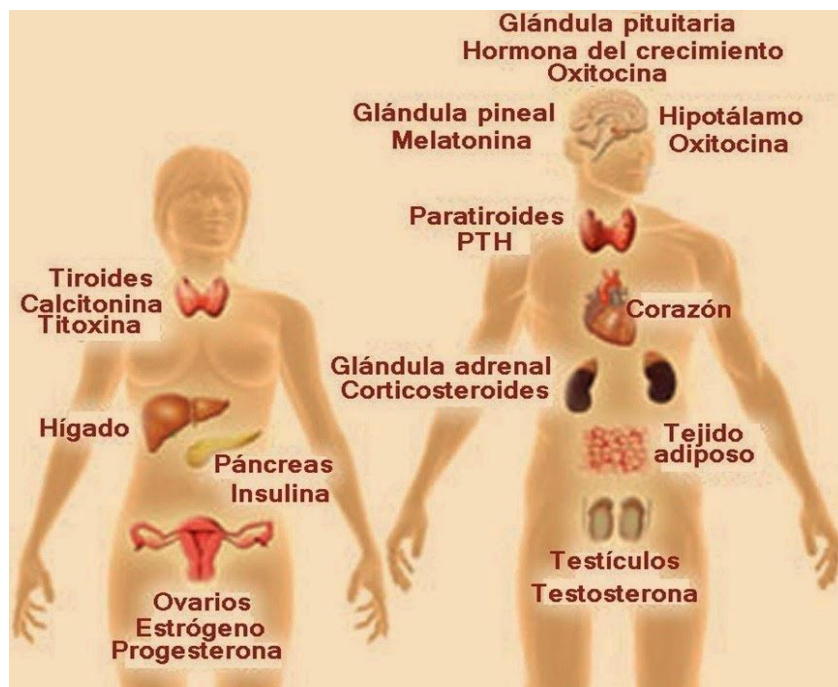
### 2.2.2. *Los compuestos disruptores endocrinos*

- **El sistema endocrino.**

Este sistema podemos encontrar en casi todos los animales incluyendo a los mamíferos, los vertebrados no mamíferos, como: aves, reptiles, anfibios, los invertebrados como: langostas, insectos, etc. El sistema endócrino junto al sistema nervioso, son sistemas de comunicación que regulan todas las respuestas y las funciones del cuerpo. Está conformado por glándulas y sus hormonas que producen, las cuales guían el crecimiento, el desarrollo, la comportamiento y reproducción de los seres vivos. Las principales glándulas endocrinas del cuerpo incluyen: gónada, glándula pineal, pituitaria, las paratiroides, la tiroides, páncreas, suprarrenales (Nollet, 2012).

#### **Figura 1**

*Glándulas del sistema endocrino humano y sus respectivas hormonas segregadas*



Fuente: Hecht & Schwarz, 2013

- **Definición y tipos de compuestos disruptores endocrinos.**

Las sustancias químicas disruptoras endocrinas (SAE) son compuestos extraños que interfieren en el sistema endocrino; por lo tanto, no solamente afectan a la liberación, producción y transporte de hormonas, sino que además intervienen en cuanto a la capacidad de unión el metabolismo y en la eliminación de las hormonas (Akash et al., 2021). Según señala el Instituto Nacional de Ciencias de la Salud Ambiental, los compuestos de alteración endocrina (EDC), son de origen natural o antropogénico, estos pueden imitar o interferir en el funcionamiento de las hormonas en el organismo (Micro-pollutants et al., 2015). La Sociedad de Toxicología y Química Ambiental y Química del Medio Ambiente (SETAC) precisa a las alteraciones endocrinas como "*Las sustancias químicas sintéticas y naturales presentes en el ambiente alteran las funciones normales del sistema endocrino y sus hormonas en los seres humanos y la fauna silvestre*" (Nollet, 2012). En consecuencia, existen diversas formas en que estas sustancias químicas interfieren con el sistema endocrino, pudiendo imitar o bloquear hormonas naturales y alterar los niveles hormonales, teniendo efectos en las funciones que estas hormonas controlan.

En la Tabla 1 se presenta los diferentes tipos de disruptores endocrinos, asimismo se ejemplifica cada uno de ellos.

**Tabla 1***Tipos de compuestos disruptores endocrinos*

Compuestos naturales	Fitoestrógenos	Cumestanos (cumestrol)
		Flavonoides (apigenina, kaempferol, naringenina)
		Isoflavonoides (genisteína, daidzeína)
		Lignanós (enterodiol, enterolactona)
	Andrógenos	Corticoides
Compuestos antropogénicos	Fármacos	Dietilstilbestrol
	Metales pesados	Estrógenos y progestágenos
		Arsénico Cadmio Mercurio Plomo Uranio
	Pesticidas	Atrazina Dicloro difenil tricloroetano (DDT) y metabolitos Dieldrin Diurón Lindano Malatión Permetrina
	Plásticos y plastificantes	Ftalatos (BBP, DBP, DEHP) Bisfenol-A
Bifenilos policlorados (PCBs)		
Productos de cuidado personal	Benzofenonas Etilenglicol Parabenos Resorcinol	
	Surfactantes	Nonilfenol y derivados Octilfenol y derivados
Productos industriales	Productos industriales	Bifenilos policlorados (PCBs) o polibromados (PBBs) Estireno
		Diclorometano Tributilestaño (TBT) y derivados

Fuente: Hecht &amp; Schwarz, 2013

- **Mecanismo de acción de las hormonas.**

Las hormonas son sustancias bioquímicas producidas por glándulas endocrinas en una parte del cuerpo, que son transportadas por medio de la sangre y provocan reacciones en otras partes del cuerpo. Actúan como mensajeros químicos e interactúan con receptores específicos en las células para desencadenar respuestas e inducir funciones biológicas normales, como el crecimiento, la reproducción y el desarrollo. La naturaleza unificadora de la actividad hormonal es la presencia de receptores en las células diana que se enlazan a una hormona con alta afinidad y especificidad de flotabilidad. Los esteroides y las hormonas tiroideas funcionan al ingresar a las células objetivo y estimular genes específicos. Todas las demás hormonas se enlazan en la superficie celular y activan moléculas de segundos mensajeros en las células diana (Nollet, 2012).

El cuerpo tiene cientos de diferentes tipos de receptores; cada uno está diseñado para recibir un tipo específico de señal química. La hormona y su receptor tienen una relación "clave y llave". Cuando una hormona se encuentra con su receptor, se unen y entran en un abrazo molecular conocido como unión. Una vez unida, la molécula de hormona y su receptor, desencadenan la producción de varias proteínas que desencadenan la actividad biológica relacionada con la hormona. Las acciones hormonales son de dos tipos: organizadoras y activadoras. El primer tipo de acción ocurre durante las etapas clave del desarrollo y provoca efectos permanentes, como los de los esteroides sexuales. El último tipo de acción induce solo cambios transitorios en uno de los procesos celulares, como los efectos del glucagón y la insulina en el proceso de homeostasis de la glucosa (Nollet, 2012).

- **Efectos de los compuestos disruptores endocrinos.**

***Efectos sobre la vida silvestre.***

Se han documentado diversos impactos sobre la reproducción y el desarrollo de la vida silvestre. Esto incluye cambios de sexo, disminución de la población, aumento del cáncer, disminución y deterioro de la función reproductiva, trastornos del sistema inmunológico y nervioso y comportamientos anormales. Estos efectos secundarios se han informado en varias especies, incluidos invertebrados, peces, reptiles, aves y mamíferos (Nollet, 2012).

### ***Efectos sobre la salud humana.***

Los disruptores endocrinos se han relacionado con problemas de salud humana, incluido el incremento de los niveles de cáncer testicular, de próstata testicular, de próstata y de mama, reducción de la calidad y cantidad de esperma; mayor frecuencia de criptografía e hipospadias; mayor incidencia de mujeres con síndrome de ovario poliquístico; endometriosis; alteración del desarrollo físico y psíquico. No existe una relación directa entre la exposición a una sustancia química en particular y los efectos negativos en la salud de las personas a través de mecanismos de alteración endocrina, aunque algunos estudios en animales de laboratorio que han demostrado que algunas sustancias químicas pueden ocasionar afecciones cancerígenas, reproductivos y de desarrollo en seres humanos (Nollet, 2012).

### ***Efectos en el sistema nervioso (neurológico).***

El cerebro es uno de los sitios más sensibles para la acción de los esteroides en el útero, y recientemente se ha sugerido que las sustancias disruptoras endocrinas pueden afectar el desarrollo y el comportamiento normal del cerebro (Nollet, 2012).

#### ***2.2.3. Las hormonas esteroides***

- **Características generales y presencia en el cuerpo humano**

Las hormonas esteroides son un conjunto de compuestos biológicamente activos que controlan funciones en el cuerpo humano relacionadas con los sistemas endocrino e inmunológico. Los esteroides se sintetizan a partir del colesterol y comparten un anillo de ciclopentanoperhidrofenantreno; asimismo, los esteroides naturales son secretados por: testículos, ovarios, corteza suprarrenal, y placenta en animales y humanos, incluyendo progestágenos, corticosteroides, andrógenos y estrógenos (Ying et al., 2002).

Las hormonas esteroides ejercen sus efectos cruzando la membrana plasmática y uniéndose a los receptores intracelulares. Por otro lado, de estas hormonas endógenas, se han producido muchos esteroides sintéticos para aprovechar su alta actividad biológica. La Tabla 2 resume tanto los esteroides naturales como los sintéticos más importantes de cada grupo, así como sus aplicaciones más comunes en medicina veterinaria o humana (Kuster et al., 2006).

**Tabla 2***Hormonas esteroideas naturales y sintéticas más importantes*

	<b>Hormonas endógenas</b>	<b>Hormonas sintéticas</b>	<b>Uso</b>
Andrógenos	Testosterona	Boldenona Nandrolona Metilttestosterona Trenbolona Estanozolol	Promotor de crecimiento en ganadería
Estrógenos	Estradiol Estriol Estrona	Etinilestradiol Mestranol	Anticonceptivo
Progestágenos	Progesterona 17 $\alpha$ -hidroxi-progesterona	Norgestrel Noretindrona Melengestrol Medroxiprogesterona	Anticonceptivo
Corticosteroides	Cortisona Cortisol	Dexametasona Betametasona Desoximetasona Prednisona Prednisolona Flumetasona	Promotor de crecimiento antiinflamatorio

Fuente: Kuster et al., 2006

- **Fuentes de emisión, transporte y presencia en el ambiente**

De mayor preocupación son las prácticas humanas y veterinarias poco éticas asociadas con el uso de hormonas sexuales naturales y sintéticas como promotores del crecimiento y anabólicos. Por ende, los humanos son probablemente la principal fuente de hormonas esteroideas en ambientes acuáticos. Los animales de granja también producen y excretan una serie de hormonas esteroideas, idénticas o muy similares a las secretadas por los humanos (Ojogoro et al., 2021). Estos esteroideos persistirán en el ambiente por medio de la descarga de aguas residuales y eliminación de desechos. Todos estos compuestos han sido detectados en aguas residuales de PTARs y superficiales (Kuster et al., 2006). Ciertos esteroideos ambientales (exógenos) son de gran preocupación para la

calidad del agua debido a sus efectos adversos sobre los organismos acuáticos (especialmente los peces) en concentraciones muy bajas (1 ng/L o menos).

- **Normatividad**

Los reglamentos y controles se centran en los contaminantes tradicionales, y varias organizaciones y agencias gubernamentales de todo el mundo cuentan con reglamentos y directrices para proteger la calidad del medio ambiente, especialmente con agua, ya sea superficial o subterránea, que sea utilizable por los seres humanos.

Por otro lado, estas organizaciones emiten periódicamente estándares sobre diversos aspectos de los contaminantes emergentes como la OMS, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), Comité de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) de la FAO/OMS, USGS, USEPA, Toxicología Ecológica. Association of Australia (SETACAU) y más, todos destacan sustancias de especial preocupación debido a sus posibles efectos secundarios. Como resultado, la legislación y las recomendaciones se pueden encontrar en diversos grados, dependiendo de los efectos potenciales o probados de las sustancias químicas. Por ejemplo, como se propuso recientemente, los fármacos 17 $\beta$ -estradiol (E2), 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2) y diclofenaco han sido designados como tóxicos preferidos. Los objetivos legislativos propuestos para la concesión de licencias son 0,4, 0,035 y 100 ng L<sup>-1</sup> para E2, EE2 y diclofenaco, respectivamente (Bell et al., 2011).

#### **2.2.4. Hormonas estudiadas**

- **Estrógenos**

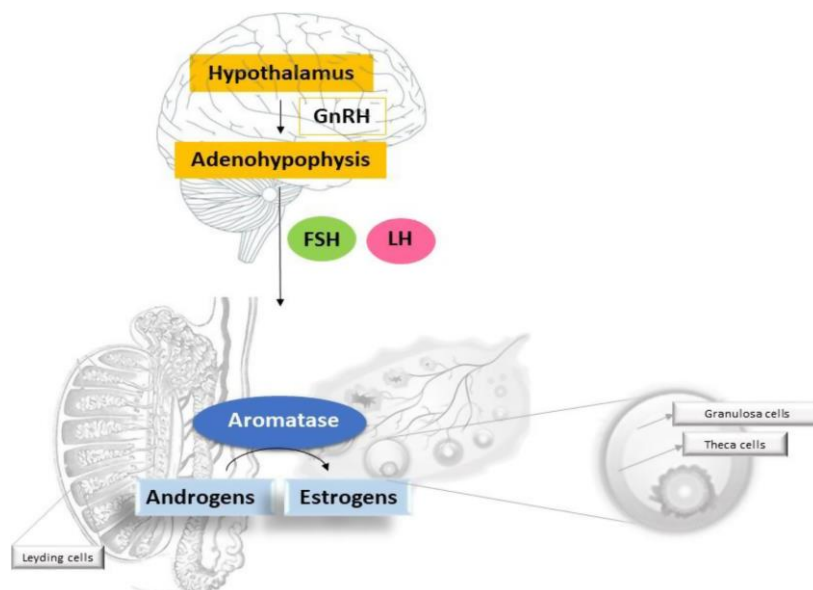
Los estrógenos son hormonas esteroides derivadas del colesterol que contienen 18 átomos de carbono. En las mujeres, los estrógenos son producidos por los ovarios (Fig. 2) bajo la influencia de las gonadotropinas (FSH, LH); los ovarios también producen andrógenos que se distribuyen en las células de la granulosa donde se aromatizan a estrógenos (Duffy & Stouffer, 2003; Hu et al., 2010). En folículos maduros, la hormona estimulante del folículo (FSH) actúa sobre los gránulos células para estimular la actividad de la aromatasa (Overes et al., 1992). En hombres, LH estimula las células de Leydig para producir testosterona que se aromatiza a estrógenos en células de Leydig y Sertoli y espermatoцитos maduros (Cooke et al., 2017).

La producción de estrógenos no gonadales se observó por primera vez en el tejido adiposo en 1974 por Hemsell y sus colegas (Hemsell et al., 1974). Luego se demostró que muchas otras estructuras pueden producir estrógenos, es decir, cerebro, huesos, hígado, glándula suprarrenal, piel y vasos sanguíneos (Barakat et al., 2016). En estos sitios, que no pueden producir precursores de esteroides C19, los sustratos se obtienen de otros tejidos a través de la circulación sanguínea y luego se convierte en estrógenos por la aromatasa.

Los principales estrógenos naturales son:  $17\beta$ -estradiol (E2), estrona (E1) y estriol (E3) (Gruber et al., 2004). E2 es la hormona principal en las mujeres de edad fértil, pero también está presente en los testículos donde puede alcanzar concentraciones femeninas (Cooke et al., 2017). E1 se produce en el ovarios, corteza suprarrenal y testículos de androstenediona bajo la acción de aromatasa; en las mujeres es la principal hormona durante la menopausia (Mansur et al., 2012). E3 es un metabolito casi totalmente inactivo de E2 y E1, producido principalmente en el hígado; durante el embarazo, se produce en la placenta a partir de la dehidroepiandrosterona (Norman & Litwack, 1997).

## Figura 2

*Producción de estrógeno en mujer y hombre*



Fuente: Ceccarelli et al., 2022

### ***Estrona***

La estrona proviene del ovario y principalmente de la conversión periférica de androstenediona. Es baja en la prepubertad y en el hipogonadismo o después de adrenalectomía. También es secretada en pequeñas cantidades por los testículos. En el Embarazo puede alcanzar niveles de hasta 700 pg/mL en el 1er trimestre, 1860 pg/mL en el segundo semestre y 3200 pg/mL en el tercer trimestre. La conversión periférica de androstenediona a estrona es responsable de la mayor reserva de estrógeno circulante en la posmenopausia, cuando los niveles de estrona pueden no disminuir en la misma proporción que los niveles de estradiol. También puede haber conversión a gran escala en el tejido adiposo, aumentando los niveles de estrona en personas obesas (Litwack, 2022).

- **Propiedades fisicoquímicas**

La estrona, es un polvo blanco, cristalino sólido, e inodoro (Miranda, 2015), cuyo punto de fusión es de 254,5° C, y su gravedad específica es de 1,23 (Equipment, 2022), el estado físico a temperatura ambiente es sólido; además, es combustible, teniendo al monóxido de carbono (CO) y dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), como productos de combustión (Sant'Ana, 2008).

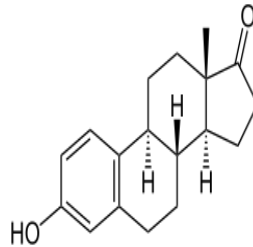
- **Tipo de degradación**

*Acuático-abiótico*, la adsorción viene siendo el principal proceso de eliminación, la fotólisis de menor importancia y la volatilización insignificante.

*Acuático-biótico*, de acuerdo a estudios realizados en laboratorios en condiciones aeróbicas muestran que la estrona se biodegrada totalmente en un plazo de 14 a 28 días (Miranda, 2015).

### Figura 3

#### *Estructura química de la Estrona*



*Nota.* (IUPAC):3-hidroxi-13-metil-6,7,8,9,11,12,14,15,16-decahidrociclopenta[*a*] fenantren-17-ona.

Fuente: Elias et al., 2021

- **Progestágenos**

Los progestágenos son un grupo de hormonas, que ayudan al desarrollo del embarazo; además se encuentran presentes en otras fases del ciclo estral y menstrual (Ceccarelli et al., 2022). El progestágeno principal es la progesterona. Por otro lado, fueron sintetizados otros progestágenos. Algunos de ellos se activan cuando son administrados por vía oral. Estos no forman un grupo uniforme de compuestos, difiriendo de la progesterona varios aspectos. Se han introducido progestágenos sintéticos de tercera generación, como componentes de los anticonceptivos orales (Trevor, 2017).

#### ***Progesterona***

La progesterona es el progestágeno natural de mayor importancia en los seres humanos. También tiene importantes efectos hormonales, siendo precursores de: esteroides suprarrenocorticales, andrógenos y estrógenos. La progesterona es sintetizada en: testículos, ovarios, y glándulas suprarrenales a partir del colesterol circulante. Además, se secretan y se producen grandes cantidades por la placenta durante el embarazo.

El cuerpo amarillo localizado en el ovario en particular produce la progesterona. Este compuesto es secretado por varones entre 1 a 5 mg de progesterona diarios, ocasionando su presencia en el plasma en casi 0,03 µg/100 mL. Durante la fase folicular en mujeres la concentración es ligeramente mayor cuando solamente se secretan unos cuantos miligramos diarios de progesterona. En la fase lútea, las concentraciones plasmáticas oscilan entre 0,5 µg/100 mL y más de 2 µg/100 mL. Cabe mencionar que la

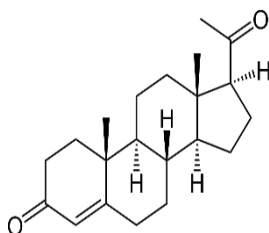
concentración de progesterona plasmática alcanzan sus valores máximos en el último trimestre del embarazo (Trevor, 2017).

- **Propiedades fisicoquímicas**

La progesterona cuyo nombre químico es 4-pregnano-3, 20- diona, es un polvo cristalino incoloro o blanco a amarillo pálido (Rosalba, 2004), la fórmula condensada es  $C_{21}H_{30}O_2$  (Dallegrave, 2012), siendo casi insoluble en agua; sin embargo, es soluble en 1 en 8 partes de etanol, 1 en menos de parte de cloroformo y en 1 en 16 de éter, además, es soluble en ácido sulfúrico concentrado, acetona y diaxano (Bayliss et al., 2008).

#### Figura 4

*Estructura química de la progesterona*



*Nota.* (IUPAC): 17-acetil-10,13-dimetil-1,2,6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahidroiclopenta[a]fenantren-3-ona. Fuente: Trevor, 2017

#### Tabla 3

*Características físico-químicas de las hormonas estudiadas*

Compuesto	Peso molecular (g/mol)	Solubilidad			
		acuosa mg/l (20°C)	pka	Log ko/a	k sorción
<b>Estrona</b>	270,366	13	10,34	3,43	4882
<b>Progesterona</b>	314,46	--	--	3,87	--

*Nota.* pka- cologaritmo de la constante de disociación ácida; Log ko/a- coeficiente de reparto octanol-agua; k sorción - constante de sorción. Fuente: Dallegrave, 2012.

### **2.2.5. Presencia de hormonas esteroideas en aguas residuales**

Las aguas residuales de los municipios, así como de las operaciones ganaderas intensivas, son dos de las fuentes más comunes de hormonas (sintéticas y naturales) y disruptores endocrinos en el medio ambiente. Las PTARs municipales y las lagunas anaeróbicas tradicionales no están diseñadas para manejar bajos niveles de hormonas o disruptores endocrinos, por lo que descargan directamente a las aguas del país. Un estudio exhaustivo de agua de origen, agua potable terminada y agua de distribución (grifo) de 19 compañías de agua de EE. UU. que atienden a 28 millones de personas encontró que, entre otros compuestos (incluidos los subproductos de productos farmacéuticos), el agua contiene muchas hormonas esteroideas y disruptores endocrinos. como la estrona, 17 $\beta$ -estradiol y atrazina. La presencia de EDCs en el agua es causa de preocupación cuando los investigadores mencionan que la exposición puede tener impactos ecológicos negativos (Micro-pollutants et al., 2015).

### **2.2.6. Degradación de hormonas**

Es importante que se realice la caracterización tanto de los procesos de degradación y la sorción de estrógenos; debido a que de esta forma permitirá la evaluación de su distribución en el ambiente; además de su persistencia e importancia ecológica tanto en sistemas acuáticos como terrestres (Kuster et al., 2004).

Al incorporarse en cuerpos de agua los estrógenos y progestágenos, ocurren diversos procesos como: biodegradación, adsorción y fotólisis, de sedimentos, pudiendo contribuir con su eliminación. Sin embargo, aún son temas de investigación los diversos mecanismos de biodegradación o absorción para eliminar dichos compuestos; es por ello que se precisa contar con mayor información acerca de estos mecanismos para su eliminación en las aguas y los lodos (Auriol, 2018). En cuanto a las tasas de degradación permiten determinar su impacto tanto en el ambiente y vida acuática debido a su potencial tóxico y biológico (Chowdhury et al., 2011).

Los estrógenos esteroideos presentan una degradación microbiológicamente mediana, debido a la desconjugación de estrógenos sulfatados y glucuronizados, también de la oxidación de E2 y EE2 en E1, así como sus transformaciones principales (Atkinson et al., 2012a).

### 2.2.7. Fotodegradación de hormonas

El tiempo de degradación puede darse desde unas pocas horas incluso meses; por lo que, depende de diversos parámetros ambientales, y factores bióticos y abióticos, siendo la fotodegradación la que se encuentra dentro de los procesos abióticos y es dada por el sol, siendo este un factor de suma importancia ya que determinará su destino final en medios acuáticos; en cuanto a la foto-transformación esta se puede dar por fotólisis indirecta o directa; esta es el resultado de la absorción de luz por contaminantes causando la degradación molecular siendo decisivo para la fotodegradación de estrógenos esteroidales dentro del ecosistema acuático (Chowdhury et al., 2011).

En cuanto a los foto-productos iniciales que se generan de la degradación de estos compuestos llegan a ser poco solubles en agua, dificultando el análisis, tal es el caso para la E2 y EE2 que expuestas a luz natural se degradan en aguas de río, teniendo vidas medias menores a 10 días expuestas a 12 horas de radiación solar; por otro lado, estos compuestos también han sido estudiados a través de radiación UV (Mazellier et al., 2008).

### 2.2.8. Cromatografía

La cromatografía designa diversas técnicas similares para la separación de diversas especies moleculares de una muestra según su tiempo de retención, para su posterior identificación y determinación/cuantificación; se utiliza un enfoque instrumental (Serban Moldoveanu, 2022). Las siguientes ecuaciones definen conceptualmente la cromatografía y su aplicación (Vaz, 2018).

Primero, la resolución es la medida cuantitativa del grado de separación entre dos picos A y B, referidos a dos moléculas diferentes, y se define como:

$$R = \frac{t_{R(B)} - t_{R(A)}}{0,5 (W_B + W_A)} \quad (1)$$

Donde:

$t_{R(A)}$ : Tiempo de retención del pico A

$t_{R(B)}$ : Tiempo de retención del pico B

$W_A$ : Anchura de la línea de base para el pico A

$W_B$ : Anchura de la línea de base para el pico B

En la Fig. 5 se tiene un cromatograma conceptual, con las representaciones de los términos utilizados en la Ecuación (1).

La separación entre los picos A y B se rige por el coeficiente de partición,  $K_D$ , que mide la distribución del soluto, o analito, a partir de su concentración en la fase móvil ( $S_m$ ) y en la fase estacionaria ( $S_s$ ), en una condición de equilibrio:

$$K_D = [S_m]/[S_e] \quad (2)$$

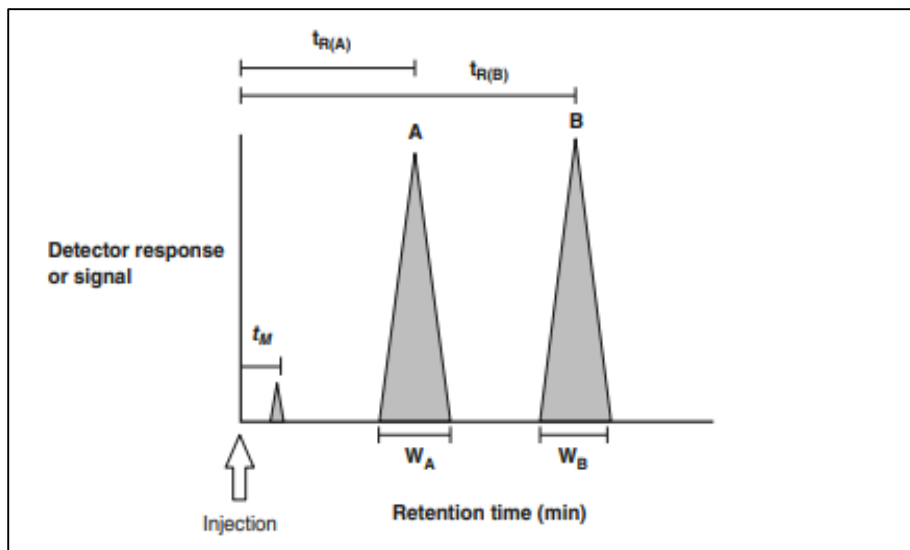
Cuanto mayor sea el valor de  $K_D$ , menor será el  $t_R$  del analito, y viceversa. La eficacia de una columna de separación para el análisis cromatográfico puede ser verificada por el número de platos teóricos contenidos en la columna:

$$N = 16(t_R/W)^2 \quad (3)$$

La eficiencia de la columna aumenta con el incremento del valor de  $N$ , lo que también conduce a un aumento de la resolución de los picos.

### Figura 5

*Componentes de un cromatograma, de dos picos correspondientes a los analitos (A y B)*



Fuente: Vaz, 2018

- **Cromatografía líquida de alto rendimiento**

Cuando los sistemas con partículas menores de 2  $\mu\text{m}$  y presiones en el rango de 1000 bar son denominadas UHPLC. Con este tipo de cromatografía líquida puede proporcionar una mayor resolución en un tiempo de retención más corta. Las fases estacionarias para la mayoría de los modos de cromatografía consisten en un material de sílice, o un polímero como un polisacárido o poliestireno, con grupos funcionales de interés unidos a la superficie de este sustrato pueden ser del tipo de fase normal (fase estacionaria polar) o de fase inversa (fase estacionaria no polar) (Serban Moldoveanu, 2022).

La selección de la fase móvil es fundamental para la cromatografía de partición, adsorción y de intercambio iónico, y menos crítica para los otros modos. Para los disolventes utilizados para formar esta fase, propiedades como la longitud de onda de corte UV-vis y el índice de refracción son parámetros importantes cuando se trabaja con detectores de UV-vis y/o de índice de refracción. El índice de polaridad (P0) y la fuerza del eluyente ( $\epsilon_0$ ) son parámetros de polaridad que ayudan a elegir la fase para la cromatografía de partición y de adsorción, respectivamente. En cuanto a la GC, existen varios tipos de detectores disponibles en el mercado, y la elección suele depender del tipo de analito y del número de análisis necesarios. Los detectores pueden ser sensibles a la concentración, cuando la señal analítica producida es proporcional a la concentración del analito de interés en el efluente o fluido, o sensibles a la masa cuando la señal producida es proporcional al caudal de masa (Vaz, 2018).

- **Tiempo de retención**

El tiempo de retención (tR), es una característica cromatográfica importante para una especie molecular X, debido a que tiene un valor constante siempre que se mantengan las condiciones cromatográficas y sin la interferencia de otros compuestos, este valor se toma del máximo (el vértice) pico cromatográfico, y por lo general se mide en minutos iniciándose desde la inyección de la muestra en el sistema cromatográfico y concluyendo en el tiempo de elución del compuesto a analizar (Serban Moldoveanu, 2022).

- **Validación de métodos analíticos**

Son parámetros utilizados en química analítica para la aplicación de un determinado método analítico. Las cifras más representativas son: selectividad, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, exactitud, sensibilidad, precisión, y robustez (Harron, 2013). Primeramente, para validar el método analítico, deben definirse estos parámetros, al igual que los límites en los que se pueden aceptar los resultados.

## 2.3 MARCO CONCEPTUAL

### 2.3.1. Definición de términos

- **Selectividad**

La selectividad de un método se investiga usualmente considerando su habilidad de medir el analito de interés en presencia de posibles interferentes, siendo esta añadida deliberadamente. Cuando no es posible identificar los interferentes presentes, la selectividad del método puede ser comparando con los resultados del método que se evalúa con los obtenidos por otro método. Si el método no presenta selectividad, los componentes de la matriz interferirán en el rendimiento de la medición. No obstante, en otra situación imprevista, los estudios de selectividad para una matriz especifican que se realizan en la fase de desarrollo del procedimiento. Por ejemplo, en la pérdida de selectividad puede en HPLC con la presencia de picos “impuros” con señales de más de un compuesto, sin que puedan ser discriminados por el sistema de detección.

Si  $S$  es igual a la unidad, significa que el método es selectivo para el analito:

$$S = \frac{K_A C_A}{K_A C_A + K_{A,I} C_I} \quad (4)$$

Donde:

$K_A$  es el coeficiente de sensibilidad del analito

$C_A$  es la concentración de analito

$K_{A,I}$  es el coeficiente de selectividad

$C_I$  es la interferencia concentración (Vaz, 2018).

A continuación, en la Tabla 4 se presenta la evaluación de la selectividad, en la cual se indican los procedimientos, lo que se debe calcular/determinar y los comentarios.

**Tabla 4***Evaluación de la selectividad*

Procedimiento	Calcular/Determinar	Comentarios
Analizar las muestras y el material de referencia en el método de estudio u otros validados.	La capacidad del método para confirmar la identidad del analito y su capacidad para medir el analito aislado de otras interferencias.	Adecuado para respaldar y conferir suficiente confiabilidad.
Analizar las muestras que contienen varias interferencias en presencia de los analitos de interés.	El efecto de las interferencias. Para determinar si la interferencia mejora o inhibe la detección y cuantificación de los analitos.	Si la detección o cuantificación es inhibida por las interferencias, será necesario continuar con el ajuste o mejoría el método.

*Nota.* Fuente: Picheansoonthon et al., 1990; Vaz, 2018; INMETRO, 2020

- **Linealidad**

Es la capacidad del método analítico para obtener valores proporcionales a la concentración del analito estudiado en un intervalo dado. Para los métodos cuantitativos es necesario conocer el rango de concentraciones del analito en que se basa el método sobre el cual el método puede ser aplicado.

Generalmente se habla del rango en la solución de trabajo más que en la muestra original, aunque muchas veces resulta cómodo también referirlo a la muestra de origen para poder saber si en verdad se han cumplido los objetivos deseados. En el extremo inferior del rango de concentración, el factor limitante es el valor del límite de cuantificación (LQ). En el límite superior, los factores limitantes dependen del sistema de respuesta.

El coeficiente de correlación lineal ( $r$ ), calculado por la ecuación de regresión lineal, se utiliza para indicar si el modelo matemático es adecuado. Alternativamente, se

puede utilizar el coeficiente de determinación  $R^2$  que cuanto más cercano a 1 es la linealidad representada por la ecuación siguiente:

$$y = a + bx \quad (5)$$

Donde:

a: Intercepto de la línea

b: Coeficiente dependiente (Vaz, 2018).

A continuación, se presentará el tratamiento estadístico para resultados de linealidad

### Tabla 5

*Cálculo de la recta de regresión lineal*

<b>Ecuación de la Recta:</b>	$y = a + bx$
Donde:	
X: Concentración de analito	
Y: Valor de la respuesta en área de pico cromatográfico	
a: Valor del interfecto de la recta con el eje “y”	
b: Valor de la pendiente de la recta	
<b>Fórmulas para hallar “b”</b>	<b>Fórmulas para hallar “a”</b>
$b = \frac{\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum(x_i - \bar{x})^2} = \frac{\sum x_i * y_i - \frac{\sum \bar{x} \sum \bar{y}}{n}}{\sum x_i^2 - \frac{(\sum \bar{x})^2}{n}}$	$a = \frac{\sum y_i - b \sum x_i}{n} = \bar{y} - b\bar{x}$
Donde:	
$x_1$ : Valores individuales de concentración	
$y_i$ : Valores individuales de la señal instrumental	
$\bar{x}$ : Media de los valores de x (concentración)	
$\bar{y}$ : Media de los valores y (señal instrumental)	

Fuente: Picheansoonthon et al., 1990; Vaz, 2018; INMETRO, 2020

- **Límite de detección**

El límite de detección (LOD) para un método analítico puede variar dependiendo del tipo de muestra y se define como la concentración mínima de una muestra medida y sustancia declarada con un 95 o 99% de confianza de que la concentración del analito es mayor que cero. Hay varias formas de calcular el LOD, pero la recomendación es que al menos en el cálculo se realizan siete réplicas del blanco (Vaz, 2018). Además, cuando se realizan mediciones en muestras con niveles bajos de analitos, es fundamental conocer el valor de la concentración más baja del analito que puede ser detectado por el método; por lo tanto, hay varias formas de calcular el LD, como son las siguientes:

Evaluación / percepción visual.

Relación señal / ruido.

Estimación a partir de la curva analítica.

Estimación de la desviación estándar de blanco.

Estimación mediante curva de desviación estándar (Picheansoonthon et al., 1990; Vaz, 2018; INMETRO, 2020).

- **Límite de cuantificación**

Es la más baja concentración del analito con un nivel de precisión aceptable; se puede considerar como el valor medio de las lecturas en blanco por sumando 5, 6 o 10 veces la desviación estándar.

Este límite, una vez determinado, debe ser probado con muestras independientes al mismo nivel de concentración/propiedad que el LQ, para verificar que la recuperación/tendencia y la precisión obtenida es satisfactoria. Se presentan varias formas de calcular el LD; por lo cual, se menciona los siguientes:

Evaluación / percepción visual.

Relación señal / ruido.

Estimación a partir de la curva analítica.

Estimación de la desviación estándar de blanco.

Estimar usando la curva de desviación estándar (Picheansoonthon et al., 1990; Vaz, 2018; INMETRO, 2020).

Consideraciones de LQ.

Las ecuaciones comúnmente utilizadas para determinar LOD y LOQ son:

$$LOD = 3,3s/S \quad (6)$$

$$LOQ = 10s/S \quad (7)$$

Donde:

$s$  es la desviación estándar de la media

$S$  es la pendiente de la calibración curva (Vaz, 2018).

- **Recuperación**

Una cifra de mérito que debe tratarse por separado es el porcentaje de recuperación, que se importante para determinar la eficiencia de un método de extracción, con su valor variando entre 70 y 120%:

$$\%R = \left( \frac{C_i - C_f}{C_i} \right) \times 100 \quad (8)$$

Donde  $C_i$  es la concentración inicial añadida del estándar a la matriz, sin trazas del analito, y  $C_f$  es la concentración final determinada en la muestra (matriz + estándar) después de la adición de una concentración conocida del estándar, y de la aplicación de un método de extracción. En cualquier medida que llevemos a cabo existen errores o incertidumbres asociadas con eso. La palabra error puede referirse a la diferencia entre un valor medido y un valor conocido, o estar relacionado con la incertidumbre estimada asociada con una medición o un experimento. Por lo tanto, el error se puede clasificar como aleatorio o indeterminado, sistemático o determinado, y bruto (Vaz, 2018). Cabe mencionar, que la limitación de este procedimiento es que el analito añadido no está necesariamente en la misma forma que está presente en la muestra. Sin embargo, la presencia de analitos añadidos en una forma más fácilmente detectable puede conducir a evaluaciones de recuperación bastante positivos (Picheansoonthon et al., 1990; Vaz, 2018; INMETRO, 2020).

## **CAPÍTULO III**

### **METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN**

#### **3.1 Caracterización o tipo del diseño de investigación**

En el estudio, se tuvo como finalidad desarrollar y validar un método de análisis cromatográfico mediante UHPLC-DAD para la detección y cuantificación de residuos de estrona y progesterona en el afluente y efluente de la PTAR de Ilo; por lo que, el diseño de investigación es de tipo experimental.

#### **3.2 Población y/o muestra de estudio**

##### **3.2.1. Población**

La población está constituida por las aguas de la PTAR de Ilo.

##### **3.2.2. Tipo de muestra**

El tipo de muestra es no probabilístico.

##### **3.2.3. Tamaño de muestra**

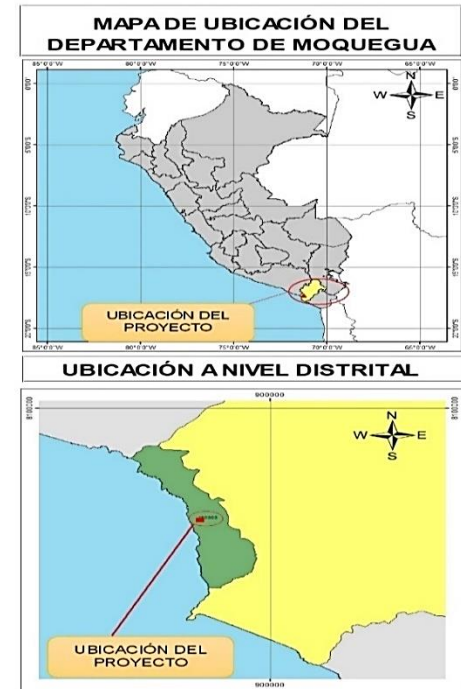
Se tomaron un litro de muestras en el afluente y otra en el efluente, de manera diaria durante 7 días, teniendo un total de 14 muestras.

#### **3.3 Ámbito de estudio**

El presente trabajo de investigación, se realizó en la PTAR – Ilo del departamento de Moquegua, provincia de Ilo, distrito de Pacocha, cuyas coordenadas UTM-WGS 1984 para el afluente es; 250371,39 E, 8052849,44 N y del efluente; 250167,60 E, 8053482,29 N. El Sistema de la PTAR- Ilo, trata sus aguas por medio de Lagunas de Estabilización, las mismas que se encuentran ubicadas en la Playa Media Luna del distrito de Pacocha, construidas en 1994 y consta de una Laguna primaria Aireada, dos Lagunas Secundarias Facultativas y dos Lagunas Terciarias Facultativas, las cuales reciben todos los desagües de la Provincia de Ilo para su tratamiento (ANA, 2012).

**Figura 6**

*Mapa de ubicación para la recolección de muestras en la PTAR-Ilo*



	<b>UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN ESCUELA DE POSGRADO</b>		ESCUELA DE POSGRADO <b>UNJBG</b>
	<b>PLANO:</b> UBICACIÓN DE LOS PUNTOS DE MUESTREO		<b>COORDENADAS</b> WGS 1984 - UTM ZONA 19 SUR
ESCALA:  1: 50,000	<b>LÍMITES POLÍTICOS</b> DEPARTAMENTO: MOQUEGUA PROVINCIA: ILO DISTRITO: PACOCHA		<b>FUENTE:</b> IGN (Instituto Geográfico Nacional) ANA (Autoridad Nacional del Agua)
<b>ELABORADO POR:</b> Clara Neyli Campos Quiróz			

PUNTOS DE LA PTAR ILO	COORDENADAS UTM - WGS 1984	
	ESTE	NORTE
ENTRADA A LA PTAR	250371.39	8052899.44
DESCARGA DE LA PTAR	250167.60	8053482.29

Fuente: Elaboración propia

### **3.4 Instrumentos**

#### **3.4.1. Reactivos y materiales**

Para la selección de las hormonas estrogénicas y progestágenos, se realizó basada en información de artículos científicos de alto factor de impacto; siendo los compuestos seleccionados la estrona (E1) y progesterona (P4), se consiguieron como patrones analíticos de Sigma-Aldrich, cuya pureza es del 99%, USP, Rockville, USA con pureza  $\geq 98\%$  respectivamente; asimismo, se usó Metanol MeOH (grado HPLC), Acetonitrilo ACN (grado HPLC), ácido fórmico (grado HPLC) obtenido de JT Baker Analyzed, ácido ortofosfórico obtenido de Mallinckrodt Chemicals, Agua Milli-Q (Synergy Ultrapure Water Sistem, Millipore, Francia). Los materiales que se emplearon fueron; filtros de politetrafluoroetileno de 0,45  $\mu\text{m}$  (Nylon), jeringas de 5 mL, viales ámbar de 2 mL con tapa, micropipetas o pipeteadores graduables, punteras con volumetría de 0,5 a 1000  $\mu\text{L}$ , cartucho HLB Oasis SPE, probetas, y fiolas con distinto volumen, vasos precipitados, matraces volumétricos con tapón, mangueras de suministro de suero, columna cromatográfica C18, (2,1 X 150 mm, 1,9  $\mu\text{m}$ ), filtros de 13 mm de diámetro, con poros de 0,22  $\mu\text{m}$ , tips de 20, 200 y 1000  $\mu\text{L}$ .

#### **3.4.2. Equipos**

Se usó el UHPLC, Agilent Technologies, equipado con detector DAD 1290 Infinity II, USA y un software de procesamiento de datos, también se utilizó; balanza analítica con sensibilidad de 0,0001 g, cuya capacidad es de 200 g, sistema de filtrado al vacío, campana extractora de gases, bomba de vacío, ultrasonido, concentrador de nitrógeno, purificador de agua, centrífuga refrigerada.

#### **3.4.3. Materiales, equipos de campo e indumentaria de protección**

Los materiales que se usaron fueron; fichas de registro de campo, cadena de custodia, papel secante, cinta adhesiva, plumón indeleble, 14 botellas ámbar de litro con tapa de rosca, caja térmica (cooler), refrigerante, agua destilada y/o desionizada, Na<sub>2</sub>EDTA para la preservación de las muestras, reloj, brazo muestreador, pizarra, piseta, pipeta. Entre los equipos utilizados encontramos a; GPS, multiparámetro con función de medición de parámetros electroquímicos, cámara fotográfica. En cuanto a los EPP se utilizaron zapatos de seguridad, lentes de seguridad, casco, guantes de late descartables, mascarilla descartable, mameluco y chaleco.

## 3.5 Procedimientos

### 3.5.1. Preparación de Fase Móvil

Para realizar la preparación de las fases móviles (agua ultra pura y acetonitrilo) en concentraciones de 1 L cada una, se utilizaron: un embudo Buchner con adaptador de goma, frasco de Erlenmeyer, bomba al vacío, membrana de Nylon 0,2  $\mu\text{m}$ , 47 mm, sistema de filtrado y matrices volumétricas. El primer paso a realizar fue:

- **Filtración al vacío**

Para la filtración al vacío o por succión se colocó el embudo Buchner con membrana de Nylon 0,2  $\mu\text{m}$ , 47 mm acoplado al fondo, sobre el frasco Erlenmeyer, luego se conectó a la bomba al vacío para que esta succione el solvente, quedando impurezas atrapadas en los poros de los filtros, y el resto cae al recipiente.

- **Desgasificación de la fase móvil**

La formación de burbujas puede causar problemas en el análisis HPLC; por lo que, fue necesario la desgasificación de las fases móviles, para lo cual se usó un baño de ultrasonido, donde se colocó la fase móvil a sonicar durante 10 minutos, los solventes convirtieron los gases disueltos en pequeñas burbujas, las cuales flotaron en la superficie y se eliminaron. Este procedimiento se llevó a cabo a temperatura ambiente. Terminado el tiempo, se apagó el ultrasonido y se colocó el agua ultra pura (frasco color ámbar) y acetonitrilo (ACN) (frasco transparente) en la bandeja de solventes.

### 3.5.2. Fase estacionaria

Se seleccionó la columna C18 (2,1 X 150 mm, 1,9  $\mu\text{m}$ ), que fue incorporada en el cromatógrafo, para lo cual el flujo inicial estuvo en 0, posterior a ello se procedió a purgar el sistema con las siguientes condiciones de los canales:

A = 50% de agua ultra pura cuyo flujo fue de 5 mL/min

B = 50 % ACN con un flujo de 0,1 mL/min

Se observó además que no exista formación de burbujas en las mangueras y que la presión no se eleve, ya que estos son indicadores de fuga.

### 3.5.3. *Preparación de soluciones estándar*

Se prepararon soluciones madre individuales de E1 y P4, para lo cual se pesaron en una balanza analítica 5 mg de cada patrón que fueron colocados en frascos de vidrio ámbar individuales, con el fin de evitar la fotodegradación, luego en dos fioles de 5 mL, se añadió metanol con ayuda de una pipeta Pasteur hasta completar el aforado, luego se colocó en cada frasco y se homogenizó, obteniéndose las soluciones madre de cada analito en concentraciones de 1 mg/mL respectivamente. Una vez listas las soluciones se llevaron a refrigerar a menos de 20 °C.

### 3.5.4. *Preparación de mix de E1 y P4*

Se realizó con el fin de establecer las condiciones del método inyecciones de 10 µL, para lo cual se diluyó aplicando la siguiente fórmula:

$$C_i * V_i = C_f * V_f \quad (9)$$

1° *Se reemplaza en (9) para diluir la solución madre a 100 µg/mL*

Donde  $C_i = 1\text{mg/mL}$

$C_i = 1000 \mu\text{g/mL}$

$$1000 \mu\text{g} * V_i = 100 \mu\text{g} * 10 \text{mL}$$

$$V_i = \frac{100 \mu\text{g} * 10 \text{mL}}{1000 \mu\text{g}}$$

$$V_i = 1 \text{mL}$$

Por lo tanto, se colocó 1 mL de E1 y 1 mL de P4 en una fiola de 10 mL y se completó con MeOH hasta el menisco, homogenizando la muestra, luego se colocó en un frasco de vidrio ámbar, rotulado con los nombres de los compuestos y la fecha de preparación.

2° *Se reemplaza en (9) para diluir la solución de 100 µg/mL a 10 µg/mL*

Donde  $C_i = 100 \mu\text{g/mL}$

$$100 \mu\text{g/mL} * V_i = 10 \mu\text{g} * 10 \text{mL}$$

$$V_i = \frac{10 \mu g * 10 mL}{100 \mu g}$$

$$V_i = 1 \text{ mL}$$

Se tomó la nueva solución con pipeta colocándola en un nuevo frasco de vidrio ámbar, debidamente rotulado indicando la nueva concentración, nombres de los compuesto y fecha.

Para el análisis cromatográfico, se tomó 1 mL y se colocó en un vial, rotulado como mix de E1 y P4 y fecha. Cabe mencionar que el rotulado es importante debido a que las hormonas son degradables, por lo que pasado un tiempo se tiene que volver a preparar.

### ***3.5.5. Desarrollo del método cromatográfico para el análisis de agua de afluyente y efluente en PTAR***

Para el análisis de E1 y P4, se utilizó un sistema de UHPLC – DAD, que está compuesto por un cromatógrafo líquido (UHPLC, Agilent 1290 Infinity II, USA), además se encuentra acoplada a un detector de arreglo de diodos, y está equipada con una bomba analítica binaria de 1290 series, una bomba cuaternaria Infinity 1290 II, un inyector que es automático 1290 Infinity con adaptador de volúmenes hasta los 20  $\mu$ L.

### ***3.5.6. Condiciones cromatográficas***

Los analitos fueron separados con una columna InfinityLab Poroshell HPH-C18 (2,1 X 150 mm, 1,9  $\mu$ m), a una temperatura de 25 °C, volumen de inyección 5  $\mu$ L. La elución se realizó utilizando un gradiente lineal de la fase móvil comenzando en el minuto 0 con 90 % de agua ultra pura (A) y 10 % de ACN (B), luego en el minuto 5 se cambió a 50 % de A, y 50 % de B, después en el minuto 10 se cambia a 54 % de A y 46 % de B, finalmente en el minuto 13 se cambió a 60 % de A y 40 % de B, terminado esta gradiente el tiempo restante fue de 2 minutos; es decir el stoptime se programó para 15 minutos y el postime 3 minutos. El flujo fue de 0,35 mL/min con una presión aproximada de 600 bar. Finalmente, la identificación de los picos fue realizado usando los tiempos de retención y la información espectral proporcionada por el DAD (longitud de onda) a 230 nm.

### 3.5.7. Validación del Método analítico

Para el desarrollo y validación del método analítico por un sistema UHPLC- DAD; para detección y cuantificación de E1 y P4, se tuvo en cuenta las metodologías o experimentos basados en la DOQ-CGCRE-008 (Picheansoonthon et al., 1990; Vaz, 2018; INMETRO, 2020) que consisten en:

- **Selectividad**

La selectividad es un método en el que se verifica la presencia de picos en la región del tiempo de retención de los analitos, para lo cual se inyecta un blanco el cual para el presente estudio fue agua del río Osmore, de la parte alta, esto con el fin de garantizar que este alterada. Además, se usaron varias muestras, y se observó la ausencia de picos cercanos al tiempo de retención de E1 y P4.

- **Linealidad**

Es la capacidad del método de obtener los resultados directamente proporcionales a la concentración de los analitos en la muestra. Para lo cual se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

1° Se seleccionó el rango de trabajo.

2° Preparación de las diferentes concentraciones de modo independiente.

A partir de mix E1 y P4 de 10 y 100  $\mu\text{g/mL}$ , se prepararon 5 niveles para la curva de calibración en un rango de (0,05  $\mu\text{g/mL}$  a 4  $\mu\text{g/mL}$ ).

3° Se colocó las concentraciones de los analitos en el eje “x” y en el eje “y” las respuestas de las mediciones (área).

4° Verificación de la existencia o no de los valores atípicos que puedan interferir en la regresión (Prueba Grubbs).

5° Corroboración de la homogeneidad de las varianzas de la distribución de los datos (Pruebas de Cochran y Levene).

6° Realización de la evaluación de la regresión lineal y cálculo del coeficiente de correlación  $r$  y determinación de  $R^2$ .

7 ° Evaluación mediante la prueba F en el ANOVA.

- **Determinación de límite de detección (LD)**

Se inyectan diferentes concentraciones, comenzando con 10 µg/mL, y luego menores a esta, observándose si la señal es 3 veces mayor que la amplitud del ruido. Para calcular el LD se usó la siguiente fórmula:

$$LD = \frac{C*3*1}{S/N} \quad (10)$$

Donde:

C es la concentración inyectada (E1 y P4)

S/N es la señal ruido (obtenido del cromatograma)

- **Determinación de límite de cuantificación (LQ)**

Para el LQ la señal es 10 veces mayor que la amplitud del ruido, y a partir de ello se cuantifica la cantidad existente, para lo cual se emplea la siguiente fórmula:

$$LQ = LD * 3,3 \quad (11)$$

Donde

LD es el límite de detección calculado en la ecuación (10)

- **Recuperación**

Para la recuperación de los analitos se estimó analizando muestras enriquecidas con cantidades conocidas del analito. Se probaron con; concentraciones bajas, medias y altas dentro del rango de uso del método. Además, se determinó la eficacia del método de extracción, cuyo valor varía entre el 70 y el 120%.

La recuperación se calcula según la ecuación:

$$Recuperación (\%) = \left( \frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) X 100$$

Donde:

C<sub>1</sub>: Concentración inicial de analito en muestra enriquecida.

C<sub>2</sub>: Concentración final de analito en muestra no enriquecida (matriz + estándar).

C<sub>3</sub>: Concentración inicial de analito añadido a la muestra enriquecida.

### ***3.5.8. Etapa de monitoreo***

- **Protocolo de toma de muestras**

La metodología que se empleó para el desarrollo de monitoreo fue conforme al “Protocolo de la calidad de efluentes de las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales domesticas o municipales”, elaborados por el ministerio de vivienda, construcción y saneamiento (MVCS).

#### ***Toma de muestras de agua residual***

Para la extracción de muestra, la recolección fue en botellas de vidrio color ámbar de aproximadamente (1 L) los cuales se lavaron con acetona, además fueron esterilizados respectivamente.

#### ***Preservación de muestras***

Una vez tomada la muestra, se agregó 0,1 g de Na<sub>2</sub>EDTA de reactivo de preservación a las muestras, con el fin de evitar algunas formaciones de complejos entre los metales presentes y las hormonas.

#### ***Etiquetado y rotulado de las muestras de aguas residuales***

Los frascos fueron etiquetados y rotulados, con letra clara y conteniendo la siguiente información: Nombre de PTAR y denominación del punto de monitoreo, número de muestra, fecha y hora de la toma de muestra, preservación realizada, tipo de reactivo de preservación utilizado y operador del muestreo.

- **Medición de parámetros fisicoquímicos**

Los parámetros de campo a medir fueron; el pH, conductividad, SDT, salinidad, OD, ORP, resistividad, y temperatura, para lo cual se usó un equipo multiparámetro con función de medición de parámetros electroquímicos para obtener la confiabilidad de los datos, primero se verificó la calibración del equipo siguiendo el manual de instrucciones del multiparámetro, luego se conectó el sensor al multiparámetro y se lavó el electrodo

con agua ultra pura y se secó con papel tisú, se tomó una muestra simple en un recipiente apropiado y limpio y se sumergió el electrodo esperando que se estabilice para anotar los valores, este procedimiento se llevó a cabo para determinar cada parámetro. La información recabada de la medición de parámetros de campo, se anotaron en el formato de Registro de Datos de Campo.

Además, se hizo el llenado del formato de Cadena de Custodia, indicando los parámetros evaluados, tipo de muestra de agua (agua residual cruda, agua residual tratada, etc). La conservación y transporte de las muestras de agua residual recolectadas, preservadas y rotuladas, se colocaron en una caja de almacenamiento térmica con refrigerante (ice pack), a una temperatura de 4°C para luego transportarlo al Laboratorio de Contaminantes Orgánicos y Ambiente del IINDEP de la Universidad Nacional de Moquegua – Sede ILO. El monitoreo se realizó en época de invierno del 04 al 10 de agosto de 2022 en el afluente y efluente de la PTAR de Ilo.

### ***3.5.9. Protocolo para la extracción de muestras***

- **Extracción en fase sólida (SPE)**

Para la SPE, se usó una bomba al vacío y una bomba peristáltica lo cual proporciona un flujo constante. Se utilizó cartuchos HLB SPE, los cuales fueron acondicionados con 10 mL de MeOH, esto con el fin de activarlos, luego se agregaron 10 mL de agua ultra pura, pero sin la bomba al vacío, el flujo cayó por gravedad. Las muestras de 1 L (tomadas del afluente y efluente de la PTAR Ilo), fueron filtradas por medio de dos filtros de membrana de 0,2  $\mu\text{m}$ , luego se pasaron a los cartuchos para que se concentren los analitos de interés. Se usó un flujo de 10 mL/min constante de muestra, además, se empleó un secado al vacío en un sistema de secado múltiple. La elución se realizó con 10 mL de MeOH, que fue acidificado con 10  $\mu\text{L}$  de ácido fórmico. Los extractos fueron recogidos en tubos de ensayos y fueron centrifugados a 4000 rpm durante 5 minutos para poder sedimentar, luego fueron secados en concentrador de nitrógeno, teniendo la muestra seca se agrega 1 mL de MeOH, enjuagando el tubo, se extrajo la muestra con una pipeta y se colocó en una jeringa de 3 mL que tiene fibras de filtro con 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro (PTFE-L SYRINGE FILTER), y se vació en los viales debidamente rotulados, finalmente se inyectaron al equipo para su respectiva lectura.

### **3.6 Tratamiento de datos (análisis estadísticos)**

Los datos fueron consolidados en hojas de cálculo de EXCEL elaboradas para el procesamiento estadístico de la información. Además, fueron procesadas en R studio.

#### **1. Aplicación de Excel**

- Tabla para la determinación del RSD y evaluación de Hortwitz.
- Tabla de resultados obtenidos de la prueba de repetibilidad.
- Tabla de prueba de Grubbs y Hortwitz.
- Tabla de resultados de adiciones a diferentes niveles de concentración.
- Tabla de resultados de concentración y los factores de respuesta en linealidad.
- Tabla de resultados de concentración y las áreas a concentraciones cercanas al límite esperado.
- Tabla de resultados de los promedios de los factores de respuesta y de la varianza para linealidad (Test de Cochran).

#### **2. Análisis por regresión lineal**

Del modelo  $y = ax + b$

La correlación (R) entre variable independiente y dependiente debe ser mayor al 0,995, mientras el porcentaje de correlación (% R) debe ser mayor al 99,5 %. Se analizaron los residuos obtenidos a partir de los datos ingresados para obtener la curva de regresión.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN

#### 4.1 Análisis de campo

Se tomaron muestras tanto del afluente como efluente de la PTAR de Ilo, región Moquegua, provincia de Ilo, distrito de Pacocha, de acuerdo al “Protocolo de la calidad de efluentes de las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales domesticas o municipales”, obteniéndose 1 L de aguas residuales del afluente y 1 L del efluente de manera diaria durante 7 días, teniendo un total de 14 muestras.

- **Medición de parámetros fisicoquímicos in situ**

Se realizó la medición in situ de los parámetros fisicoquímicos para lo cual se utilizó un equipo multiparámetro. Los resultados de los análisis fisicoquímicos (pH, conductividad eléctrica (EC), sólidos totales disueltos (SDT), salinidad, oxígeno disuelto (OD), potencial de redóx (ORP), resistividad, temperatura(T°)) para muestras de agua residual de la PTAR Ilo en el afluente y efluente tal como se muestran en las Tablas 6 y 7 respectivamente.

**Tabla 6**

*Análisis fisicoquímicos de muestras de agua residual del afluente de la PTAR Ilo*

<b>Muestra</b>					<b>OD</b>		<b>Resistividad</b>	<b>T°</b>
Afluente/ Fecha	<b>pH</b>	<b>CE</b> (S/cm)	<b>TDS</b> (PPM)	<b>Salinidad</b> (PSU)	(%)	<b>ORP</b>	(ML. Cu)	(°C)
04-08-22	7,41	9,87	5925	6,86	14,4	104,6	0,0001	21,08
05-08-22	7,72	6,84	4150	4,60	13,3	51	0,0001	22,3
06-08-22	6,84	7,60	5756	6,53	9,6	ND	0,0001	21,5
07-08-22	7,51	7,46	4412	4,96	9	ND	0,0001	22,6
08-08-22	7,43	6,75	3713	4,10	8,11	ND	0,0001	20,8
09-08-22	7,49	12,03	6036	6,96	8,5	105,2	0,0001	22,9
10-08-22	7,60	10,37	5473	6,23	4,4	ND	0,0001	18,74

*Nota.* ND: no determinado, CE: conductividad eléctrica, SDT: sólidos totales disueltos, OD: oxígeno disuelto, ORP: potencial de oxidación y reducción y T°: temperatura

**Tabla 7***Análisis fisicoquímicos de muestras de agua residual del efluente de la PTAR Ilo*

<b>Muestra</b> Efluente/ Fecha	<b>pH</b>	<b>CE</b> (S/cm)	<b>SDT</b> (PPM)	<b>Salinidad</b> (PSU)	<b>OD</b> (%)	<b>ORP</b>	<b>Resistividad</b> (ML. Cu)	<b>T°</b> (°C)
04-08-22	7,84	8,61	5256	6	37,8	96,5	0,0001	19,08
05-08-22	7,82	8,32	5027	5,85	37,9	60,2	0,0001	20,4
06-08-22	7,99	8,56	4530	5,52	33,3	43	0,0001	20,5
07-08-22	7,88	8,71	5211	5,93	31,8	96,2	0,0001	21,6
08-08-22	7,87	9,02	5086	5,84	14,8	22,1	0,0001	22,8
09-08-22	8,00	10,71	5365	6,14	44,4	99	0,0001	21,9
10-08-22	7,09	10,24	5532	6,30	26,8	95,6	0,0001	21,11

*Nota.* ND: no determinado, CE: conductividad eléctrica, SDT: sólidos totales disueltos, OD: oxígeno disuelto, ORP: potencial de oxidación y reducción y T°: temperatura

#### **4.2 Validación del método cromatográfico**

Con la finalidad de desarrollar un método cromatográfico que permita detectar, separar y cuantificar hormonas estrogénicas y progestágenas simultáneamente, en primer lugar, se inyectó un rango de concentración definido de cada analito por elución en una columna InfinityLab Poroshell HPH-C18 (2,1 X 150 mm, 1,9 µm), de fase reversa para su corrida en el cromatógrafo de líquidos acoplado a detector de diodos (UHPLC-DAD). Este procedimiento se llevó a cabo con el fin de determinar los parámetros de los instrumentos que consta de: composición de la fase móvil, temperatura, volumen de inyección flujo, que sirven para detectar los analitos de interés. Asimismo, con este procedimiento podemos determinar el tiempo de retención para cada uno de los compuestos.

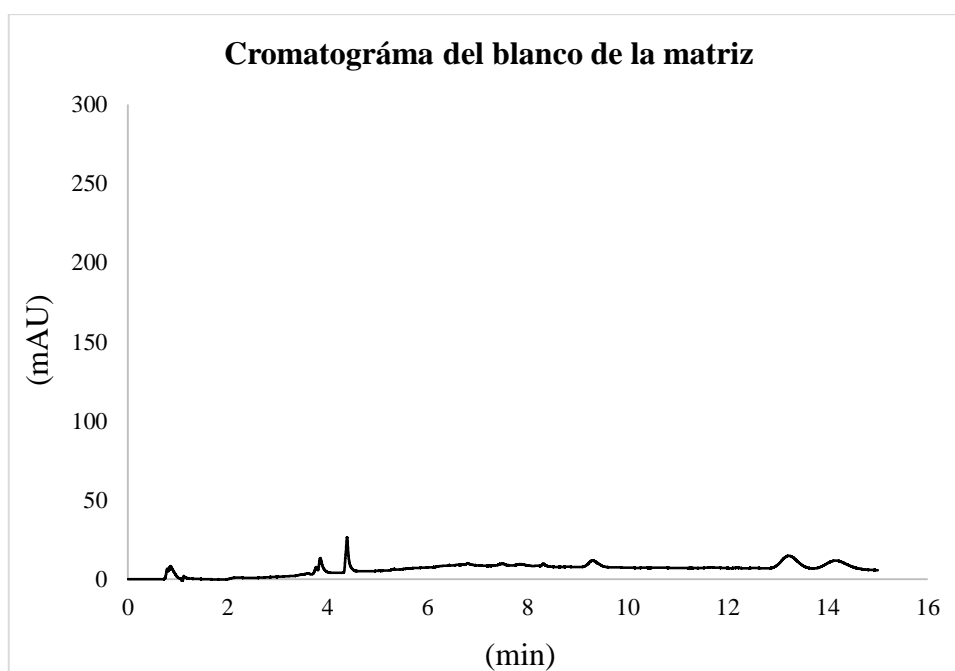
Para realizar la validación del método se basó en el DOQ-CGCRE-008 que incluye: selectividad, linealidad, LD, LQ y recuperación.

#### 4.2.1 Selectividad

Se comprobó que el método es selectivo; ya que, no se encontraron picos interferentes en los tiempos de retención, en comparación con el cromatograma del blanco de agua de río y la corrida de los analitos como se muestran en las Figuras 7 y 8, respectivamente. Los tiempos de retención para los analitos se muestran en la Tabla 11.

**Figura 7**

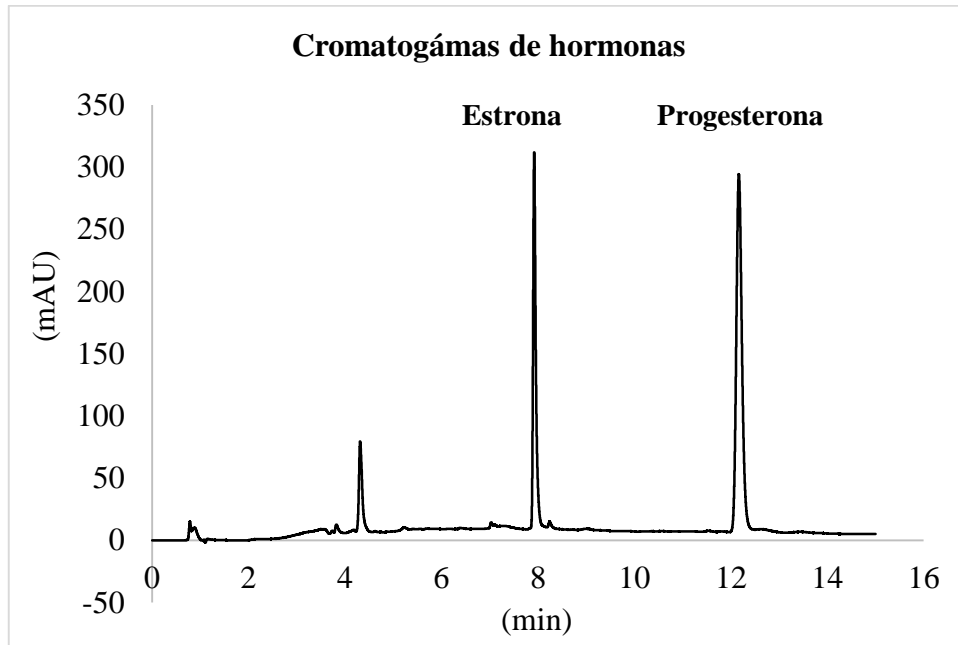
*Cromatograma del blanco de matriz para la selectividad*



*Nota.* El blanco de matriz, es agua del río Osmore (parte alta), y no presenta interferentes en el tiempo de análisis.

**Figura 8**

*Cromatograma de hormonas estudiadas*



*Nota.* Cada analito ha sido identificado por su tiempo de retención, esto se logró con las condiciones anteriormente descritas en el procedimiento.

#### **4.2.2 Linealidad**

Para realizar la curva de calibración, se usaron niveles de concentración que fueron distribuidos uniformemente en un rango de trabajo previsto, para construir la curva analítica. Se preparó cinco diluciones, cuyas soluciones fueron de 0,05, 0,5, 1, 2, 4  $\mu\text{g/mL}$ , para cada analito. En las Tablas 8 y 9 se detallan los cálculos de las ecuaciones, y las curvas de calibración para E1 y P4 se muestran en las Figuras 9 y 10 respectivamente.

**Tabla 8**

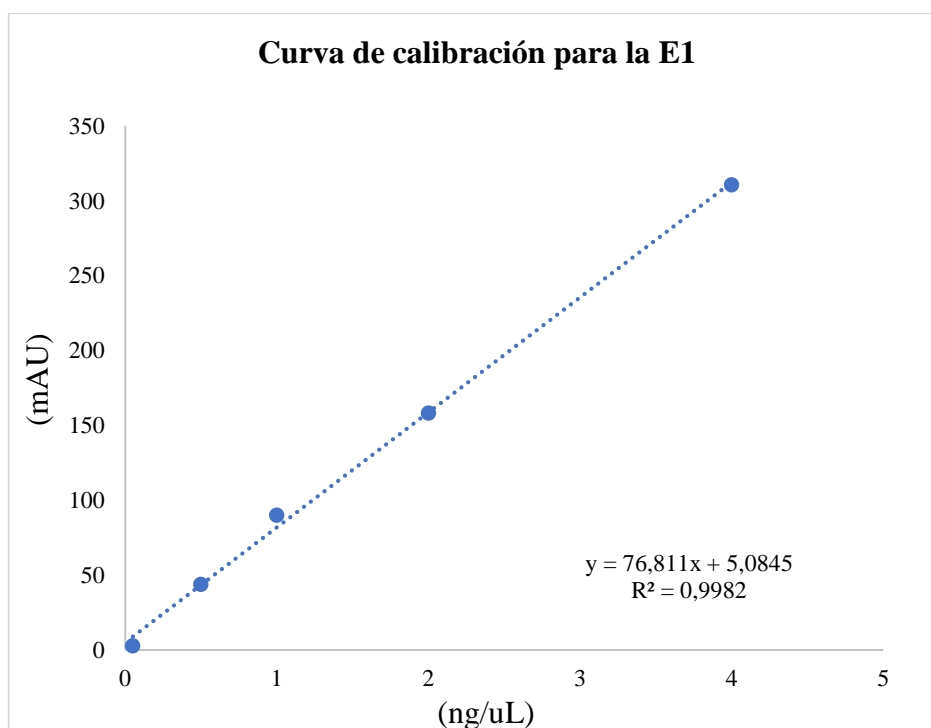
*Cálculo de la curva de calibración para la E1*

Compuesto	Concentración μg/mL	Área	Ecuación de Regresión	R <sup>2</sup>
Estrona	0,05	2,752	$y = 76,811x + 5,0845$	0,9982
	0,5	43,842		
	1	89,985		
	2	158,15		
	4	310,60		

*Nota.* La ecuación de la recta que se obtuvo a partir de la curva de calibración para la E1, servirá para los cálculos futuros respecto a las muestras.

**Figura 9**

*Prueba de linealidad para la curva de calibración de la E1*



*Nota.* La curva de calibración para E1, tiene un R<sup>2</sup> de 0,9982

**Tabla 9**

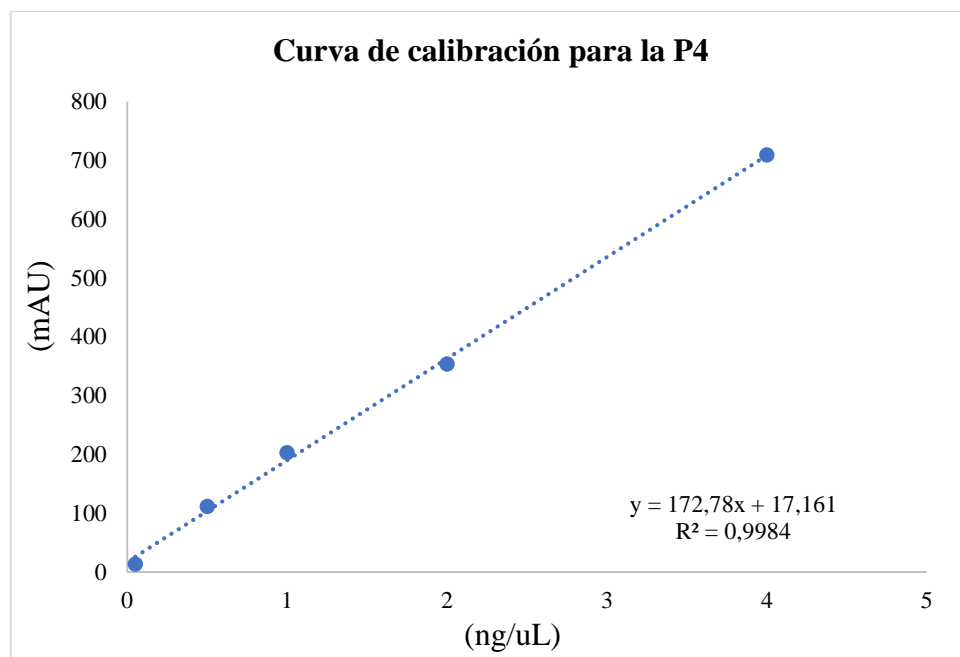
*Cálculo de la curva de calibración para la P4*

Compuesto	Concentración µg/mL	Área	Ecuación de Regresión	R <sup>2</sup>
Progesterona	0,05	13,604	$y = 172,78x + 17,161$	0,9984
	0,5	111,43		
	1	202,88		
	2	353,61		
	4	708,77		

*Nota.* La ecuación de la recta que se obtuvo a partir de la curva de calibración para la P4, servirá para los cálculos futuros respecto a las muestras.

**Figura 10**

*Prueba de linealidad para la curva de calibración de la P4*



*Nota.* La curva de calibración para P4, tiene un R<sup>2</sup> de 0,9984

### 4.2.3 LÍMITE DE DETECCIÓN (LD)

El LD, es la menor concentración del analito que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificado, pudiendo darse una relación señal - ruido de 3:1, siendo así condiciones experimentales establecidas (INMETRO, 2020). Para el cálculo de LD de la E1 y P4 se usó la ecuación (10).

### 4.2.4 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LQ)

El LQ, es la menor concentración del analito, que puede cuantificarse en la muestra, cuyas condiciones experimentales son la exactitud y precisión. Se usa el mismo criterio empleado del LD para el LQ, usando la relación señal – ruido de 10:1, lo que indica que se puede calcular utilizando el método visual (INMETRO, 2020). Se utilizó la ecuación (11) para el cálculo de LQ.

En la Tabla 10 se muestran los cálculos para determinar el LQ y el LD tanto para E1 como P4.

**Tabla 10**

*Cálculo del LD y LQ de la E1 y P4*

<b>Compuesto</b>	<b>Señal / ruido</b>	<b>LD</b> ( $\mu\text{g/L}$ )	<b>LQ</b> ( $\mu\text{g/L}$ )
E1	68,8	0,0021802	0,00719
P4	27,9	0,0053763	0,01774

*Nota.* En cuanto a los LD y LQ, se determinaron con la cantidad mínima detectable de E1 y P4 que fue de 0,05  $\mu\text{m/mL}$ , con una S/N de 68,8 y 27,9 respectivamente, cuyos índices se obtuvieron del software Agilent Más Hunter, que pertenece al mismo equipo UHPLC.

### 4.2.5 Recuperación

Cada compuesto ha sido identificado acorde al TR, concentración inyectada en el equipo y su área como producto final, para obtener la ecuación de la recta para E1 y P4 se fortificó el blanco de matriz (libre de estos analitos), con 2 concentraciones diferentes (0,5  $\mu\text{g/L}$  y 1  $\mu\text{g/L}$ ), en cuanto a la precisión del procedimiento se calculó con la desviación estándar (SD) en las 5 réplicas, el valor para la E1 fue de 0,02 y para el P4 fue de 0,01; asimismo, se calculó el coeficiente de variabilidad (%CV) el cual fue menor al

20%, para dichos valores se realizaron cálculos previos como el promedio, media (M) de recuperación (n = 5) estuvieron en un rango de 92,43 y 109,27 %. Los valores de la recuperación por extracción y efecto matriz para E1 y P4 se muestran en la Tabla 11; asimismo, se repitió la fortificación con las mismas condiciones, como se muestra en la Tabla 12.

**Tabla 11***Cálculos de la recuperación de E1 y P4*

Compuesto	TR (min)	ER	R <sup>2</sup>	RECUPERACIÓN 0,5 µg L <sup>-1</sup>				RECUPERACIÓN 1 µg L <sup>-1</sup>			
				RF	% R	M % R	CV %	RF	% R	M % R	CV %
E1	7,97	Y=111,650932 X + 3,6238278	0,9997	0,55	109,27			1,06	106,13		
				0,52	103,18			1,04	104,16		
				0,46	92,43	101,10	6,29	0,88	88,22	103,11	8,27
				0,51	103,00			1,09	109,09		
				0,49	97,63			1,08	107,93		
				0,54	107,88			1,03	102,89		
P4	12,35	Y= 174,644146 X + 4,0305206	0,9997	0,50	100,09			1,01	100,83		
				0,44	87,38	96,86	7,98	0,86	85,72	99,89	8,13
				0,48	96,20			1,06	105,64		
				0,46	92,76			1,04	104,38		

*Nota.* El método establecido muestra una alta sensibilidad, precisión y potencial de análisis de los niveles de E1 y P4 en muestras de agua. Donde; ER: ecuación de la recta, RF: recuperación de la fortificación, M%R: media del porcentaje de recuperación, CV: coeficiente de variabilidad.

**Tabla 12***Cálculo de la segunda recuperación de E1 y P4 (Repetibilidad)*

Compuesto	TR (min)	ER	R <sup>2</sup>	RECUPERACIÓN 0,5 µg L <sup>-1</sup>				RECUPERACIÓN 1 µg L <sup>-1</sup>			
				RF	% R	M % R	CV %	RF	% R	M % R	CV %
E1	7,97	Y=114,135732 X + 5,0335977	0,9996	0,57	114,60			1,20	119,65		
				0,59	118,46			1,18	118,46		
				0,57	114,07	116,39	1,71	1,16	116,15	117,82	1,31
				0,58	116,70			1,17	117,02		
				0,59	118,10			1,18	118,46		
				0,56	111,66			1,19	119,37		
P4	12,35	Y= 177,682753 X + 5,2275417	0,9997	0,58	116,05			1,16	116,22		
				0,56	111,43	113,64	1,87	1,18	118,08	118,05	1,13
				0,57	113,57			1,19	118,53		
				0,58	115,49			1,18	118,08		

*Nota.* El método es repetible con las mismas condiciones dadas para calcular la recuperación. Donde; ER: ecuación de la recta, RF: recuperación de la fortificación, M%R: media del porcentaje de recuperación, CV: coeficiente de variabilidad.

### 4.3 Concentración de hormonas encontradas en los puntos de monitoreo

En la Tabla 13 se muestran las concentraciones de E1 y P4, que se obtuvieron durante el monitoreo en la PTAR de Ilo, tanto en el afluente como efluente durante 7 días, teniendo un total de 14 muestras. En los datos obtenidos se muestra que respecto a la P4 no se encontraron concentraciones de este compuesto, sin embargo, se encontraron altas concentraciones para la E1 en ambos puntos de muestreo, lo que indicaría que este compuesto es crítico para el medio ambiente.

**Tabla 13**

*Concentraciones de E1 en el afluente y efluente de la PTAR de Ilo*

<b>Punto de muestreo</b>	<b>Compuesto</b>	
	<b>E1</b> ( $\mu\text{g/l}$ )	<b>P4</b> ( $\mu\text{g/l}$ )
<b>Afluente</b>		
Día 1-A	7,2	nd
Día 2-A	8,8	nd
Día 3-A	1,3	nd
Día 4-A	6,2	nd
Día 5-A	11,5	nd
Día 6-A	10,8	nd
Día 7-A	5,7	nd
<b>Efluente</b>		
Día 1-E	2,2	nd
Día 2-E	1,8	nd
Día 3-E	2,1	nd
Día 4-E	2,3	nd
Día 5-E	2,6	nd
Día 6-E	2,1	nd
Día 7-E	8,2	nd

*Nota.* Los valores para la E1 están por encima del LQ según la validación. (nd: no detectado)

#### 4.4 Análisis estadístico

El registro de los datos se consolidó en hojas de cálculo del programa Excel adaptadas para este fin, Además, se realizaron diferentes test que fueron procesadas en R studio.

##### Test de normalidad

Para el test de normalidad se aplicó Shapiro Wilk, ya que es el adecuado para datos de menor cantidad

Shapiro-Wilk normality test

data: Estrona

W = 0,82041, p-value = 0,009027

- Se observa que los datos no tienen una distribución normal.

##### Test de homogeneidad de varianza

A fin de evaluar la homogeneidad de varianza, se aplicó el Test de Levene.

Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = "mean")

Df F value Pr(>F)

group 1 9'495 0,009513 \*\*

12

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1 ' ' 1

- Los datos no tienen varianzas semejantes

Entonces al no tener una normalidad y semejanza de varianza, se aplicó una estadística no paramétrica para comparar el rango medio de las dos muestras relacionadas y determinar si existe diferencia entre ellas. Para ello se aplicó:

##### Test de Wilcoxon

Wilcoxon signed rank exact test

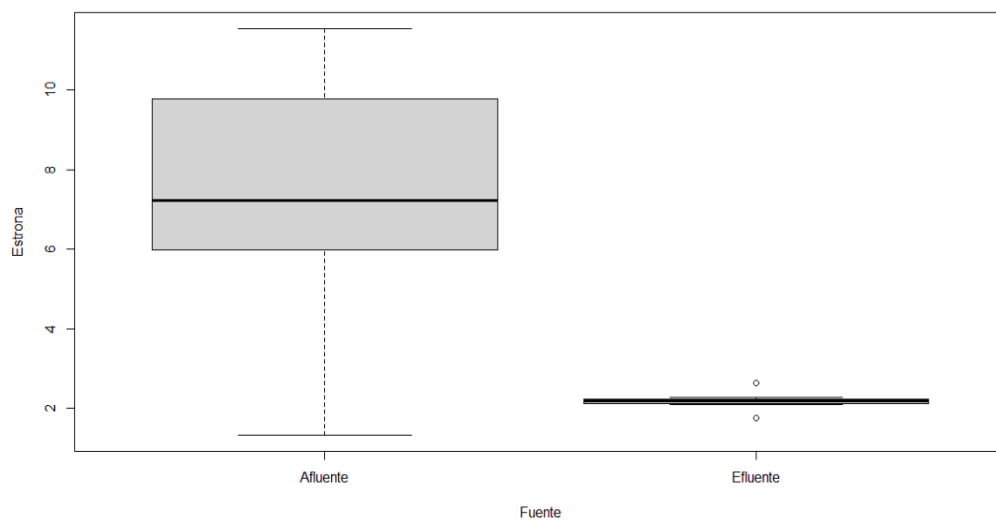
data: Estrona by Fuente

$V = 27$ ,  $p\text{-value} = 0,03125$  (este dato evidencia que hay diferencia significativa  $p \leq 0,05$ )

Por lo tanto, existe diferencia estadísticamente significativa entre la concentración del afluente y el efluente para la E1, como se muestra en la Figura 11.

### Figura 11

*Prueba de Wilcoxon para E1 en afluente y efluente de la PTAR de Ilo*



*Nota.* Se muestra la diferencia entre los valores encontrados de E1 durante el monitoreo

## DISCUSIÓN

En cuanto al desarrollo y validación del método se utilizó un sistema de UHPLC – DAD, columna de separación InfinityLab Poroshell HPH-C18 (2,1 X 150 mm, 1,9  $\mu\text{m}$ ), para la fase móvil se usó agua ultra pura (A) y ACN (B), el flujo fue de 0,35 mL/min, la longitud de onda de detección a 230 nm, obteniéndose el TR (min) para la E1 y P4 de 7,97 y 12,35 respectivamente, como se muestra en la Tabla 11, y en comparación con literatura científica muestra que se encuentra dentro de los rangos esperados, asimismo Li et al. (2021), analizaron muestras de hormonas estrogénicas mediante espectrometría de masas en tándem de cromatografía líquida (LC-MS/MS, LCMS-8050, Shimadzu, Japón) usando ionización por electrospray (ESI) en modo negativo, a la cual se le acopló una columna Shimadzu-pack GISS C18 (2,1 X 100 mm, 1,9  $\mu\text{m}$ ), fase móvil inorgánica A (0,075%  $\text{NH}_4\text{OH}$ ) y fase móvil orgánica B (MeOH/ACN, 1:1, v/v), el TR para la E1 fue de 5,740, también Ribeiro et al. (2010), validaron un método con HPLC-DAD, usando una columna C18 (Merck, Darmstadt, Germany), para la fase móvil se usó Acetonitrilo y agua (52:48 v/v), con un flujo de 1 mL/min, y longitud de onda 280nm, obteniendo un TR (min) para E1 fue de 7,95. Además, Pérez & Escandar (2016), para la detección de estrógenos y progestágenos usaron un cromatógrafo de líquidos HP 1200 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) que está equipado con un desgasificador, bomba cuaternaria, un inyector manual, para las separaciones HPLC utilizaron una columna Poroshell 120 EC (4,6 X 100 mm, 2,7  $\mu\text{m}$ ) (Agilent Technologies, Santa Clara, CS, EE.UU), fase móvil 50/50 de agua y acetonitrilo, los rangos de TR (min) para E1 (3,30-3,60) y P4 (6,70-15,5), con longitudes de onda (nm) (200-330) y (200-330) respectivamente. Por otro lado, Alcántara, (2018), para cuantificar Etinilestradiol y Desogestrel (píldora de P4), usó un equipo HPLC Thermo Scientific™ UltiMate™ 3000 UHPLC, columna BDS Hypersil C18 150 MM x 4,6 mm y 5  $\mu\text{m}$ , empleó 2 soluciones A que consistió en mezcla compuesta por agua purificada y acetonitrilo (90:10) y la solución B fue una mezcla de agua purificada y acetonitrilo (5:95), la con un flujo fue de 1,0 mL/min, y 208 nm longitud de onda; teniendo bajo estas condiciones un tiempo de retención de 3,092 y 8,958 para Etinilestradiol y Desogestrel respectivamente.

Además se examinaron la ER y los coeficientes de correlación ( $R^2$ ) como se muestran en las Tabla 11 y Tabla 12 teniendo valores de  $R^2 \geq 0,9997$ ,  $R^2 \geq 0,9997$  y  $R^2 \geq 0,9997$ ,  $R^2 \geq 0,9997$  para E1 y P4 respectivamente; debido a que, se aproxima a 1, indica que los resultados de los análisis son directamente proporcionales a la concentración de los analitos en muestra, determinándose así la linealidad (INMETRO, 2020). De igual forma se determinó la media de porcentaje de recuperación (M%R) para los analitos de interés, como se muestra en la Tabla 11, para la recuperación se utilizaron concentraciones de 0,5  $\mu\text{g/L}$  obteniéndose M%R de (101,10 %, 96,86 %) , y 1  $\mu\text{g/L}$ , (103,11 %, 99,89 %), del mismo modo en la Tabla 12 se presentan los valores encontrados para la M%R (116,39 %, 113,64 %) en concentraciones de 0,5  $\mu\text{g/L}$  y (117,82 %, 118,05 %) para la recuperación de 1  $\mu\text{g/L}$ , lo que indica que se cumple con los criterios de aceptación (70-120 %) (INMETRO, 2020), igualmente Goeury et al. (2019), realizaron la recuperación de SPE en línea obteniendo una eficiencia entre (64-79 %), señalando además que no lograron una extracción completa; sin embargo señalan que las pérdidas de recuperación se integraron dentro del procedimiento de cuantificación, debido a que las muestras y los niveles de calibración coincidentes con la matriz se enviaron al SPE en línea : UHPLC-MS/MS, asegurando un análisis preciso. Por otro lado Singh et al. (2013), determinaron los % R en rangos de (85-91 %) para E1, E2 y E3, también López De Alda & Barceló (2001), señalaron los % R para E1 y P4 en valores de (96 – 112 %).

Asimismo, se calculó el % CV, teniendo los valores de 6,29 % y 7,98 % para E1 y P4 respectivamente, con una concentración de recuperación de 0,5  $\mu\text{g/L}$ , y los cálculos obtenidos para 1  $\mu\text{g/L}$ , fueron de 8,27 % y 8,13%, respectivamente, tal como se muestra en la Tabla 11; por otro lado en la Tabla 12, bajo las mismas condiciones se encontraron % CV de (1,71 %, 1,87 %) y (1,31 %, 1,13 %), cumpliendo con lo establecido en el DOQ-CGCRE-008, donde se indica que la precisión expresada por CV debe ser  $< 20$  %; del mismo modo Ribeiro et al. (2010), para la E1, aplicaron concentraciones de 0,8, 2,4, 4  $\mu\text{g/L}$ , obteniendo % CV (5,5, 2,1, 1,4) de acorde a cada concentración, igualmente Barreca et al. (2019), determinaron simultáneamente E1, E2, EE2, cuya precisión fue  $< 15$  %, del mismo modo Koh et al. (2007), determinaron estrógenos esteroideos en aguas

residuales mediante UHPLC – MS/MS, obteniendo para las muestras de efluentes finales CV en rangos de (0,5 a 12%).

La Tabla 13, muestra las concentraciones de E1 presentes en las aguas del afluente de la PTAR de Ilo durante el monitoreo, donde se evidencia la presencia de esta hormona en concentraciones que van desde 1,3 hasta 11,5  $\mu\text{g L}^{-1}$  respectivamente; sin embargo, la literatura científica evidencia valores menores de E1 en este tipo de aguas, es así que Louros et al. (2021), reportan concentraciones de 0,242  $\mu\text{g L}^{-1}$ , así mismo Zhang & Fent. (2018), a través de un sistema HPLC-MS/MS determinaron concentraciones de 0,023–0,037  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; por otro lado, Pessoa et al. (2014), evaluaron la presencia de hormonas estrogénicas en cinco PTARs ubicadas en el Estado de Ceará, Brasil, encontrando concentraciones de la E1 en el afluente 3,05  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Servos et al. (2005) determinaron la distribución de E2 y E1, en PTAR de Canadá cuyas concentraciones medias en el afluente de E1 fueron de 0,49  $\mu\text{g L}^{-1}$  (0,19-0,78  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), finalmente, Tran et al. (2018), en un trabajo de revisión en diferentes PTARs del mundo, reportan que las concentraciones de EC en las PTAR en Asia, tienden a ser mayores que en América del Norte y Europa, reportándose concentraciones en el afluente de Asia 0,1325  $\mu\text{g L}^{-1}$ , en América del norte afluente 0,08-0,52  $\mu\text{g L}^{-1}$ , y Europa en el afluente 0,24-0-0,67  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

La presencia de residuos de E1, en las muestras del afluente analizadas Tabla 13 se debe, a que esta hormona es producida de forma natural por las mujeres (Chabi & Sleno, 2022), generándose a partir de la androstenediona suprarrenal (Denver et al., 2019), esta hormona, cumple diversas funciones en todo el cuerpo (Thomas & Potter, 2013). Por otro lado, según Hamid & Eskicioglu (2012), la excreción de E1 no solo es exclusiva de las mujeres, sino también es producida por los varones, en concentraciones de 1,6, mujeres menstruando 3,5, mujeres menopáusicas 2,3, y en concentraciones más elevadas en mujeres embarazadas teniendo valores estimados en 259  $\mu\text{g/día}$  respectivamente; sin embargo, Ankley et al. (2017), refieren que la E1 es más frecuente en mujeres posmenopáusicas; por otro lado, las concentraciones detectadas en nuestro estudio, también podrían deberse a que esta misma se produce de forma sintética para la producción de anticonceptivos orales desde hace más de 50 años (Pattenden et al., 2004), y en terapia de reemplazo hormonal (Escudeiro de Oliveira et al., 2020).

Por otro lado, Panter et al. (1998), refieren que los valores de estrógenos naturales y sintéticos en los efluentes de las PTARs son bajos. En la Tabla 13 se muestran los resultados de E1 en el efluente, cuyas concentraciones se encontraron en un rango de 1,8 y 8,2  $\mu\text{g L}^{-1}$ , siendo mayores a las reportadas en literatura científica, de manera que, Ying et al. (2002) refieren que se han detectado hasta 0,07  $\mu\text{g L}^{-1}$  de E1, en los efluentes en PTARs de diferentes países; así mismo, Louros et al. (2021), reportan concentraciones hasta 0,887  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; por otro lado, Clara et al. (2005), determinaron las concentraciones en 4 PTARs, encontrando concentraciones en un rango de 0,002  $\mu\text{g L}^{-1}$  a 0,072  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; de igual modo Zhang & Fent. (2018), determinaron concentraciones de 0,09  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; también Chimchirian et al. (2007), reportan concentraciones en un rango de 0,063  $\mu\text{g L}^{-1}$  a 0,491  $\mu\text{g L}^{-1}$  en tres PTARs en el sureste de Pensilvania; Servos et al. (2005), evaluaron la distribución de E1, en PTARs de municipalidades de Canadá, encontrando valores entre 0,001  $\mu\text{g L}^{-1}$  y 0,096  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Tran et al. (2018), refieren concentraciones en los efluentes de; Asia, en América del norte y Europa cuyos valores reportados fueron; 0,512  $\mu\text{g L}^{-1}$ , 0,056  $\mu\text{g L}^{-1}$ , 0,07095  $\mu\text{g L}^{-1}$  respectivamente. En el Perú, este tipo de monitoreos no son comunes; por lo que los reportes científicos son limitados; sin embargo Alejandro et al. (2021), analizaron muestras de aguas del lago Titicaca donde reportan presencia de E1 en la laguna de oxidación Puno, y en otros puntos en el interior de la bahía, encontrando concentraciones máximas de 0,156  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Las técnicas convencionales en las PTARs, pueden reducir significativamente los EDC en los efluentes, pudiendo eliminarse en un 37,8% las concentraciones de E1; sin embargo, existen cantidades considerables de compuestos estrogénicos que ingresan a vías fluviales cercanas por medio de la liberación de los efluentes (Borea et al., 2019; Z. H. Liu et al., 2015). Las concentraciones de E1, en el efluente disminuyen, tal como se muestra en la Tabla 13 y Figura 11, cabe mencionar que en la PTAR-Ilo el sistema de tratamiento es por medio de lagunas de estabilización que consta de una laguna primaria aireada, dos lagunas secundarias facultativas y dos lagunas terciarias facultativas; asimismo, estudios realizados por Islam et al. (2021), en la región de Hunter a lo largo de la costa sureste de Nueva Gales del Sur de Australia, en las distintas etapas de tratamiento de aguas residuales en dos PTARs, demuestran que el tratamiento secundario en PTAR reduce la carga estrogénica, siendo mayor la eliminación de los estrógenos naturales, en

el caso de la E1 las concentraciones en el afluente fueron de  $(4,611 \mu\text{g L}^{-1} \pm 0,281 \mu\text{g L}^{-1})$  y en el efluente final fue de  $(0,072 \mu\text{g L}^{-1} \pm 0,03 \mu\text{g L}^{-1})$ ; Huang et al. (2014), reportan concentraciones entre  $0,857 \mu\text{g L}^{-1}$  a  $1,821 \mu\text{g L}^{-1}$  en el afluente de seis PTARs alrededor del lago Dianchi en China, mientras que en el efluente se encontró concentraciones de  $0,101 \mu\text{g L}^{-1}$  a  $0,294 \mu\text{g L}^{-1}$ , esta eficiencia de remoción fue a través de un proceso de lodos activados y desnitrificación siendo para E1 del 43-70% eficiente; también Joss et al. (2004), determinaron la eficiencia de eliminación siendo este del 77% para E1, esto se llevó a cabo en PTARs municipales en condiciones aerobias y anaerobias. Por otro lado Leiviskä & Risteelä (2022), en el análisis de productos farmacéuticos, hormonas y las comunidades bacterianas en una PTAR municipal, realizaron la comparación en efluentes de biorreactores de membrana paralelo (MBR) y sistemas de lodos activados (CAS), en la cual se encontró que la E1 estaba en un nivel más bajo después del proceso MRB ( $< 0,001 \mu\text{g L}^{-1}$  -  $0,068 \mu\text{g L}^{-1}$ ) en comparación con el proceso CAS ( $0,011 \mu\text{g L}^{-1}$  -  $0,012 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Según Yoon et al. (2007), informaron que la ultrafiltración/nanofiltración consigue eliminar la E1 del 42 al 44%; mientras que Huber et al. (2005), mencionan que la ozonización elimina más del 90% ; pero, a pesar del desarrollo de tecnologías físicas y químicas como la reacción de Fenton, oxidación UV, ozonización, ultrafiltración/nanofiltración, ósmosis inversa entre otros, su alto costo limitará a las PTARs para instalar dichas tecnologías para el tratamiento de los estrógenos antes de la descarga en el efluente, es por tal razón que aún se vienen aplicando los procesos de tratamiento tradicionales, como lodos activados, sedimentación y desinfección (Wang et al., 2019).

Por lo general, los mecanismos de degradación de los estrógenos en la estación depuradora de aguas residuales (EDAR) implican: la volatilización, sorción y biodegradación (Ting & Praveena, 2017). Fenómenos que pudieron afectar a las concentraciones de E1 en el presente estudio, ya que se observa una reducción del 40% de la concentración entre los valores del afluente y el efluente Tabla 13 y Figura 11. Sin embargo, esta reducción de las concentración de E1 evidenciada en el estudio, también podría deberse a que los estrógenos naturales, así como los sintéticos tienen una presión de vapor baja, encontrándose en un rango de  $2,3 \times 10^{-10}$  y  $6,7 \times 10^{-15}$  mmHg, lo cual indica que la volatilidad es baja (Lai et al., 2000), siendo esta la tendencia a evaporarse, estando

directamente relacionada con la presión de vapor (Combalbert & Hernandez-Raquet, 2010); por tal razón, es posible que tengan constantes de Henry muy pequeñas, haciendo que los EC sean menos susceptibles a la volatilización tanto a presión como temperaturas normales, de esta manera la pérdida en la fase acuosa por medio de la volatilización posiblemente sea insignificante (Combalbert & Hernandez-Raquet, 2010; Khanal et al., 2006). También el valor logarítmico relativamente bajo de la partición octanol-agua ( $K_{ow}$ ), varía entre un valor de 2,8 y 4,2, mostrando así que los estrógenos esteroides son poco solubles en agua favoreciendo la sorción en lodos (Lai et al., 2000; Ying et al., 2002); además, Manfred Clara et al. (2004), destacaron que la sorción implicó la construcción del coeficiente de distribución ( $K_d$ ), y de las isothermas de sorción de Freundlich. La afinidad de sorción generalmente sigue el siguiente orden creciente  $E2 < E1 < E3$  (Ren et al., 2007), debido a estos argumentos, posiblemente los residuos de E1 en la PTAR Ilo se encontrarían adsorbidos en sus lodos, aunque son muy pocos los estudios que se hayan realizado en los lodos de depuradora, debido a las dificultades de los análisis de estos compuestos en matrices sólidas (Kuster et al., 2004); no obstante Nieto et al. (2008), realizaron un estudio donde encontraron altas concentraciones de E1 (50 a 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso seco).

Además, en el monitoreo del afluente de la PTAR Ilo se encontró un pH en un rango de 6,84 y 7,99, mientras que en el efluente tuvo valores entre 7,09 y 8 como se muestra en la Tabla 7; asimismo, Clara et al. (2005), estudiaron el tiempo de retención de sólidos para evaluar la capacidad de microcontaminantes, encontrando que del 30 al 50% de estrógenos esteroides que fueron adsorbidos inicialmente se desorbieron entre un pH de 9 y 10; pudiendo deberse a bajas energías de unión es los estrógenos esteroides ya que estos hacen que la sorción física predomine sobre la sorción química, implicando así que la adsorción de estrógenos esteroides en la biomasa sea reversible a cierto grado, inclusive a un ritmo más tardío que la adsorción inicial (Ting & Praveena, 2017). Por otro lado, estudios realizados por Cox et al. (2018), muestran los efectos de la temperatura en la degradación de E1 en aguas residuales, siendo las temperaturas más frías las que ralentizan la degradación de E1; además, mencionan que la variación estacional modifica la degradación de esta en las aguas residuales, razón por la cual se deben las altas concentraciones de E1 en la PTAR Ilo, ya que, el monitoreo se realizó en época de

invierno del mes de agosto, en el que se tuvo una temperatura promedio de 12,5 °C (Ministerio del Ambiente, 2022).

Del mismo modo, los estrógenos esteroides se degradan de manera biológica en las PTARs (Shi et al., 2004; Tan et al., 2013), siendo la biodegradación el principal mecanismo de eliminación en las EDAR (Andersen et al., 2003; Braga et al., 2005; Servos et al., 2005), en cuanto a la biodegradación de la E1 es más eficiente en condiciones aeróbicas (Manickum & John, 2014), la temperatura elevada también favorece la degradación debido al aumento de la actividad microbiana (Atkinson et al., 2012), algunos de los microorganismos degradadores de E1 identificados son: *Sphingomonas SPP* cuya clasificación es  $\alpha$ -*Proteobacteria Sphingomonadales*, estos microorganismos degradan en condiciones aeróbicas y anóxicas (Ke et al., 2007), las *Pseudomonas sp.*, siendo su clasificación  $\gamma$ -*Proteobacteria Pseudomonadales* encontrado en lodo activado (Pauwels et al., 2008), *Bacillus subtilis*, su clasificación es *Firmicutes*, y de origen en lodos activados (L. Jiang et al., 2010). Es por ello que también se explica la disminución de E1 en el efluente de la PTAR ILO, como se muestra en la Tabla 13 y Figura 11, además las tasas de biodegradación dependen de las condiciones en que se operan las EDAR (Esperanza et al., 2007).

Finalmente, la P4, no fue determinada como se muestra en la Tabla 13, pese a que los progestágenos han sido reportados en diferentes PTARs de China; sin embargo, muestran una eficiencia de eliminación acuosa (eficiencia de eliminación media > 90 %) (Yu et al., 2019), así mismo S. Liu et al. (2020), en un estudio realizado para determinar la biodegradación de progestágenos por bacterias transmitidas por aguas residuales (*Bacillus sp.* P19, siendo la mejor para la transformación de P4) en el campo y laboratorio en condiciones óxicas y anóxicas, encontraron que la P4 tiene vida media de 11,6 h; y la degradación y transformación se da en 1,5 días; del mismo modo, mostraron que la P4 natural se transforma mucho más rápido que los progestágenos sintéticos, siendo esta una razón que dificulta su cuantificación; además de usar equipos con más sensibilidad como UHPLC – MS/MS, uso de cartuchos Oasis HLB (500 mg, 6mL) (Goeury et al., 2019).

## CONCLUSIONES

1. El método analítico desarrollado es selectivo para los residuos de estrona y progesterona, no habiéndose evidenciado interferentes en los tiempos de retención para cada uno de los compuestos.
2. El coeficiente de correlación para estrona y progesterona fue de  $(R^2) \geq 0,99$ , el cual indica una linealidad adecuada.
3. Los límites de detección y cuantificación fueron de (0,0021802 y 0,0053763  $\mu\text{g/L}$ ) y (0,00719 y 0,01774  $\mu\text{g/L}$ ), respectivamente para estrona y progesterona.
4. El porcentaje de recuperación se encontró en un rango de 96,86 y 103,10%, con un coeficiente de variación  $< 8,27\%$  para estrona y progesterona respectivamente.
5. Las muestras analizadas de agua residual del afluyente y efluente de la PTAR- Ilo, presenta residuos de estrona en un rango de (1,3 a 11,5 $\mu\text{g/L}$ ) y (1,8 a 8,2  $\mu\text{g/L}$ ) respectivamente. Por otro lado, en estas muestras no fue posible detectar residuos de progesterona.

## **RECOMENDACIONES**

- 1.** Se recomienda que las instituciones relacionadas al cuidado del agua en el Perú, consideren la realización de monitoreos en las diferentes estaciones del año, empleando el método desarrollado y validado en la presente investigación, con la finalidad de conocer la eficacia real de la PTAR de Ilo, en tratamiento de este tipo de residuos.
- 2.** Solicitar el apoyo del Laboratorio de Contaminantes Orgánicos y Ambiente, de la Universidad Nacional de Moquegua, con el propósito de analizar muestras de agua procedentes de otras PTARs cercanas a las regiones de Moquegua y Tacna.
- 3.** Realizar mayores estudios a fin de conocer el impacto real de las concentraciones de Estrona encontradas en este estudio en la biota marina.
- 4.** En estudios futuros, incluir el análisis por espectrometría de masas al método desarrollado, a fin de alcanzar mayor sensibilidad analítica y selectividad.
- 5.** Realizar estudios de tratamiento complementarios (terciarios) en las PTARs, a fin de mejorar la eficiencia en este tipo de compuestos, para evitar su vertimiento en cuerpos de agua.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adeel, M., Song, X., Wang, Y., Francis, D., & Yang, Y. (2017a). Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: A critical review. *Environment International*, 99, 107–119. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.12.010>
- Adeel, M., Song, X., Wang, Y., Francis, D., & Yang, Y. (2017b). Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: A critical review. *Environment International*, 99, 107–119. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.12.010>
- Akash, M. S. H., Rehman, K., & Hashmi, M. Z. (2021). *Correction to: Endocrine Disrupting Chemicals-induced Metabolic Disorders and Treatment Strategies*. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-45923-9\\_29](https://doi.org/10.1007/978-3-030-45923-9_29)
- Alcántara, Y. (2018). Desarrollo de un método analítico por cromatografía líquida de alta eficacia para la cuantificación de etinilestradiol y desogestrel comprimidos. In 2018. Universidad Nacional de Trujillo.
- Alejandro, W., Siomara, S., Canaza, C., Magaly, O., Vilca, L., & Tornisielo, V. L. (2021). *Presence of steroid hormones in Lake Titicaca and drinking water , Puno ( Peru )* *Presencia de hormonas esteroides en el lago Titicaca y agua*. 23(4), 193–199. <https://doi.org/10.18271/ria.2021.307>
- Almeida, Â., Silva, M. G., Soares, A. M. V. M., & Freitas, R. (2020). Concentrations levels and effects of 17alpha-Ethinylestradiol in freshwater and marine waters and bivalves: A review. *Environmental Research*, 185(February), 109316. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109316>
- ANA. (2012). *Informe N°018-2012-ANA-ALA-MOQUEGUA*. 1–8. [http://www.ana.gob.pe/sites/default/files/normatividad/files/r265\\_cut\\_50328-2012\\_exp\\_562-2012\\_eps\\_ilo\\_s.a\\_0.pdf](http://www.ana.gob.pe/sites/default/files/normatividad/files/r265_cut_50328-2012_exp_562-2012_eps_ilo_s.a_0.pdf)
- Andersen, H., Siegrist, H., Halling-Sørensen, B., & Ternes, T. A. (2003). Fate of estrogens in a municipal sewage treatment plant. *Environmental Science and Technology*, 37(18), 4021–4026. <https://doi.org/10.1021/es026192a>
- Ankley, G. T., Feifarek, D., Blackwell, B., Cavallin, J. E., Jensen, K. M., Kahl, M. D., Poole, S., Randolph, E., Saari, T., & Villeneuve, D. L. (2017). Re-evaluating the

- Significance of Estrone as an Environmental Estrogen. *Environmental Science and Technology*, 51(8), 4705–4713. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b00606>
- Aris, A. Z., Shamsuddin, A. S., & Praveena, S. M. (2014). Occurrence of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: A review. *Environment International*, 69, 104–119. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.04.011>
- Astrahan, P., Korzen, L., Khanin, M., Sharoni, Y., & Israel, Á. (2021). Seaweeds fast EDC bioremediation: Supporting evidence of EE2 and BPA degradation by the red seaweed *Gracilaria* sp., and a proposed model for the remedy of marine-borne phenol pollutants. *Environmental Pollution*, 278. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116853>
- Atkinson, S. K., Marlatt, V. L., Kimpe, L. E., Lean, D. R. S., Trudeau, V. L., & Blais, J. M. (2012a). Science of the Total Environment The occurrence of steroidal estrogens in south-eastern Ontario wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment*, 430, 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.04.069>
- Atkinson, S. K., Marlatt, V. L., Kimpe, L. E., Lean, D. R. S., Trudeau, V. L., & Blais, J. M. (2012b). The occurrence of steroidal estrogens in south-eastern Ontario wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment*, 430, 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.04.069>
- Aupperlee, M. D., Kariagina, A., Zaremba, N., Basson, M. D., Schwartz, R. C., & Haslam, S. Z. (2018). The Proliferative Response to p27 Down-Regulation in Estrogen Plus Progestin Hormonal Therapy is Lost in Breast Tumors. *Translational Oncology*, 11(2), 518–527. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2018.02.011>
- Auriol, M. (2018). *Removal of estrogenic activity of natural and synthetic hormones from a municipal wastewater : Efficiency of horseradish peroxidase and laccase from* *Removal of estrogenic activity of natural and synthetic hormones from a municipal wastewater : Efficiency* . *February* 2008. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.06.064>
- Azizi, D., Arif, A., Blair, D., Dionne, J., Filion, Y., Ouarda, Y., Pazmino, A. G., Pulicharla,

- R., Rilstone, V., Tiwari, B., Vignale, L., Brar, S. K., Champagne, P., Drogui, P., Langlois, V. S., & Blais, J.-F. (2021). A comprehensive review on current technologies for removal of endocrine disrupting chemicals from wastewaters. *Environmental Research*, *xxx*, 112196. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112196>
- Barakat, R., Oakley, O., Kim, H., Jin, J., & Ko, C. M. J. (2016). Extra-gonadal sites of estrogen biosynthesis and function. *BMB Reports*, *49*(9), 488–496. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2016.49.9.141>
- Barbosa, M. O., Moreira, N. F. F., Ribeiro, A. R., Pereira, M. F. R., & Silva, A. M. T. (2016). Occurrence and removal of organic micropollutants: An overview of the watch list of EU Decision 2015/495. *Water Research*, *94*, 257–279. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.02.047>
- Barreca, S., Busetto, M., Colzani, L., Clerici, L., Daverio, D., Dellavedova, P., Balzamo, S., Calabretta, E., & Ubaldi, V. (2019). Determination of estrogenic endocrine disruptors in water at sub-ng L<sup>-1</sup> levels in compliance with Decision 2015/495/EU using offline-online solid phase extraction concentration coupled with high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Microchemical Journal*, *147*(December 2018), 1186–1191. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.04.030>
- Bayliss, W., Starling, E., & Os, E. (2008). *Hormônios Femininos: Estrógenos e Progesterona*. 1–4. <http://www.medicinacomplementar.com.br/convertido/do-0742.htm>
- Bell, K. Y., Wells, M. J. M., Traexler, K. A., Pellegrin, M.-L., Morse, A., & Bandy, J. (2011). Emerging Pollutants. In *Water Environment Research* (Vol. 83, Issue 10). <https://doi.org/10.2175/106143011x13075599870298>
- Bilal, M., Barceló, D., & Iqbal, H. M. N. (2021). Occurrence, environmental fate, ecological issues, and redefining of endocrine disruptive estrogens in water resources. *Science of the Total Environment*, *800*, 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149635>

- Borea, L., Ensano, B. M. B., Hasan, S. W., Balakrishnan, M., Belgiorno, V., de Luna, M. D. G., Ballesteros, F. C., & Naddeo, V. (2019). Are pharmaceuticals removal and membrane fouling in electromembrane bioreactor affected by current density? *Science of the Total Environment*, 692, 732–740. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.149>
- Braga, O., Smythe, G. A., Schäfer, A. I., & Feitz, A. J. (2005). Erratum: Fate of steroid estrogens in Australian inland and coastal wastewater treatment plants (Environmental Science and Technology (2005) 39 (3351-3358)). *Environmental Science and Technology*, 39(18), 7344. <https://doi.org/10.1021/es0514242>
- Ceccarelli, I., Bioletti, L., Peparini, S., Solomita, E., Ricci, C., Casini, I., Miceli, E., & Aloisi, A. M. (2022). Estrogens and phytoestrogens in body functions. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 132(December 2021), 648–663. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.12.007>
- Chabi, K., & Sleno, L. (2022). Estradiol, Estrone and Ethinyl Estradiol Metabolism Studied by High Resolution LC-MS/MS Using Stable Isotope Labeling and Trapping of Reactive Metabolites. *Metabolites*, 12(10). <https://doi.org/10.3390/metabo12100931>
- Chimchirian, R. F., Suri, R. P. S., & Fu, H. (2007). Free Synthetic and Natural Estrogen Hormones in Influent and Effluent of Three Municipal Wastewater Treatment Plants. *Water Environment Research*, 79(9), 969–974. <https://doi.org/10.2175/106143007x175843>
- Chowdhury, R. R., Charpentier, P. A., & Ray, M. B. (2011). Journal of Photochemistry and Photobiology A : Chemistry Photodegradation of 17  $\beta$ -estradiol in aquatic solution under solar irradiation: Kinetics and influencing water parameters. “*Journal of Photochemistry & Photobiology, A: Chemistry*,” 219(1), 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2011.01.019>
- Clara, M., Kreuzinger, N., Strenn, B., Gans, O., & Kroiss, H. (2005). The solids retention time - A suitable design parameter to evaluate the capacity of wastewater treatment plants to remove micropollutants. *Water Research*, 39(1), 97–106.

<https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.08.036>

- Clara, Manfred, Strenn, B., Saracevic, E., & Kreuzinger, N. (2004). Adsorption of bisphenol-A, 17 $\beta$ -estradiol and 17 $\alpha$ - ethinylestradiol to sewage sludge. *Chemosphere*, 56(9), 843–851. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.04.048>
- Combalbert, S., & Hernandez-Raquet, G. (2010). Occurrence, fate, and biodegradation of estrogens in sewage and manure. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(6), 1671–1692. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2547-x>
- Cooke, P. S., Nanjappa, M. K., Ko, C., Prins, G. S., & Hess, R. A. (2017). Estrogens in male physiology. *Physiological Reviews*, 97(3), 995–1043. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2016>
- Cox, M. K., Peterson, K. N., Tan, D., Novak, P. J., Schoenfuss, H. L., & Ward, J. L. (2018). Temperature modulates estrone degradation and biological effects of exposure in fathead minnows. *Science of the Total Environment*, 621, 1591–1600. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.069>
- Dallegrave, A. (2012). *Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul Instituto De Matemática*.
- de França, J. F., Pickler, T. B., Jozala, A. F., dos Santos, C. A., Batista, B. L., Pedron, T., Vieira, R. A. L., & Grotto, D. (2020). Determination of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol and toxic metals in surface waters, and estimation of daily intake. *Environmental Monitoring and Assessment*, 192(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s10661-019-7990-2>
- de Oliveira, M., Frihling, B. E. F., Velasques, J., Filho, F. J. C. M., Cavalheri, P. S., & Migliolo, L. (2020). Pharmaceuticals residues and xenobiotics contaminants: Occurrence, analytical techniques and sustainable alternatives for wastewater treatment. *Science of the Total Environment*, 705, 135568. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135568>
- Denver, N., Khan, S., Homer, N. Z. M., MacLean, M. R., & Andrew, R. (2019). Current strategies for quantification of estrogens in clinical research. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 192(May), 105373.

<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.04.022>

- Duffy, D. M., & Stouffer, R. L. (2003). Luteinizing Hormone Acts Directly at Granulosa Cells to Stimulate Periovarian Processes: Modulation of Luteinizing Hormone Effects by Prostaglandins. *Endocrine*, 22(3), 249–256. <https://doi.org/10.1385/ENDO:22:3:249>
- Elias, K. D., Ejidike, I. P., Mtunzi, F. M., & Pakade, V. E. (2021). Endocrine Disruptors- (estrone and  $\beta$ -estradiol) removal from water by Nutshell activated carbon: Kinetic, Isotherms and Thermodynamic studies. *Chemical Thermodynamics and Thermal Analysis*, 3–4(June), 100013. <https://doi.org/10.1016/j.ctta.2021.100013>
- Equipment, C. & L. (2022). *Material Safety Data Sheet Estrone MSDS* (Vol. 2, pp. 1–6).
- Escudeiro de Oliveira, M., Barroso, B. L., de Almeida, J., Moraes, M. L. L., & de Arruda Rodrigues, C. (2020). Photoelectrocatalytic degradation of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol and estrone under UV and visible light using nanotubular oxide arrays grown on Ti-0.5wt%W. *Environmental Research*, 191(August), 110044. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110044>
- Esperanza, M., Suidan, M. T., Marfil-Vega, R., Gonzalez, C., Sorial, G. A., McCauley, P., & Brenner, R. (2007). Fate of sex hormones in two pilot-scale municipal wastewater treatment plants: Conventional treatment. *Chemosphere*, 66(8), 1535–1544. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.08.020>
- Finlayson, C., Finlayson, S., Giles Guzman, F., S Anchez Marco, A., Finlayson, G., Jennings, R., Giles Pacheco, F., & Rodriguez Vidal, J. (2016). *Using birds as indicators of Neanderthal environmental quality: Gibraltar and Zafarraya compared*. <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2015.11.031>
- Forio, M. A. E., & Goethals, P. L. M. (2020). An integrated approach of multi-community monitoring and assessment of aquatic ecosystems to support sustainable development. *Sustainability (Switzerland)*, 12(14). <https://doi.org/10.3390/su12145603>
- Gao, J., Zhang, Y., Zhang, T., Yang, Y., Yuan, C., Jia, J., & Wang, Z. (2017). Responses of gonadal transcriptome and physiological analysis following exposure to 17 $\alpha$ -

- ethynylestradiol in adult rare minnow *Gobiocypris rarus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 141(September 2016), 209–215. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.03.028>
- García, M. Á. S. (2017). *Contaminantes Emergentes Y Cadena Alimentaria. Productos Farmacéuticos, De Cuidado Personal Y Drogas De Abuso*. 48.
- Goeury, K., Vo Duy, S., Munoz, G., Prévost, M., & Sauvé, S. (2019). Analysis of Environmental Protection Agency priority endocrine disruptor hormones and bisphenol A in tap, surface and wastewater by online concentration liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1591, 87–98. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.01.016>
- Gonzales, C. (2020). *Desarrollo y Validación de un Método Analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución para la Determinación de Etinilestradiol y Levonorgestrel en Agua* [Instituto Politécnico Nacional]. <https://tesis.ipn.mx/handle/123456789/28850>
- Gorito, A. M., Ribeiro, A. R., Almeida, C. M. R., & Silva, A. M. T. (2017). A review on the application of constructed wetlands for the removal of priority substances and contaminants of emerging concern listed in recently launched EU legislation. *Environmental Pollution*, 227, 428–443. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.04.060>
- Gruber, C. J., Gruber, D. M., Gruber, I. M. L., Wieser, F., & Huber, J. C. (2004). Anatomy of the estrogen response element. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 15(2), 73–78. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2004.01.008>
- Guedes-Alonso, R., Montesdeoca-Esponda, S., Sosa-Ferrera, Z., & Santana-Rodríguez, J. J. (2014). Liquid chromatography methodologies for the determination of steroid hormones in aquatic environmental systems. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 3, 14–27. <https://doi.org/10.1016/j.teac.2014.10.001>
- Hamid, H., & Eskicioglu, C. (2012). Fate of estrogenic hormones in wastewater and sludge treatment: A review of properties and analytical detection techniques in sludge matrix. *Water Research*, 46(18), 5813–5833.

- <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.08.002>
- Harron, D. W. G. (2013). *23 Technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use: The ICH process*. 447–460.
- Havens, S. M., Hedman, C. J., Hemming, J. D. C., Mieritz, M. G., Shafer, M. M., & Schauer, J. J. (2020). Occurrence of estrogens, androgens and progestogens and estrogenic activity in surface water runoff from beef and dairy manure amended crop fields. *Science of the Total Environment*, *710*, 136247. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136247>
- Hecht, S., & Schwarz, T. (2013). Pituitary Gland. In *Veterinary Computed Tomography* (Vol. 12). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1002/9781118785676.ch20>
- Hemsell, D. L., Grodin, J. M., Brenner, P. F., Siiteri, P. K., & Macdonald, P. C. (1974). Plasma precursors of estrogen. II. Correlation of the extent of conversion of plasma androstenedione to estrone with age. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *38*(3), 476–479. <https://doi.org/10.1210/jcem-38-3-476>
- Hu, J., Zhang, Z., Shen, W. J., & Azhar, S. (2010). Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones. *Nutrition and Metabolism*, *7*(Table 1), 7–9. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-7-47>
- Huang, B., Li, X., Sun, W., Ren, D., Li, X., Li, X., Liu, Y., Li, Q., & Pan, X. (2014). Occurrence, removal, and fate of progestogens, androgens, estrogens, and phenols in six sewage treatment plants around Dianchi Lake in China. *Environmental Science and Pollution Research*, *21*(22), 12898–12908. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3236-6>
- Huber, M. M., Göbel, A., Joss, A., Hermann, N., Löffler, D., McArdell, C. S., Ried, A., Siegrist, H., Ternes, T. A., & Von Gunten, U. (2005). Oxidation of pharmaceuticals during ozonation of municipal wastewater effluents: A pilot study. *Environmental Science and Technology*, *39*(11), 4290–4299. <https://doi.org/10.1021/es048396s>
- INMETRO. (2020). *Orientaciones sobre validación de métodos analíticos DOQ-CGCRE-008* (pp. 2–30).

- Islam, R., Kit Yu, R. M., O'Connor, W. A., Anh Tran, T. K., Andrew-Priestley, M., Leusch, F. D. L., & MacFarlane, G. R. (2020). Parental exposure to the synthetic estrogen 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2) affects offspring development in the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*. *Environmental Pollution*, 266. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114994>
- Islam, R., Yu, R. M. K., Andrew-Priestley, M., Smith, N., Rahman, M. M., Tran, T. K. A., Connor, W. A. O., & MacFarlane, G. R. (2021). Secondary treatment phase of tertiary wastewater treatment works significantly reduces estrogenic load. *Water Research*, 200, 117257. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117257>
- Jackson, L., & Klerks, P. (2020). Effects of the synthetic estrogen 17 $\alpha$ -ethinylestradiol on *Heterandria formosa* populations: Does matrotrophy circumvent population collapse? *Aquatic Toxicology*, 229, 105659. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105659>
- Jiang, L., Yang, J., & Chen, J. (2010). Isolation and characteristics of 17 $\beta$ -estradiol-degrading *Bacillus* spp. strains from activated sludge. *Biodegradation*, 21(5), 729–736. <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9338-z>
- Jiang, R., Liu, J., Huang, B., Wang, X., Luan, T., & Yuan, K. (2020). Assessment of the potential ecological risk of residual endocrine-disrupting chemicals from wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment*, 714, 136689. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136689>
- Joss, A., Andersen, H., Ternes, T., Richle, P. R., & Siegrist, H. (2004). Removal of estrogens in municipal wastewater treatment under aerobic and anaerobic conditions: Consequences for plant optimization. *Environmental Science and Technology*, 38(11), 3047–3055. <https://doi.org/10.1021/es0351488>
- Ke, J., Zhuang, W., Gin, K. Y. H., Reinhard, M., Hoon, L. T., & Tay, J. H. (2007). Characterization of estrogen-degrading bacteria isolated from an artificial sandy aquifer with ultrafiltered secondary effluent as the medium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(5), 1163–1171. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0923-y>
- Khanal, S. K., Xie, B., Thompson, M. L., Sung, S., Ong, S. K., & Van Leeuwen, J. (2006).

- Fate, transport and biodegradation of natural estrogens in the environment and engineered systems. *Environmental Science and Technology*, 40(21), 6537–6546. <https://doi.org/10.1021/es0607739>
- Koh, Y. K. K., Chiu, T. Y., Boobis, A., Cartmell, E., Lester, J. N., & Scrimshaw, M. D. (2007). Determination of steroid estrogens in wastewater by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1173(1–2), 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.09.074>
- Kuster, M., José López De Alda, M., & Barceló, D. (2004). Analysis and distribution of estrogens and progestogens in sewage sludge, soils and sediments. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 23(10–11), 790–798. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.08.007>
- Kuster, M., López de Alda, M. J., & Barceló, D. (2006). Estrogens and Progestogens in Wastewater, Sludge, Sediments, and Soil. *Water Pollution*, 5, 1–24. <https://doi.org/10.1007/b98605>
- Lai, K. M., Johnson, K. L., Scrimshaw, M. D., & Lester, J. N. (2000). Binding of waterborne steroid estrogens to solid phases in river and estuarine systems. *Environmental Science and Technology*, 34(18), 3890–3894. <https://doi.org/10.1021/es9912729>
- Leiviskä, T., & Risteelä, S. (2022). Analysis of pharmaceuticals, hormones and bacterial communities in a municipal wastewater treatment plant – Comparison of parallel full-scale membrane bioreactor and activated sludge systems. *Environmental Pollution*, 292(October 2021). <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118433>
- Li, Y., Yang, L., Zhen, H., Chen, X., Sheng, M., Li, K., Xue, W., Zhao, H., Meng, S., & Cao, G. (2021). Determination of estrogens and estrogen mimics by solid-phase extraction with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1168(January), 122559. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122559>
- Litwack, G. (2022). Estrogens and progestins. *Hormones*, 313–335. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-90262-5.00001-9>

- Liu, S., Chen, J., Zhang, J., Liu, Y., Hu, L., Chen, X., Liu, S., Xu, X., & Ying, G. (2020). Science of the Total Environment Microbial transformation of progesterone and dydrogesterone by bacteria from swine wastewater: Degradation kinetics and products identification. *Science of the Total Environment*, 701, 134930. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134930>
- Liu, Z. H., Lu, G. N., Yin, H., Dang, Z., & Rittmann, B. (2015). Removal of natural estrogens and their conjugates in municipal wastewater treatment plants: A critical review. *Environmental Science and Technology*, 49(9), 5288–5300. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b00399>
- López De Alda, M. J., & Barceló, D. (2001). Use of solid-phase extraction in various of its modalities for sample preparation in the determination of estrogens and progestogens in sediment and water. *Journal of Chromatography A*, 938(1–2), 145–153. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01223-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01223-7)
- Louros, V. L., Lima, D. L. D., Leitão, J. H., Esteves, V. I., & Nadais, H. G. A. (2021). Impact of UASB reactors operation mode on the removal of estrone and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol from wastewaters. *Science of the Total Environment*, 764, 144291. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144291>
- Manickum, T., & John, W. (2014). Occurrence, fate and environmental risk assessment of endocrine disrupting compounds at the wastewater treatment works in Pietermaritzburg (South Africa). *Science of the Total Environment*, 468–469, 584–597. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.08.041>
- Mansur, A. D. P., Silva, T. C. B. F., Takada, J. Y., Avakian, S. D., Strunz, C. M. C., César, L. A. M. H., Aldrighi, J. M., & Ramires, J. A. F. (2012). Long-term prospective study of the influence of estrone levels on events in postmenopausal women with or at high risk for coronary artery disease. *The Scientific World Journal*, 2012. <https://doi.org/10.1100/2012/363595>
- Mazellier, P., Méité, L., & Laats, J. De. (2008). Chemosphere and 17  $\alpha$ -ethinylestradiol ( EE2 ) in dilute aqueous solution. *Chemosphere*, 73(8), 1216–1223. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.07.046>

- Michiels, E. D. G., Vergauwen, L., Lai, F. Y., Town, R. M., Covaci, A., van Nuijs, A. L. N., Van Cruchten, S. J., & Knapen, D. (2019). Advancing the Zebrafish embryo test for endocrine disruptor screening using micro-injection: Ethinyl estradiol as a case study. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 38(3), 533–547. <https://doi.org/10.1002/etc.4343>
- Micro-pollutants, E., Series, A. C. S. S., & Society, A. C. (2015). *Emerging Micro-Pollutants in the Environment : Occurrence , Fate ,*
- Ministerio del Ambiente, S. (2022). *Herramientas / Información del tiempo y clima Promedio de temperatura normal para ILO.*
- Miranda, O. M. de. (2015). *Monitoramento de desreguladores endócrinos no rio Arroio Fundo na bacia de Jacarepaguá, RJ.*
- Moorthy, K. H., Prabhu, G. G. L., & Venugopal, P. (2019). The resurgence of estrogens in the treatment of castration-resistant prostate cancer. *Indian Journal of Urology*, 35(3), 189–196. <https://doi.org/10.4103/iju.IJU-56-19>
- Nasri, A., Mezni, A., Lafon, P. A., Wahbi, A., Cubedo, N., Clair, P., Harrath, A. H., Beyrem, H., Rossel, M., & Perrier, V. (2021a). Ethinylestradiol (EE2) residues from birth control pills impair nervous system development and swimming behavior of zebrafish larvae. *Science of the Total Environment*, 770, 145272. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145272>
- Nasri, A., Mezni, A., Lafon, P. A., Wahbi, A., Cubedo, N., Clair, P., Harrath, A. H., Beyrem, H., Rossel, M., & Perrier, V. (2021b). Ethinylestradiol (EE2) residues from birth control pills impair nervous system development and swimming behavior of zebrafish larvae. *Science of the Total Environment*, 770, 145272. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145272>
- Nieto, A., Borrull, F., Pocurull, E., & Marcé, R. M. (2008). Determination of natural and synthetic estrogens and their conjugates in sewage sludge by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1213(2), 224–230. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.10.043>

- Nollet, L. M. L. (2012). Analysis of Endocrine Disrupting Compounds in Food. *Analysis of Endocrine Disrupting Compounds in Food*. <https://doi.org/10.1002/9781118346747>
- Norman, A. W., & Litwack, G. (1997). Hormones of Pregnancy and Lactation. *Hormones*, 387–411. <https://doi.org/10.1016/b978-012521441-4/50015-8>
- Ojogoro, J. O., Scrimshaw, M. D., & Sumpter, J. P. (2021). Steroid hormones in the aquatic environment. *Science of the Total Environment*, 792, 148306. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148306>
- Olatunji, O. S., Fatoki, O. S., Opeolu, B. O., Ximba, B. J., & Chitongo, R. (2017). Determination of selected steroid hormones in some surface water around animal farms in Cape Town using HPLC-DAD. *Environmental Monitoring and Assessment*, 189(7). <https://doi.org/10.1007/s10661-017-6070-8>
- Overes, H. W. T. M., Leeuw, R. de, & Kloosterboer, H. J. (1992). Regulation of aromatase activity in FSH-primed rat granulosa cells in vitro by follicle-stimulating hormone and various amounts of human chorionic gonadotrophin. *Human Reproduction*, 7(2), 191–196. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a137615>
- Panter, G. H., Thompson, R. S., & Sumpter, J. P. (1998). Adverse reproductive effects in male fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to environmentally relevant concentrations of the natural oestrogens, oestradiol and oestrone. *Aquatic Toxicology*, 42(4), 243–253. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(98\)00038-1](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(98)00038-1)
- Pattenden, G., Reddy, L. K., & Walter, A. (2004). A new total synthesis of (±)-oestrone. *Tetrahedron Letters*, 45(21), 4027–4030. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2004.03.166>
- Pauwels, B., Wille, K., Noppe, H., De Brabander, H., Van De Wiele, T., Verstraete, W., & Boon, N. (2008). 17A-Ethinylestradiol Cometabolism By Bacteria Degrading Estrone, 17B-Estradiol and Estriol. *Biodegradation*, 19(5), 683–693. <https://doi.org/10.1007/s10532-007-9173-z>
- Peña-Guzmán, C., Ulloa-Sánchez, S., Mora, K., Helena-Bustos, R., Lopez-Barrera, E.,

- Alvarez, J., & Rodriguez-Pinzón, M. (2019). Emerging pollutants in the urban water cycle in Latin America: A review of the current literature. *Journal of Environmental Management*, 237(February), 408–423. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.02.100>
- Peñalver, A., Pocurull, E., Borrull, F., & Marcé, R. M. (2002). Method based on solid-phase microextraction-high-performance liquid chromatography with UV and electrochemical detection to determine estrogenic compounds in water samples. *Journal of Chromatography A*, 964(1–2), 153–160. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00694-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00694-5)
- Pérez, R. L., & Escandar, G. M. (2016). Multivariate calibration-assisted high-performance liquid chromatography with dual UV and fluorimetric detection for the analysis of natural and synthetic sex hormones in environmental waters and sediments. *Environmental Pollution*, 209, 114–122. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.11.024>
- Pessoa, G. P., de Souza, N. C., Vidal, C. B., Alves, J. A. C., Firmino, P. I. M., Nascimento, R. F., & dos Santos, A. B. (2014). Occurrence and removal of estrogens in Brazilian wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment*, 490, 288–295. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.05.008>
- Picheansoonthon, C., Engle, J. D., & Doskotch, R. W. (1990). Conformational studies of 11(S)-dihydrospesiciformin. In *Planta Medica* (Vol. 56, Issue 6). <https://doi.org/10.1055/s-2006-961117>
- Qin, G., Zhang, Y., Zhang, B., Zhang, Y., Liu, Y., & Lin, Q. (2020). Environmental estrogens and progestins disturb testis and brood pouch development with modifying transcriptomes in male-pregnancy lined seahorse *Hippocampus erectus*. *Science of the Total Environment*, 715, 136840. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136840>
- Ramírez-Montero, M. del C., Gómez-Oliván, L. M., Gutiérrez-Noya, V. M., Orozco-Hernández, J. M., Islas-Flores, H., Elizalde-Velázquez, G. A., SanJuan-Reyes, N., & Galar-Martínez, M. (2022). Acute exposure to 17- $\alpha$ -ethinylestradiol disrupt the

- embryonic development and oxidative status of *Danio rerio*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 251(September 2021), 109199. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2021.109199>
- Rasheed, T., Bilal, M., Nabeel, F., Adeel, M., & Iqbal, H. M. N. (2019). Environmentally-related contaminants of high concern: Potential sources and analytical modalities for detection, quantification, and treatment. *Environment International*, 122(November 2018), 52–66. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.11.038>
- Ren, Y. X., Nakano, K., Nomura, M., Chiba, N., & Nishimura, O. (2007). Effects of bacterial activity on estrogen removal in nitrifying activated sludge. *Water Research*, 41(14), 3089–3096. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.04.028>
- Ribeiro, A. R., Carvalho, M. F., Afonso, C. M. M., Tiritan, M. E., & Castro, P. M. L. (2010). Microbial degradation of 17 $\beta$ -estradiol and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol followed by a validated HPLC-DAD method. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 45(4), 265–273. <https://doi.org/10.1080/03601231003704523>
- Rosalba, A. C. (2004). *Estudio de farmacocinética comparativa de progesterona micronizada versus progesterona oleosa en mujeres posmenopáusicas*.
- Rout, P. R., Zhang, T. C., Bhunia, P., & Surampalli, R. Y. (2021). Treatment technologies for emerging contaminants in wastewater treatment plants: A review. *Science of the Total Environment*, 753, 141990. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141990>
- Ruiz, G. (2019). *DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UNA TÉCNICA ANALÍTICA VERDE PARA LA DETERMINACIÓN DE DIAZEPAM EN TABLETAS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTO PERFORMANCE TESIS* [Pontificia Universidad Católica de Perú]. <https://tesis.pucp.edu.pe/repositorio/handle/20.500.12404/14851>
- Sacdal, R., Madriaga, J., & Espino, M. P. (2020). Overview of the analysis, occurrence and ecological effects of hormones in lake waters in Asia. *Environmental Research*, 182(November 2019), 109091. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.109091>
- Sant'Ana, G. T. (2008). *São Carlos, SP. Março, 2008*.

- Serban Moldoveanu, V. D. (2022). *ESSENTIALS IN MODERN HPLC SEPARATIONS*.
- Servos, M. R., Bennie, D. T., Burnison, B. K., Jurkovic, A., McInnis, R., Neheli, T., Schnell, A., Seto, P., Smyth, S. A., & Ternes, T. A. (2005). Distribution of estrogens, 17 $\beta$ -estradiol and estrone, in Canadian municipal wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment*, 336(1–3), 155–170. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.05.025>
- Shi, J., Fujisawa, S., Nakai, S., & Hosomi, M. (2004). Biodegradation of natural and synthetic estrogens by nitrifying activated sludge and ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Water Research*, 38(9), 2323–2330. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.02.022>
- Singh, A. K., Gupta, S., Kumar, K., Gupta, S., Chander, Y., Gupta, A., & Saxena, R. (2013). Quantitative analysis of conjugated and free estrogens in swine manure: Solutions to overcome analytical problems due to matrix effects. *Journal of Chromatography A*, 1305, 203–212. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.06.026>
- Syed, Z., Sogani, M., Dongre, A., Kumar, A., Sonu, K., Sharma, G., & Gupta, A. B. (2021). Bioelectrochemical systems for environmental remediation of estrogens: A review and way forward. *Science of the Total Environment*, 780, 146544. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146544>
- Tan, D. T., Arnold, W. A., & Novak, P. J. (2013). Impact of organic carbon on the biodegradation of estrone in mixed culture systems. *Environmental Science and Technology*, 47(21), 12359–12365. <https://doi.org/10.1021/es4027908>
- Thomas, M. P., & Potter, B. V. L. (2013). The structural biology of oestrogen metabolism. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 137, 27–49. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2012.12.014>
- Ting, Y. F., & Praveena, S. M. (2017). Sources, mechanisms, and fate of steroid estrogens in wastewater treatment plants: a mini review. *Environmental Monitoring and Assessment*, 189(4). <https://doi.org/10.1007/s10661-017-5890-x>
- Torres, N. H., Santos, G. de O. S., Romanholo Ferreira, L. F., Américo-Pinheiro, J. H. P., Eguiluz, K. I. B., & Salazar-Banda, G. R. (2021). Environmental aspects of

- hormones estriol, 17 $\beta$ -estradiol and 17 $\alpha$ -ethynylestradiol: Electrochemical processes as next-generation technologies for their removal in water matrices. *Chemosphere*, 267. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128888>
- Tran, N. H., Reinhard, M., & Gin, K. Y. H. (2018). Occurrence and fate of emerging contaminants in municipal wastewater treatment plants from different geographical regions-a review. *Water Research*, 133, 182–207. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.12.029>
- Trevor, B. K. A. (2017). *Farmacología básica y clínica* (pp. 696–721).
- Vaz, S. (2018). Analytical chemistry applied to emerging pollutants. In *Analytical Chemistry Applied to Emerging Pollutants*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-74403-2>
- Vilela, C. L. S., Bassin, J. P., & Peixoto, R. S. (2018). Water contamination by endocrine disruptors: Impacts, microbiological aspects and trends for environmental protection. *Environmental Pollution*, 235, 546–559. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.098>
- Wang, Y., Sun, Q., Li, Y., Wang, H., Wu, K., & Yu, C. P. (2019). Biotransformation of estrone, 17 $\beta$ -estradiol and 17 $\alpha$ -ethynylestradiol by four species of microalgae. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 180(February), 723–732. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.05.061>
- Whitman, W. B. (2017). Bacteria and the Fate of Estrogen in the Environment. *Cell Chemical Biology*, 24(6), 652–653. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.05.028>
- Windsor, F. M., Ormerod, S. J., & Tyler, C. R. (2018). Endocrine disruption in aquatic systems: up-scaling research to address ecological consequences. *Biological Reviews*, 93(1), 626–641. <https://doi.org/10.1111/brv.12360>
- Ying, G. G., Kookana, R. S., & Ru, Y. J. (2002). Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environment International*, 28(6), 545–551. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(02\)00075-2](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(02)00075-2)
- Yoon, Y., Westerhoff, P., Snyder, S. A., Wert, E. C., & Yoon, J. (2007). Removal of

- endocrine disrupting compounds and pharmaceuticals by nanofiltration and ultrafiltration membranes. *Desalination*, 202(1–3), 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2005.12.033>
- Yu, Q., Geng, J., Zong, X., Zhang, Y., Xu, K., Hu, H., Deng, Y., Zhao, F., & Ren, H. (2019). Occurrence and removal of progestagens in municipal wastewater treatment plants from different regions in China. *Science of the Total Environment*, 668(163), 1191–1199. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.327>
- Zhang, K., & Fent, K. (2018). Determination of two progestin metabolites (17 $\alpha$ -hydroxypregnanolone and pregnanediol) and different classes of steroids (androgens, estrogens, corticosteroids, progestins) in rivers and wastewaters by high-performance liquid chromatography-tandem mass spe. *Science of the Total Environment*, 610–611, 1164–1172. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.114>

## ANEXOS

### Anexo A

*Equipos y materiales usados en el desarrollo del presente trabajo*

### Equipos

#### Figura 12

*Cromatógrafo UHPLC*



*Nota.* UHPLC, Agilent Technologies, equipado con detector DAD 1290 Infinity II, USA

#### Figura 13

*Bomba de vacío*



*Nota.* Se usó en la SPE y para la preparación de fase

## Figura 14

### *Centrífuga refrigerada*



*Nota.* Se utilizo para sedimentar las muestras de los tubos de ensayo, para su posterior secado con nitrógeno

## Figura 15

### *Balanza analítica*



*Nota.* Se usó para el pesaje de los analitos de interés

**Figura 16**

*Purificador de agua*



*Nota.* Agua ultra pura, que se utilizó para preparar fase y lavado de los materiales

**Figura 17**

*Equipo multiparámetro*

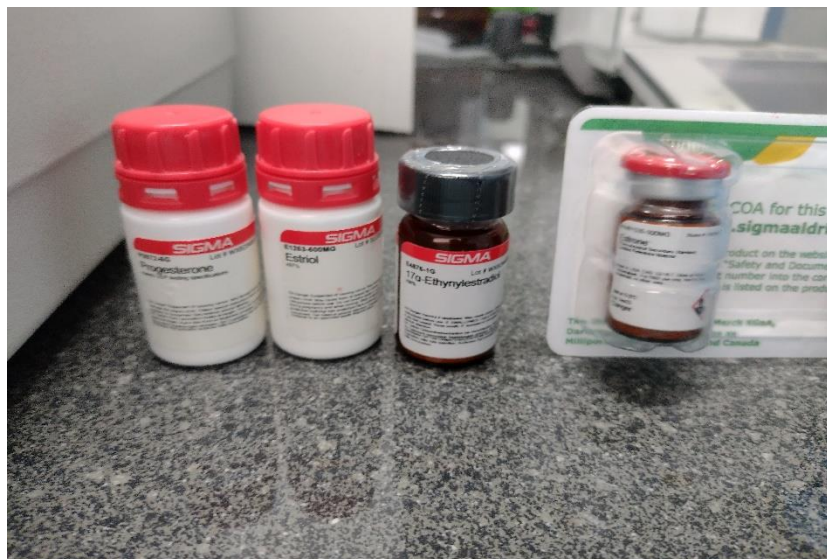


*Nota.* Equipo multiparámetro, empleado para la medición de los parámetros fisicoquímicos

## Materiales y reactivos

### Figura 18

*Analitos estudiados*



*Nota.* Se usaron 5 mg tanto de Estrona como de Progesterona, para la preparación de la solución madre

### Figura 19

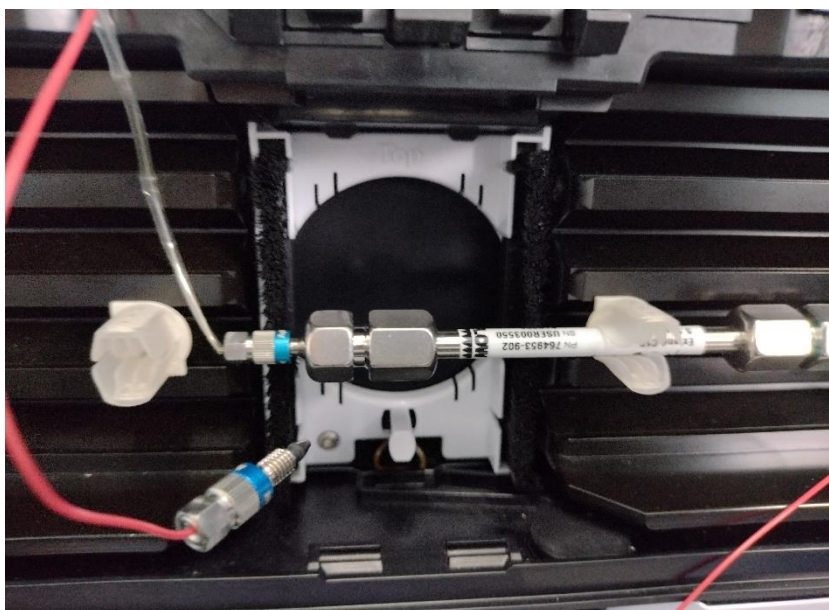
*Propanol, Acetonitrilo y Metanol*



*Nota.* El propanol sirvió para el lavado de las agujas del equipo UHPLC, el acetonitrilo se empleó para el secado del material y el MeOH, para la dilución y elución de muestras

## Figura 20

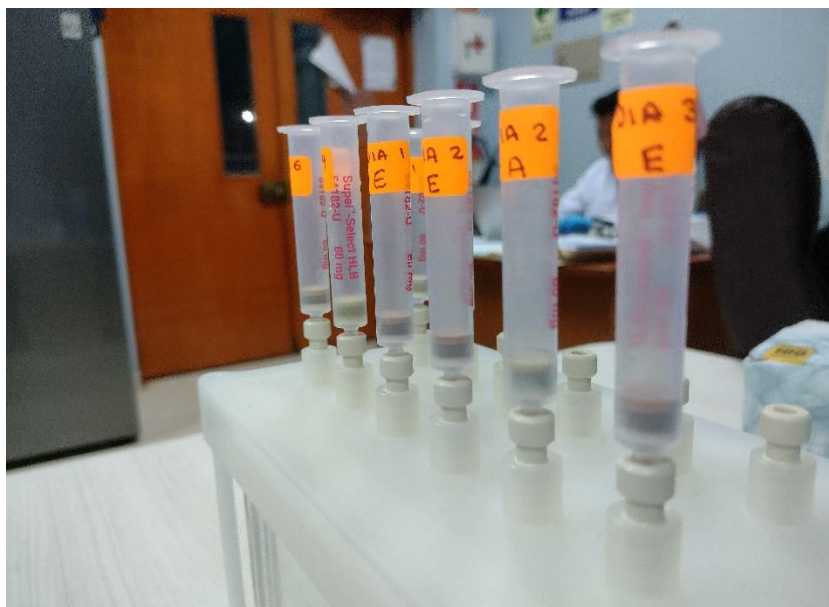
*Columna cromatográfica*



*Nota.* Para la separación de los analitos se utilizó una columna C18, (2,1 X 150 mm, 1,9  $\mu$ m)

## Figura 21

*Cartucho empleado para SPE*



*Nota.* Se emplearon cartucho HLB Oasis, para el desarrollo y validación de la extracción en fase sólida

**Figura 22**

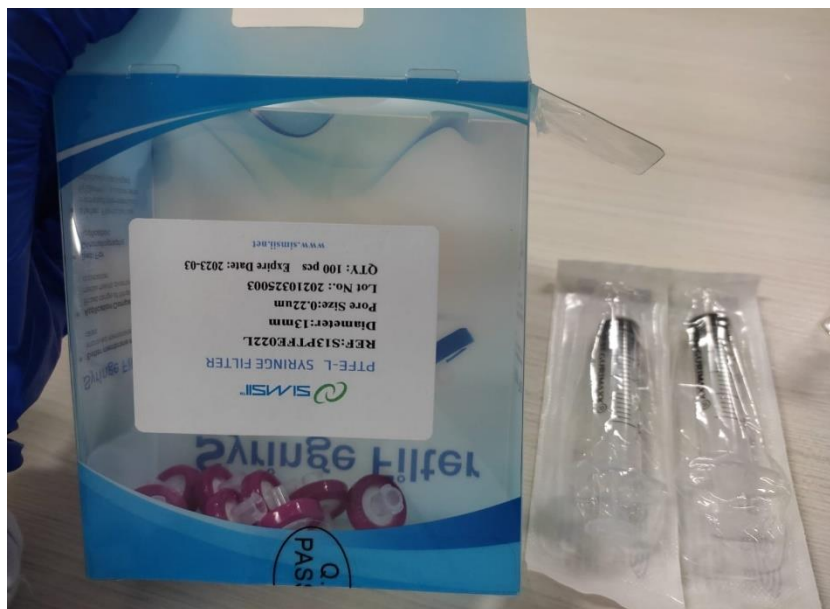
*Punteras*



*Nota.* La volumetría de las punteras fue de 0,5 a 1000  $\mu$ L

**Figura 23**

*Jeringas de 5 mL y filtros de 13 mm, con poros de 0,22  $\mu$ m*



*Nota.* Se utilizaron para la filtración final de las muestras

## Anexo B Secuencia del desarrollo del proyecto

### Figura 24

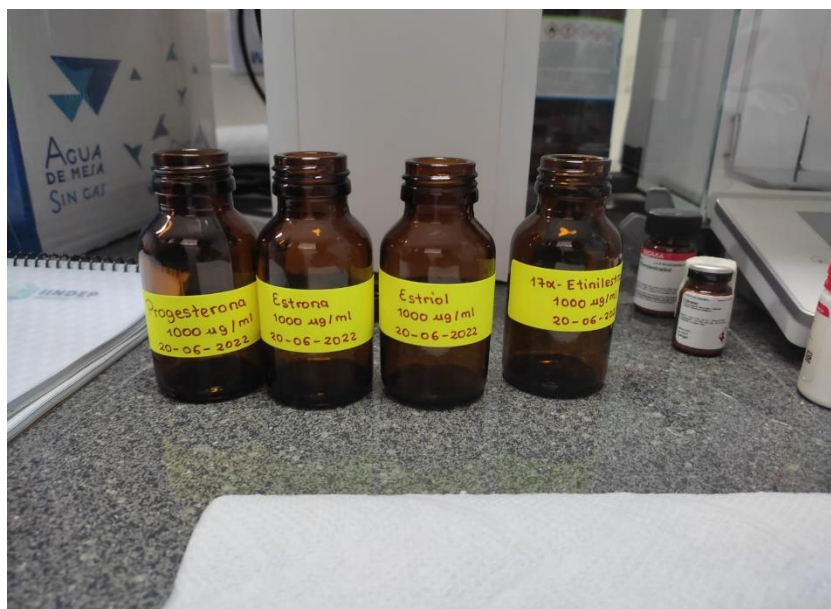
*Pesado de patrones analíticos, en balanza analítica*



*Nota.* El peso de cada analito es de 5 mg, para realizar la dilución correspondiente

### Figura 25

*Solución madre para cada analito*



*Nota.* Soluciones madre en µg/mL, para obtener soluciones menores

## Figura 26

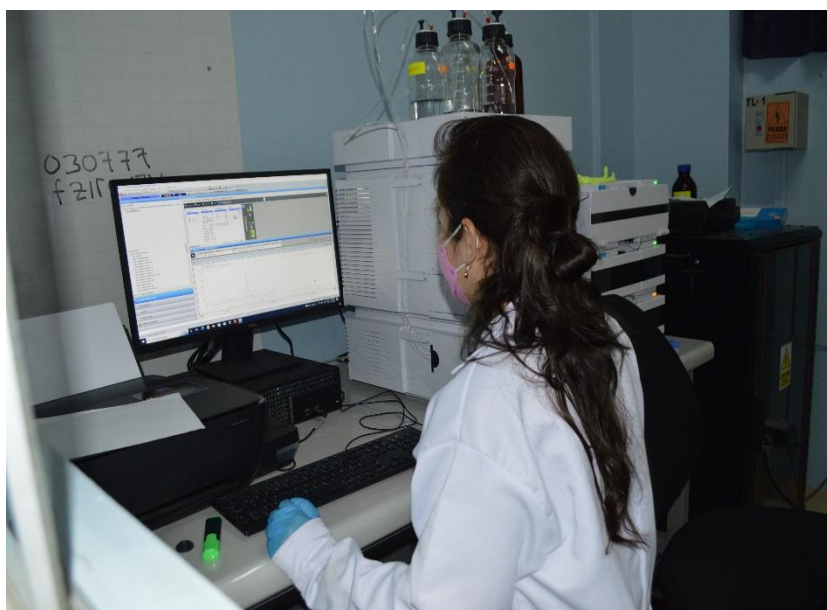
*Soluciones obtenidas para la curva de calibración*



*Nota.* Concentraciones en  $\mu\text{g/mL}$  para la curva de calibración

## Figura 27

*Desarrollo del método analítico cromatográfico por UHPLC-DAD*



*Nota.* Manejo del equipo UHPLC, y desarrollo del método analítico, en el Laboratorio de Contaminantes orgánicos y ambiente de la Universidad Nacional de Moquegua

## Figura 28

*Afluente de la PTAR-Ilo*



*Nota.* Entrada de la PTAR-Ilo, donde se realizaron las tomas

## Figura 29

*Toma de muestras de agua del afluente*



*Nota.* Las tomas de las muestras se realizaron de acuerdo al protocolo establecido

### Figura 30

*Medición de parámetros fisicoquímicos en muestras de agua del afluente*



*Nota.* La medición de los parámetros fisicoquímicos se realizó in situ, con un equipo multiparámetro

### Figura 31

*Efluente de la PTAR-Ilo*



*Nota.* Vista de las lagunas de oxidación y efluente de la PTAR-Ilo

### Figura 32

*Medición de parámetros fisicoquímicos en muestras de agua del afluente*



*Nota.* La medición de los parámetros fisicoquímicos se realizó in situ, con un equipo multiparámetro

### Figura 33

*Fascos con la toma de las muestras de agua residual*



*Nota.* Frascos ámbar de 1 L, con muestras de agua residual del afluente y efluente de la PTAR-Ilo

### Figura 34

#### *Filtrado de las muestras*



*Nota.* Se realizó el filtrado de las muestras de agua residual para eliminar, partículas de gran tamaño y posterior extracción

### Figura 35

#### *Acondicionamiento de los cartuchos para extracción*



*Nota.* Se usó cartuchos HLB SPE, que se acondicionaron con 10 mL de MeOH, y 10 mL de agua ultra pura

### Figura 36

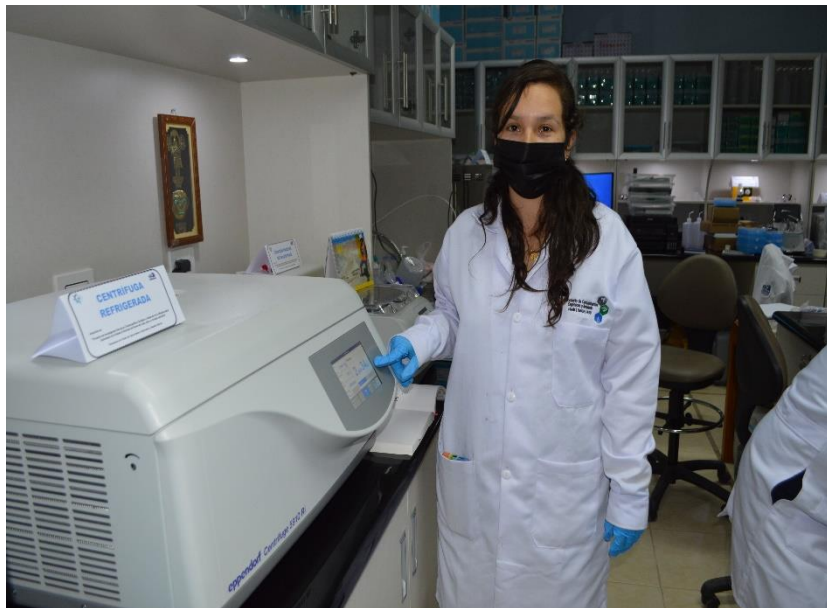
*Extracción de fase sólida de las muestras de agua de la PTAR-Ilo*



*Nota.* Desarrollo del método de extracción, para validación de la metodología establecida en la presente investigación

### Figura 37

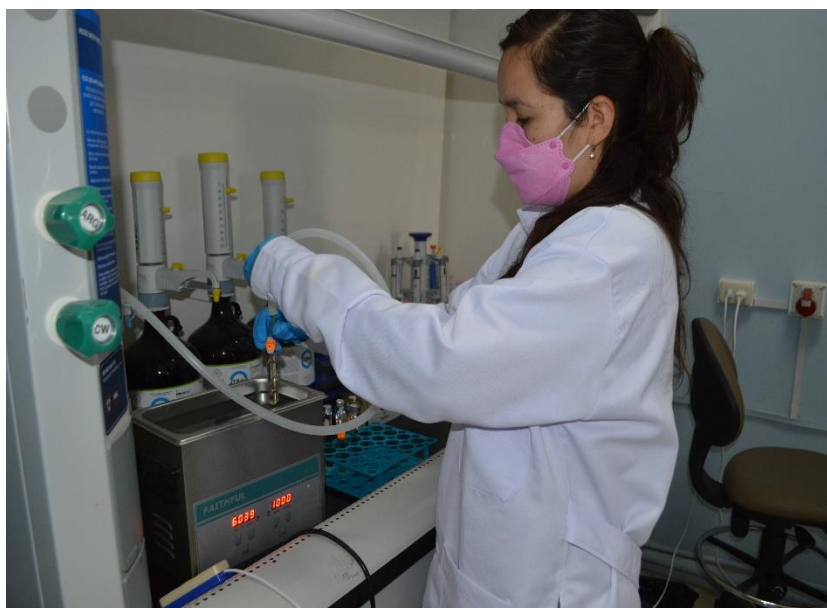
*Centrifugado de las muestras*



*Nota.* Se centrifugó los extractos recogidos en tubos de ensayos a 4000 rpm durante 5 minutos para su sedimentación

### Figura 38

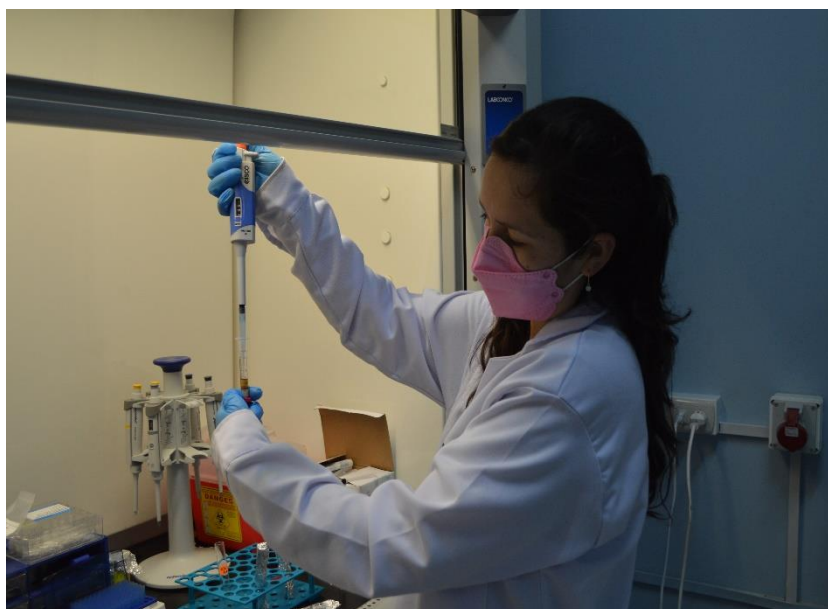
*Secado de muestras con concentrador de nitrógeno*



*Nota.* Se concentraron las muestras, para luego acondicionar con 1mL de MeOH

### Figura 39

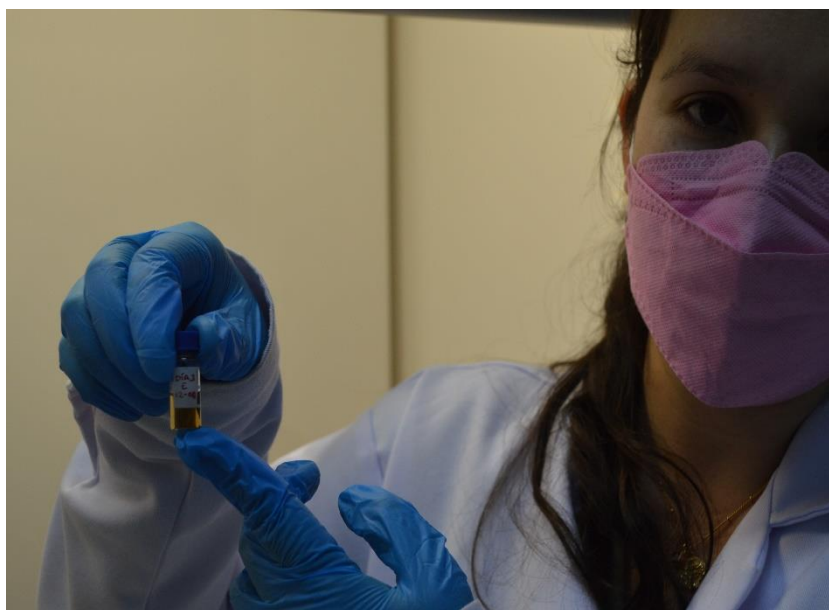
*Filtrado de muestras*



*Nota.* Se usaron jeringas de 5mL con filtros de 13 mm de diámetro, con pros de 0,22  $\mu\text{m}$

**Figura 40**

*Disposición en el vial para su posterior inyección en el equipo cromatográfico*



*Nota.* Obtención final de la muestra (1 mL) en vial de color ámbar de 2 mL de volumen

**Figura 41**

*Muestra final lista para su corrida en el cromatógrafo*



*Nota.* Se coloca el vial para su inyección en el equipo y posterior corrida

Anexo C

Fichas de registro de campo utilizadas

HORA

ML. Ca. PSU

%

ppmTds

mS/cm

MUESTRA	pH	CONDUCTIVIDAD	SDT	SALINIDAD	OD	ORP	RESISTIVIDAD	SALINIDAD	TEMPERATURA
<del>AFUENTE</del> 4-Agosto	<del>6.00</del>	<del>12.16</del>	<del>6082</del>		<del>6.4</del>	<del>233.1</del>	<del>0.0001</del>	<del>7.02</del>	
AFUENTE 4-Agosto	7.49	12.03	6036		8.5	105.2	0.0001	6.96	
EFUENTE 4-Agosto	8.00	10.71	5365		<del>4.4</del> 4.44	99.	11	6.14	
AFUENTE 5-Agosto	7.72	0.8507	4732		9.9				
AFUENTE 10/08/22	7.60	10.37	5473	-	4.4%	-	0.0001	6.23	22.9°C
EFUENTE 10/08/22	7.72	10.84	5428		10.7		0.001	6.19	18.74°C
		9.369							
EFUENTE 10/08/22	7.09	11.08	5522.		26.8		0.0001	6.30	21.11°C
		10.24			26.8		0.0001		

10:45 am.

11:10 am

11:30 am

HUREA

ML. Cu. PSU

%

mst m ppmTds

MUESTRA	pH	CONDUCTIVIDAD	SDT	SALINIDAD	OD	ORP	RESISTIVIDAD	SALINIDAD	TEMPERATURA
AFLUENTE 4 - A GO STO	<del>6.00</del>	<del>12.16</del>	6082	<del>6.4</del>	233.1		0.0001	7.02	
AFLUENTE 4 - A GO STO	7.49	12.03	6036	8.5	105.2		0.0001	6.96	
EFLUENTE 4 - A GO STO	8.00	10.71	5365	<del>4.4</del> 4.44	99.		11	6.14	
AFLUENTE 5 - A GO STO	7.72	0.8507	4232	9.9					
AFLUENTE 10/08/22	7.60	10.37	5433	9.4%	-		0.0001	6.23	22.9°C
EFLUENTE 10/08/22	7.72	10.84	5428	10.7			0.001	6.19	18.74°C
		9369							
EFLUENTE 10/08/22	7.09	11.08	5522.	26.8			0.0001	6.30	21.15°C
		10.24		26.8			0.0001		

10:45 am.

11:10 am

11:30 am

## Anexo D Cromatogramas de las muestras analizadas

A continuación, se presentan los cromatogramas de las muestras analizadas durante los 7 días de monitoreo, tanto en el afluente como efluente de la PTAR-Ilo, respectivamente.

Data File C:\Chem32\1\Data\HORMONAS-VALIDACION\HORMONAS GINA 2022-08-12 18-44-11\008-P1-A1-AFLUENTE DIA 1.D  
Sample Name: AFLUENTE DIA 1

```

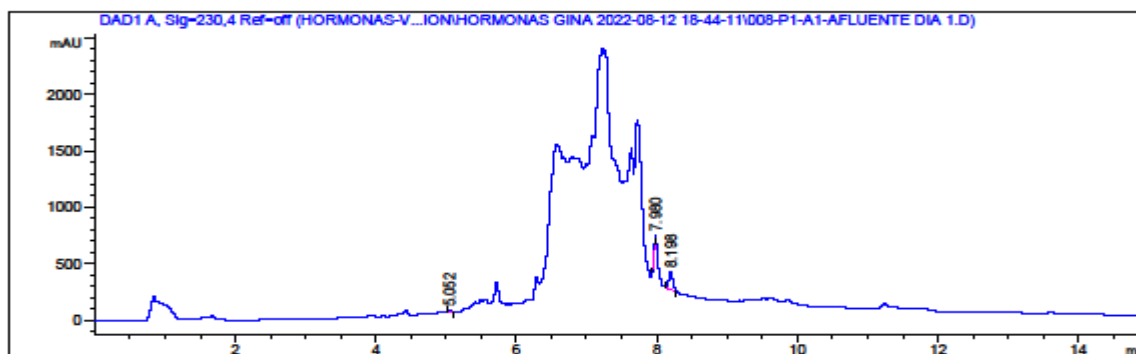
=====
Acq. Operator   : fzirenav                      Seq. Line :    8
Sample Operator : fzirenav
Acq. Instrument : UHPLC 1290 DAD                 Location  : P1-A-01
Injection Date  : 8/12/2022 8:55:52 PM          Inj       :    1
                                                Inj Volume: 5.000 µl

Acq. Method    : C:\Chem32\1\Data\HORMONAS-VALIDACION\HORMONAS GINA 2022-08-12 18-44-11
                                                \HORMONAS.M
Last changed   : 8/12/2022 6:44:08 PM by fzirenav
Analysis Method : C:\Chem32\1\Data\HORMONAS-VALIDACION\HORMONAS GINA 2022-08-12 18-44-11
                                                \HORMONAS.M (Sequence Method)
Last changed   : 8/15/2022 9:26:46 AM by fzirenav
                (modified after loading)
    
```

Sample-related custom fields:

Name	Value
------	-------

Additional Info : Peak(s) manually integrated



### Area Percent Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 8/15/2022 9:15:43 AM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=230,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Area %	Name
1	5.052	BB	0.0399	35.33260	4.4277	
2	7.980	BBA	0.0373	201.73314	25.2804	
3	8.198	BBA	0.0558	560.91528	70.2918	
4	13.180		0.0000	0.00000	0.0000	

Sample Name: AFLUENTE DIA 2

```

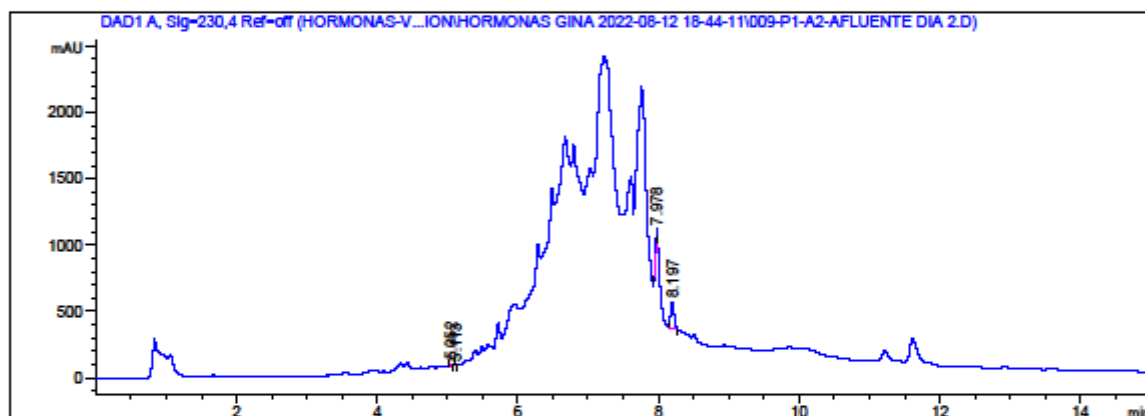
=====
Acq. Operator   : fzirenav                      Seq. Line :    9
Sample Operator : fzirenav
Acq. Instrument : UHPLC 1290 DAD                 Location  : P1-A-02
Injection Date  : 8/12/2022 9:14:34 PM         Inj       :    1
                                                    Inj Volume: 5.000 µl

Acq. Method     : C:\Chem32\1\Data\HORMONAS-VALIDACION\HORMONAS GINA 2022-08-12 18-44-11
                  \HORMONAS.M
Last changed    : 8/12/2022 6:44:08 PM by fzirenav
Analysis Method : C:\Chem32\1\Data\HORMONAS-VALIDACION\HORMONAS GINA 2022-08-12 18-44-11
                  \HORMONAS.M (Sequence Method)
Last changed    : 8/15/2022 9:26:46 AM by fzirenav
                  (modified after loading)
    
```

Sample-related custom fields:

```

Name | Value
-----|-----
    
```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 8/15/2022 9:15:43 AM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=230,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [MAU*s]	Area %	Name
1	5.052	BV	0.0430	19.36343	1.9509	?
2	5.113	VB	0.0322	3.51085	0.3537	
3	7.978	BBA	0.0361	290.46426	29.2642	
4	8.197	BBA	0.0535	679.21844	68.4312	
5	13.180		0.0000	0.00000	0.0000	

Sample Name: AFLUENTE DIA 3

```

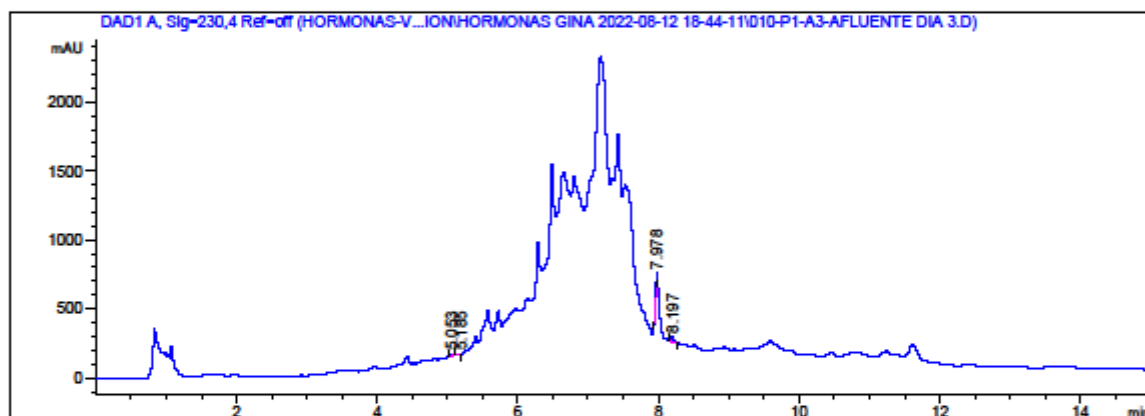
=====
Acq. Operator   : fzirenav                      Seq. Line : 10
Sample Operator : fzirenav
Acq. Instrument : UHPLC 1290 DAD                    Location  : P1-A-03
Injection Date  : 8/12/2022 9:33:16 PM          Inj       : 1
                                                    Inj Volume: 5.000 µl

Acq. Method    : C:\Chem32\1\Data\HORMONAS-VALIDACION\HORMONAS GINA 2022-08-12 18-44-11
\HORMONAS.M
Last changed   : 8/12/2022 6:44:08 PM by fzirenav
Analysis Method : C:\Chem32\1\Data\HORMONAS-VALIDACION\HORMONAS GINA 2022-08-12 18-44-11
\HORMONAS.M (Sequence Method)
Last changed   : 8/15/2022 9:26:46 AM by fzirenav
                (modified after loading)
    
```

Sample-related custom fields:

```

Name | Value
-----|-----
=====
    
```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 8/15/2022 9:15:43 AM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=230,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [MAU*s]	Area %	Name
1	5.053	BV R	0.0481	45.14366	10.3987	
2	5.185	VB E	0.0337	2.43361	0.5606	?
3	7.978	BBA	0.0369	278.50742	64.1533	
4	8.197	BB	0.0477	108.04335	24.8874	
5	13.180		0.0000	0.00000	0.0000	

Sample Name: AFLUENTE DIA 4

```

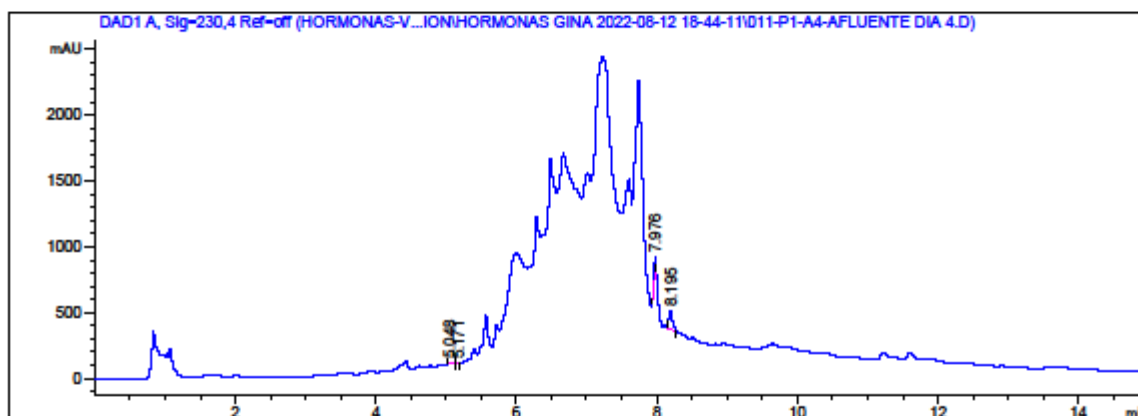
=====
Acq. Operator   : fzirenav                      Seq. Line : 11
Sample Operator : fzirenav
Acq. Instrument : UHPLC 1290 DAD                 Location  : P1-A-04
Injection Date  : 8/12/2022 9:51:57 PM         Inj       : 1
                                                    Inj Volume: 5.000 µl

Acq. Method    : C:\Chem32\1\Data\HORMONAS-VALIDACION\HORMONAS GINA 2022-08-12 18-44-11
                \HORMONAS.M
Last changed   : 8/12/2022 6:44:08 PM by fzirenav
Analysis Method : C:\Chem32\1\Data\HORMONAS-VALIDACION\HORMONAS GINA 2022-08-12 18-44-11
                \HORMONAS.M (Sequence Method)
Last changed   : 8/15/2022 9:26:46 AM by fzirenav
                (modified after loading)
    
```

Sample-related custom fields:

```

Name | Value
-----|-----
    
```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 8/15/2022 9:15:43 AM
Multiplier     : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=230,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Area %	Name
1	5.048	BV	0.0438	30.00495	3.6395	
2	5.171	VB	0.0323	4.47064	0.5423	?
3	7.976	BBA	0.0356	304.60007	36.9473	
4	8.195	BBA	0.0534	485.34158	58.8709	
5	13.180		0.0000	0.00000	0.0000	

Sample Name: AFLUENTE DIA 5

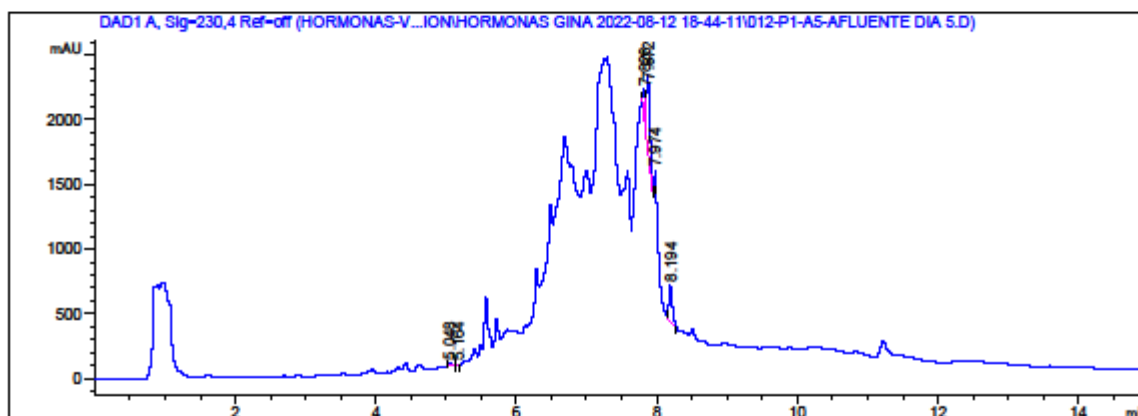
```

=====
Acq. Operator   : fzirenav                      Seq. Line : 12
Sample Operator : fzirenav
Acq. Instrument : UHPLC 1290 DAD                 Location  : P1-A-05
Injection Date  : 8/12/2022 10:10:38 PM        Inj       : 1
                                                    Inj Volume: 5.000 µl
Acq. Method     : C:\Chem32\1\Data\HORMONAS-VALIDACION\HORMONAS GINA 2022-08-12 18-44-11
                  \HORMONAS.M
Last changed    : 8/12/2022 6:44:08 PM by fzirenav
Analysis Method : C:\Chem32\1\Data\HORMONAS-VALIDACION\HORMONAS GINA 2022-08-12 18-44-11
                  \HORMONAS.M (Sequence Method)
Last changed    : 8/15/2022 9:26:46 AM by fzirenav
                  (modified after loading)
    
```

Sample-related custom fields:

```

Name | Value
-----|-----
=====
    
```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 8/15/2022 9:15:43 AM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=230,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Area %	Name
1	5.048	BV	0.0526	55.45140	1.5455	
2	5.164	VB	0.0387	10.30135	0.2871	?
3	7.826	BV	0.0366	585.33801	16.3141	?
4	7.872	VB	0.0477	1822.81213	50.8040	
5	7.974	BBA	0.0256	222.27316	6.1950	?

Sample Name: AFLUENTE DIA 6

```

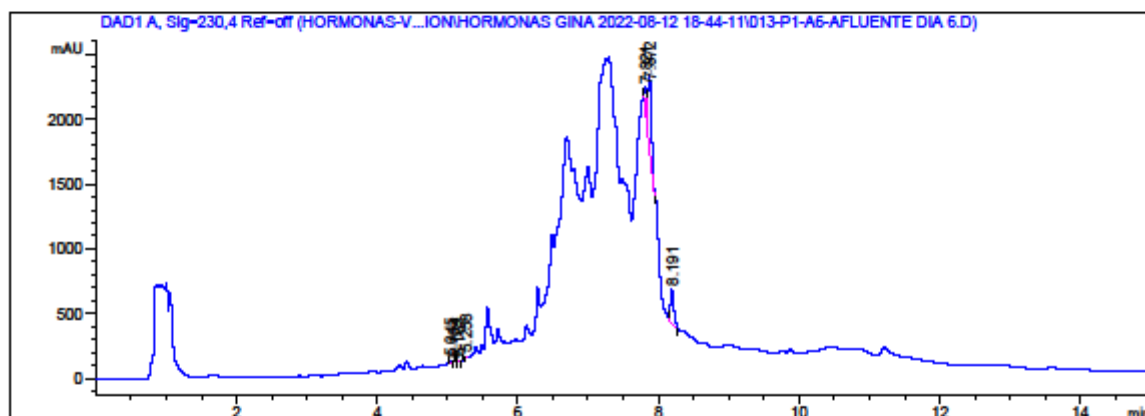
=====
Acq. Operator   : fzirenav                      Seq. Line : 13
Sample Operator : fzirenav
Acq. Instrument : UHPLC 1290 DAD                  Location  : P1-A-06
Injection Date  : 8/12/2022 10:29:18 PM        Inj       : 1
                                                    Inj Volume: 5.000 µl

Acq. Method    : C:\Chem32\1\Data\HORMONAS-VALIDACION\HORMONAS GINA 2022-08-12 18-44-11
\HORMONAS.M
Last changed   : 8/12/2022 6:44:08 PM by fzirenav
Analysis Method : C:\Chem32\1\Data\HORMONAS-VALIDACION\HORMONAS GINA 2022-08-12 18-44-11
\HORMONAS.M (Sequence Method)
Last changed   : 8/15/2022 9:26:46 AM by fzirenav
                (modified after loading)
    
```

Sample-related custom fields:

```

Name | Value
-----|-----
    
```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 8/15/2022 9:15:43 AM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=230,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Area %	Name
1	5.045	BV	0.0435	41.68627	1.2664	?
2	5.104	VB	0.0280	6.83736	0.2077	
3	5.162	BB	0.0281	4.21450	0.1280	?
4	5.258	BBA	0.0317	12.05315	0.3662	?
5	7.821	BV	0.0388	553.93866	16.8287	?

Sample Name: AFLUENTE DIA 7

```

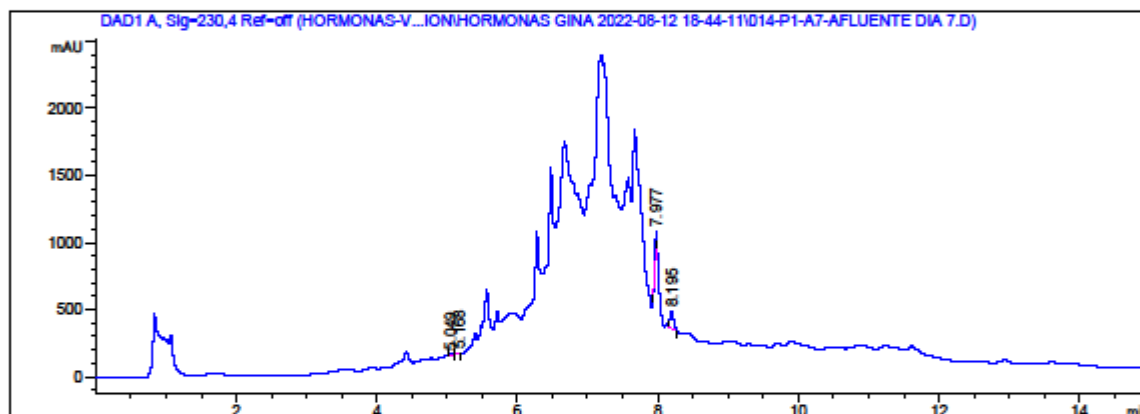
=====
Acq. Operator   : fzirenav                      Seq. Line :   14
Sample Operator : fzirenav
Acq. Instrument : UHPLC 1290 DAD                 Location  : P1-A-07
Injection Date  : 8/12/2022 10:47:59 PM        Inj       :    1
                                                    Inj Volume: 5.000 µl

Acq. Method     : C:\Chem32\1\Data\HORMONAS-VALIDACION\HORMONAS GINA 2022-08-12 18-44-11
                  \HORMONAS.M
Last changed    : 8/12/2022 6:44:08 PM by fzirenav
Analysis Method : C:\Chem32\1\Data\HORMONAS-VALIDACION\HORMONAS GINA 2022-08-12 18-44-11
                  \HORMONAS.M (Sequence Method)
Last changed    : 8/15/2022 9:26:46 AM by fzirenav
                  (modified after loading)
    
```

Sample-related custom fields:

```

Name | Value
-----|-----
=====
    
```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 8/15/2022 9:15:43 AM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=230,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Area %	Name
1	5.049	BB	0.0445	25.02606	2.7511	
2	5.168	BB	0.0360	17.14594	1.8848	?
3	7.977	BBA	0.0395	423.80765	46.5888	
4	8.195	BBA	0.0536	443.69760	48.7753	
5	13.180		0.0000	0.00000	0.0000	

Sample Name: EFLUENTE DIA 1

```

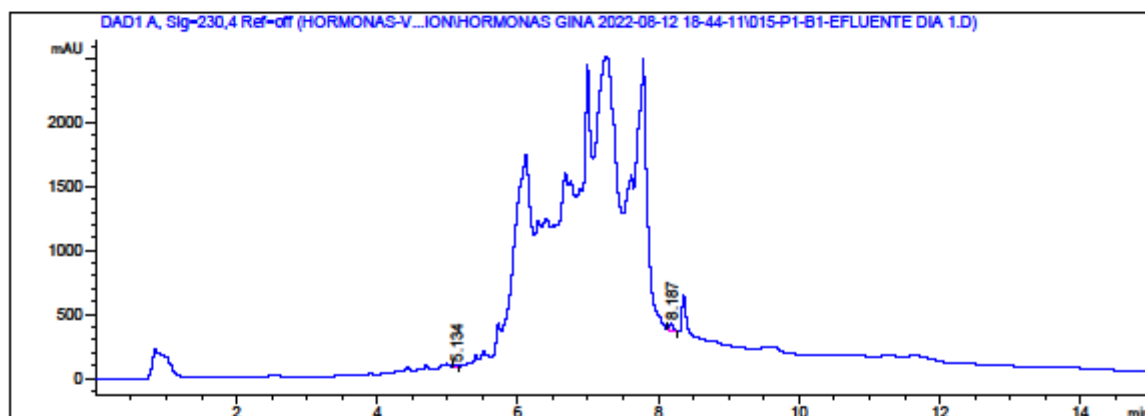
=====
Acq. Operator   : fzirenav                      Seq. Line : 15
Sample Operator : fzirenav
Acq. Instrument : UHPLC 1290 DAD                  Location  : P1-B-01
Injection Date  : 8/12/2022 11:06:42 PM         Inj       : 1
                                                    Inj Volume: 5.000 µl

Acq. Method     : C:\Chem32\1\Data\HORMONAS-VALIDACION\HORMONAS GINA 2022-08-12 18-44-11
                  \HORMONAS.M
Last changed    : 8/12/2022 6:44:08 PM by fzirenav
Analysis Method : C:\Chem32\1\Data\HORMONAS-VALIDACION\HORMONAS GINA 2022-08-12 18-44-11
                  \HORMONAS.M (Sequence Method)
Last changed    : 8/15/2022 9:26:46 AM by fzirenav
                  (modified after loading)
    
```

Sample-related custom fields:

```

Name | Value
-----|-----
    
```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 8/15/2022 9:15:43 AM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=230,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Area %	Name
1	5.134	BB	0.0405	4.84498	2.7340	
2	7.882		0.0000	0.00000	0.0000	
3	8.187	BBA	0.0541	172.36601	97.2660	
4	13.180		0.0000	0.00000	0.0000	

Sample Name: EFLUENTE DIA 2

```

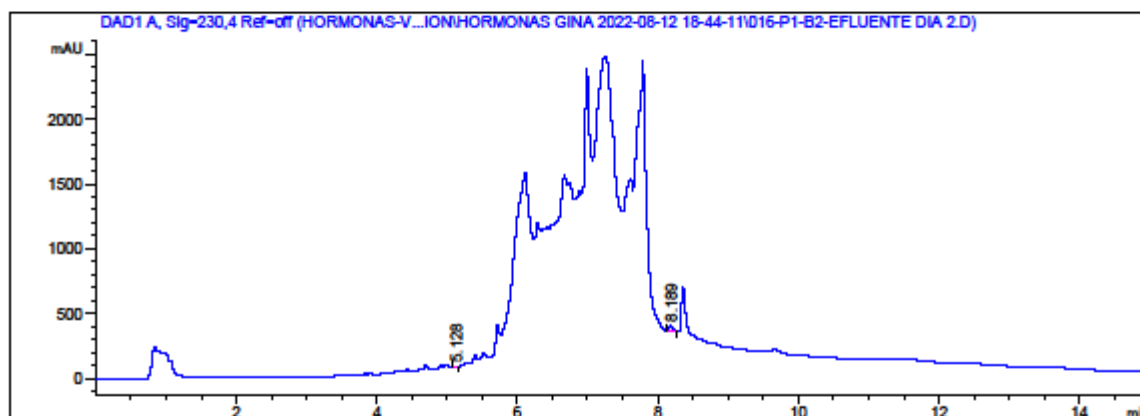
=====
Acq. Operator   : fzirenav                      Seq. Line :   16
Sample Operator : fzirenav
Acq. Instrument : UHPLC 1290 DAD                 Location  : P1-B-02
Injection Date  : 8/12/2022 11:25:23 PM        Inj       :    1
                                                Inj Volume: 5.000 µl

Acq. Method     : C:\Chem32\1\Data\HORMONAS-VALIDACION\HORMONAS GINA 2022-08-12 18-44-11
                                                \HORMONAS.M
Last changed    : 8/12/2022 6:44:08 PM by fzirenav
Analysis Method : C:\Chem32\1\Data\HORMONAS-VALIDACION\HORMONAS GINA 2022-08-12 18-44-11
                                                \HORMONAS.M (Sequence Method)
Last changed    : 8/15/2022 9:26:46 AM by fzirenav
                  (modified after loading)
    
```

Sample-related custom fields:

```

Name | Value
-----|-----
=====
    
```



=====  
Area Percent Report  
=====

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 8/15/2022 9:15:43 AM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=230,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Area %	Name
1	5.128	BB	0.0443	6.73445	4.5601	
2	7.882		0.0000	0.00000	0.0000	
3	8.189	BB	0.0527	140.94859	95.4399	
4	13.180		0.0000	0.00000	0.0000	

Sample Name: EFLUENTE DIA 3

```

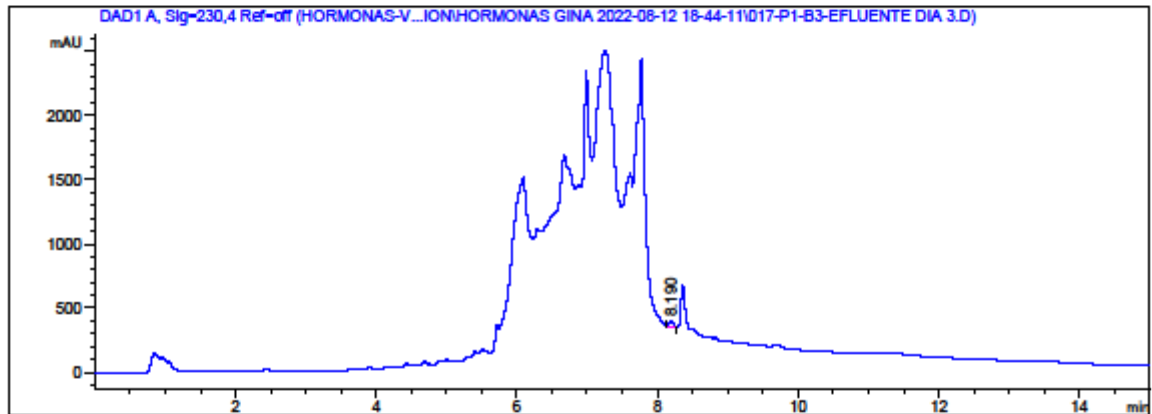
=====
Acq. Operator   : fzirenav                      Seq. Line : 17
Sample Operator : fzirenav
Acq. Instrument : UHPLC 1290 DAD                 Location  : P1-B-03
Injection Date  : 8/12/2022 11:44:03 PM        Inj       : 1
                                                Inj Volume: 5.000 µl

Acq. Method    : C:\Chem32\1\Data\HORMONAS-VALIDACION\HORMONAS GINA 2022-08-12 18-44-11
                                                \HORMONAS.M
Last changed   : 8/12/2022 6:44:08 PM by fzirenav
Analysis Method : C:\Chem32\1\Data\HORMONAS-VALIDACION\HORMONAS GINA 2022-08-12 18-44-11
                                                \HORMONAS.M (Sequence Method)
Last changed   : 8/15/2022 9:26:46 AM by fzirenav
                (modified after loading)
    
```

Sample-related custom fields:

```

Name | Value
-----|-----
    
```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 8/15/2022 9:15:43 AM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=230,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Area %	Name
1	5.087		0.0000	0.00000	0.0000	
2	7.882		0.0000	0.00000	0.0000	
3	8.190	BBA	0.0565	166.76126	100.0000	
4	13.180		0.0000	0.00000	0.0000	

Sample Name: EFLUENTE DIA 4

```

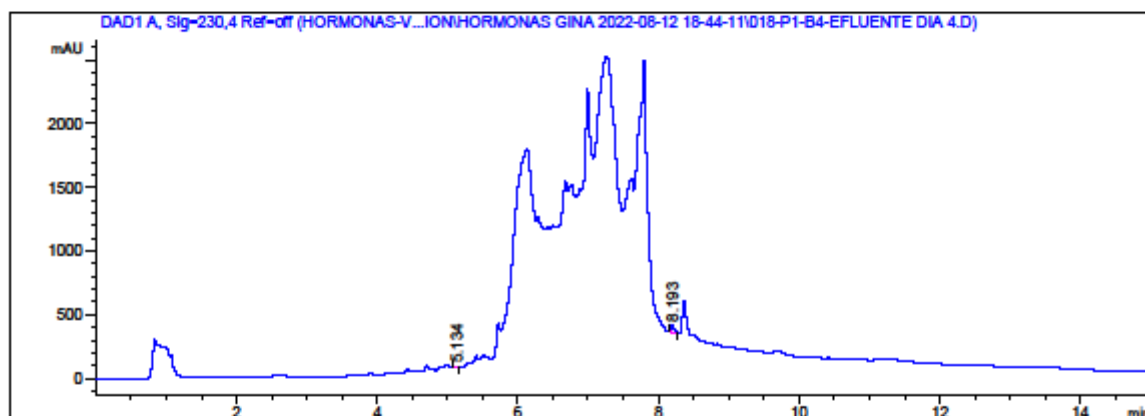
=====
Acq. Operator   : fzirenav                      Seq. Line : 18
Sample Operator : fzirenav
Acq. Instrument : UHPLC 1290 DAD                  Location  : P1-B-04
Injection Date  : 8/13/2022 12:02:44 AM         Inj       : 1
                                                    Inj Volume: 5.000 µl

Acq. Method     : C:\Chem32\1\Data\HORMONAS-VALIDACION\HORMONAS GINA 2022-08-12 18-44-11
                  \HORMONAS.M
Last changed    : 8/12/2022 6:44:08 PM by fzirenav
Analysis Method : C:\Chem32\1\Data\HORMONAS-VALIDACION\HORMONAS GINA 2022-08-12 18-44-11
                  \HORMONAS.M (Sequence Method)
Last changed    : 8/15/2022 9:26:46 AM by fzirenav
                  (modified after loading)
    
```

Sample-related custom fields:

```

Name | Value
-----|-----
    
```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 8/15/2022 9:15:43 AM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=230,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Area %	Name
1	5.134	BB	0.0345	3.00873	1.6468	
2	7.882		0.0000	0.00000	0.0000	
3	8.193	BBA	0.0550	179.68883	98.3532	
4	13.180		0.0000	0.00000	0.0000	

Sample Name: EFLUENTE DIA 5

```

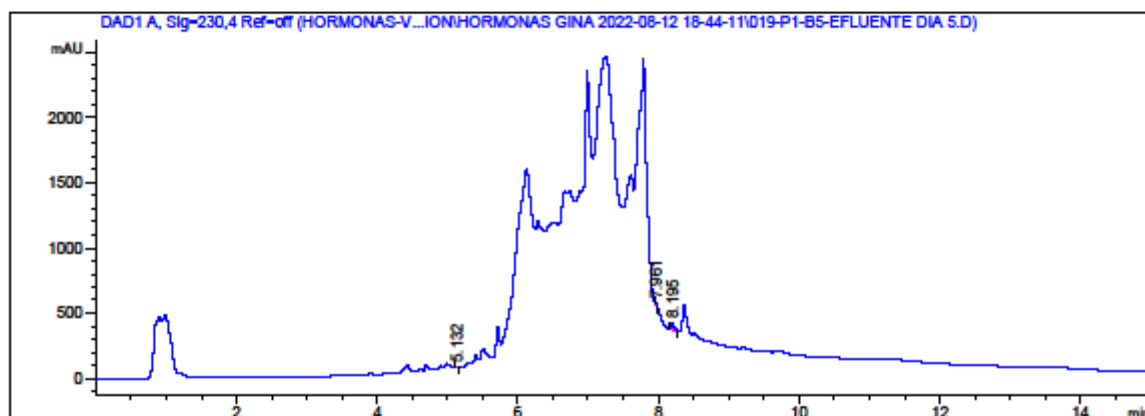
=====
Acq. Operator   : fzirenav                      Seq. Line : 19
Sample Operator : fzirenav
Acq. Instrument : UHPLC 1290 DAD                 Location  : P1-B-05
Injection Date  : 8/13/2022 12:21:25 AM        Inj       : 1
                                                    Inj Volume: 5.000 µl

Acq. Method     : C:\Chem32\1\Data\HORMONAS-VALIDACION\HORMONAS GINA 2022-08-12 18-44-11
\HORMONAS.M
Last changed    : 8/12/2022 6:44:08 PM by fzirenav
Analysis Method : C:\Chem32\1\Data\HORMONAS-VALIDACION\HORMONAS GINA 2022-08-12 18-44-11
\HORMONAS.M (Sequence Method)
Last changed    : 8/15/2022 9:26:46 AM by fzirenav
(modified after loading)
    
```

Sample-related custom fields:

```

Name | Value
-----|-----
    
```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 8/15/2022 9:15:43 AM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=230,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Area %	Name
1	5.132	BB	0.0405	4.85462	2.0803	
2	7.961	BBA	0.0404	20.81547	8.9197	
3	8.195	BBA	0.0534	207.69420	89.0000	
4	13.180		0.0000	0.00000	0.0000	

Sample Name: EFLUENTE DIA 6

```

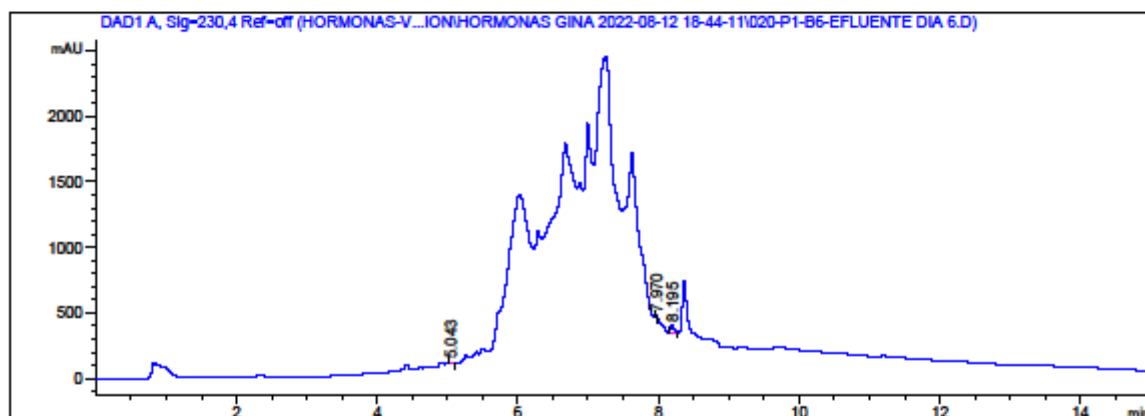
=====
Acq. Operator   : fzirenav                      Seq. Line : 20
Sample Operator : fzirenav
Acq. Instrument : UHPLC 1290 DAD                  Location  : P1-B-06
Injection Date  : 8/13/2022 12:40:07 AM         Inj       : 1
                                                    Inj Volume: 5.000 µl

Acq. Method     : C:\Chem32\1\Data\HORMONAS-VALIDACION\HORMONAS GINA 2022-08-12 18-44-11
                  \HORMONAS.M
Last changed    : 8/12/2022 6:44:08 PM by fzirenav
Analysis Method : C:\Chem32\1\Data\HORMONAS-VALIDACION\HORMONAS GINA 2022-08-12 18-44-11
                  \HORMONAS.M (Sequence Method)
Last changed    : 8/15/2022 9:26:46 AM by fzirenav
                  (modified after loading)
    
```

Sample-related custom fields:

```

Name | Value
-----|-----
    
```



=====  
 Area Percent Report  
 =====

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 8/15/2022 9:15:43 AM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=230,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Area %	Name
1	5.043	BB	0.0323	7.88730	3.9156	
2	7.970	BBA	0.0280	23.95770	11.8936	
3	8.195	BBA	0.0536	169.58818	84.1908	
4	13.180		0.0000	0.00000	0.0000	

Sample Name: EFLUENTE DIA 7

```

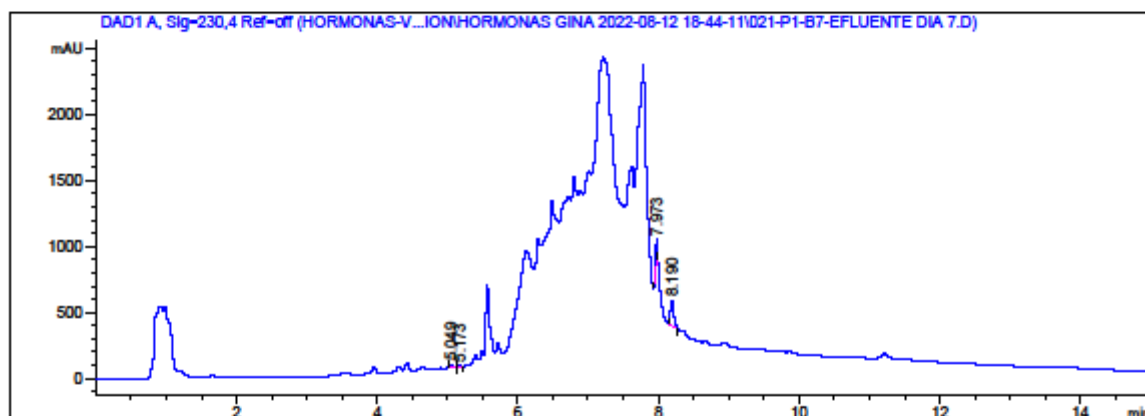
=====
Acq. Operator   : fzirenav                      Seq. Line : 21
Sample Operator : fzirenav
Acq. Instrument : UHPLC 1290 DAD                  Location  : P1-B-07
Injection Date  : 8/13/2022 12:58:48 AM         Inj       : 1
                                                    Inj Volume: 5.000 µl

Acq. Method     : C:\Chem32\1\Data\HORMONAS-VALIDACION\HORMONAS GINA 2022-08-12 18-44-11
                  \HORMONAS.M
Last changed    : 8/12/2022 6:44:08 PM by fzirenav
Analysis Method : C:\Chem32\1\Data\HORMONAS-VALIDACION\HORMONAS GINA 2022-08-12 18-44-11
                  \HORMONAS.M (Sequence Method)
Last changed    : 8/15/2022 9:26:46 AM by fzirenav
                  (modified after loading)
    
```

Sample-related custom fields:

```

Name | Value
-----|-----
    
```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 8/15/2022 9:15:43 AM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=230,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Area %	Name
1	5.049	BV	0.0517	55.29932	5.0940	
2	5.173	VB	0.0454	18.35611	1.6909	?
3	7.973	BBA	0.0337	373.16559	34.3746	
4	8.190	BBA	0.0510	638.76367	58.8405	
5	13.180		0.0000	0.00000	0.0000	