



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
INGENIERÍA AMBIENTAL – AGUA

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESTROGÉNICA DE LOS SUBPRODUCTOS
GENERADOS A PARTIR DE COMPUESTOS EMERGENTES DURANTE LOS
PROCESOS DE OXIDACIÓN CON OZONO Y CLORO EN AGUA DE
ABASTECIMIENTO

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN INGENIERÍA

PRESENTA:
Q. JESSICA AGUIRRE LONDOÑO

TUTORES PRINCIPALES
DRA. MARÍA TERESA ORTA LEDESMA, INSTITUTO DE INGENIERÍA
M.C. ISaura YAÑEZ NOGUEZ, INSTITUTO DE INGENIERÍA

COMITÉ TUTOR
DRA. ALEJANDRA MARTÍN DOMÍNGUEZ, INSTITUTO MEXICANO DE
TECNOLOGÍA DEL AGUA
DRA. ALMA CONCEPCIÓN CHÁVEZ MEJÍA, INSTITUTO DE INGENIERÍA
DR. JOSÉ ELÍAS BECERRIL BRAVO, INSTITUTO DE INGENIERÍA

CDMX, NOVIEMBRE DE 2018

JURADO ASIGNADO:

Presidente: DRA. ALEJANDRA MARTÍN DOMÍNGUEZ
Secretario: DRA. ALMA CONCEPCIÓN CHÁVEZ MEJÍA
Vocal: DR. JOSÉ ELÍAS BECERRIL BRAVO
1 er. Suplente: M.C. ISAURA YAÑEZ NOGUEZ
2 do. Suplente: DRA. MARÍA TERESA ORTA LEDESMA

Lugar donde se realizó la tesis:

LABORATORIO DE INGENIERÍA AMBIENTAL, INSTITUTO DE INGENIERÍA, UNAM

TUTORES DE TESIS:

DRA. MARÍA TERESA ORTA LEDESMA

FIRMA

M.C. ISAURA YAÑEZ NOGUEZ

FIRMA



El trabajo experimental fue realizado en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental del Instituto de Ingeniería de la UNAM que cuenta con certificado de conformidad otorgado por el organismo acreditado Certificación Mexicana, S.C., por haber implementado y mantener un Sistema de Gestión de la Calidad de conformidad con los requisitos de la norma internacional ISO 9001:2015

No. de Certificado CMX C SGC 155 2017, válido en el período del 09 de noviembre de 2017 al 09 de noviembre de 2020

AGRADECIMIENTOS

- A México por ser un gran país, por permitirme disfrutar de su riqueza en todo sentido y por la amabilidad de su gente. Por acogerme como en casa y mostrarme plenamente el significado de la palabra solidaridad.
- A la UNAM por darme la oportunidad de realizar un posgrado en una de las universidades con más prestigio de Latinoamérica. Me siento muy orgullosa de ella.
- Al Instituto de Ingeniería por fomentar el conocimiento y la educación de calidad.
- Al Laboratorio de Ingeniería Ambiental por facilitar la realización de los experimentos en sus instalaciones con personas siempre dispuestas a colaborar.
- Al CONACyT por la beca brindada durante la realización de mis estudios de Maestría.
- A los integrantes de mi comité tutor por su tiempo y valiosos aportes.
- A la Dra. María Teresa Orta por permitirme hacer parte de su importante grupo de trabajo, por su apoyo, sus sugerencias y amabilidad.
- A la Maestra Isaura Yañez por su acompañamiento y asesoramiento en la realización de esta tesis, por su dedicación, aportes, consejos y por estar siempre dispuesta a pesar de sus múltiples ocupaciones.
- A todos mis compañeros del cubículo 410 por hacer tan agradable el tiempo que permanecí con ellos.
- Este trabajo fue realizado con el apoyo del proyecto PAPIIT IN112416 “Evaluación de la actividad estrogénica de microcontaminantes presentes en agua residual y en agua para abastecimiento”.

¡Muchas gracias a todos!

DEDICATORIA

A Dios

Por ser mi guía, por hacer posible la culminación de esta maestría y por permitirme disfrutar esta gran experiencia de vida

A mi familia

A mi padre Daniel Aguirre

Por sus enseñanzas, su dedicación a la familia, su amor, su ejemplo y tenacidad

A mi madre Norha Londoño

Por su amor incondicional, su apoyo, su entrega y confianza

A mi hermana Daniela

Por su cariño, amistad y por confiar en mí

Por siempre esperarme con paciencia y amor en Colombia, por sus visitas en México, por su apoyo incondicional y por el tiempo que no les dediqué, porque a pesar de la distancia continuamos unidos y porque fueron fundamentales en este logro

A Alex

Por hacer bonitos mis días con su compañía, porque con su apoyo y amor todo fue más fácil, por ser mi compañero de vida y por nuestra unión ante Dios

Y muy especialmente... ***A mi abuelo Luis Londoño***

Gracias por tu amor que es tan infinito como tu alma. Sigue brillando desde la eternidad

RESUMEN

Procesos de oxidación como la cloración y la ozonación para la remoción de contaminantes emergentes, requieren ser estudiados respecto a su eficiencia para atenuar la actividad estrogénica generada por éstos, la cual puede o no incrementarse debido a la formación de subproductos. Se ha demostrado en estudios previos que el cloro y el ozono son eficaces para remover la actividad estrogénica de ciertos compuestos emergentes. No obstante, el efecto que tienen los subproductos formados durante estos procesos de oxidación, en relación a la generación de la actividad estrogénica, son en gran medida desconocidos. Por lo que este trabajo propone la evaluación de la actividad estrogénica a partir de la oxidación con cloro y ozono de contaminantes emergentes presentes en agua y el efecto que podrían aportar a dicha actividad los subproductos formados. Procesos de oxidación con cloro y ozono fueron investigados de manera independiente para remover Bisfenol-A (BPA), 4-Nonilfenol (4NP) y Triclosán (TCS) a partir de agua de pozo fortificada. Dicha remoción fue determinada mediante Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (CG-MS). Así mismo, la actividad estrogénica de estos compuestos y el efecto de los subproductos formados durante los procesos fue determinada usando la metodología BioLuminescent Yeast Estrogen Screen (BLYES). Los procesos de oxidación con cloro y ozono fueron eficaces para remover BPA, 4NP y TCS en el agua de pozo fortificada. Aplicando dosis de cloro entre 0.2 y 1.5 mgCl₂/l y 10min de tiempo de contacto, se lograron porcentajes de remoción hasta del 94.7% para BPA, 97.3% para 4NP y 99.5% para TCS. Respecto al ozono se estableció que con 3mgO₃/l y 10min de tiempo de contacto se remueve 98.5% de BPA y 99.3% de TCS; para el 4NP se encontró que con 3mgO₃/l y 8.2min se alcanza una remoción del 99.9%. Mediante CG-MS se determinó que durante el proceso de oxidación con cloro, se generó *o*-cloro-*p*-fenilfenol como subproducto del BPA, para 4NP y TCS no se encontraron subproductos. Para el caso del ozono se comprobó que a partir de BPA, 4NP y TCS los subproductos formados fueron *4*-hidroxi-ácido benzoico, *3*-buten-2-ol y *clorocatecol* respectivamente. La actividad estrogénica en las muestras fortificadas fue determinada antes y después de cada uno de los procesos de oxidación. Se encontró que tanto el cloro como el ozono contribuyeron a la reducción de la estrogénicidad en el agua. Los porcentajes de remoción de la actividad estrogénica expresada como ng/l EEQ de 17β-estradiol de BPA, 4NP y TCS en el agua de pozo fortificada aplicando cloro, fueron calculados en 86.2%, 94.3% y 97.8% respectivamente, sin que se encontrara un incremento de dicha actividad provocado por los subproductos después del proceso. Para el caso del ozono se establecieron porcentajes de remoción de la actividad estrogénica del 98.7% para BPA, 79.3% para 4NP y 97.0% para el TCS; se determinó que los subproductos generados no contribuyeron a algún incremento en la estrogénicidad. Para evaluar si los procesos de oxidación con cloro y ozono pueden mitigar algún posible riesgo por la presencia de BPA, 4NP y TCS en agua de abastecimiento, se llevó a cabo un análisis de riesgo. Este análisis indicó que el consumo de agua que contenga BPA o 4NP al nivel de fortificación analizado no representa riesgo, mientras que el agua con TCS o con los tres compuestos simultáneos a las concentraciones de fortificación estudiadas, representaría un probable riesgo para la salud. Los procesos de oxidación con cloro y ozono contribuyeron a eliminar los posibles riesgos en todos los casos. La presente tesis aporta a comprobar que los subproductos generados a partir de los procesos de oxidación con cloro y ozono aplicados en la remoción de contaminantes emergentes como BPA, 4NP y TCS en agua de pozo fortificada, no aportan algún incremento en la actividad estrogénica. Por lo que los procesos estudiados son eficaces para la remoción de estos compuestos emergentes y contribuyen a disminuir la actividad estrogénica de los mismos en agua de abastecimiento, sin que ello represente algún riesgo para la salud.

Palabras clave: Actividad estrogénica, BioLuminescent Yeast Estrogen Screen (BLYES), Cloración, Contaminantes emergentes, Ozonación, Subproductos de oxidación

ABSTRACT

Oxidation processes such as chlorination and ozonation for the removal of emerging contaminants, need to be studied with respect to their efficiency to attenuate their generated estrogenic activity, which can or can not be increased due to the formation of by-products. It has been demonstrated in previous studies that chlorine and ozone are effective to eliminate the estrogenic activity of certain emerging compounds. However, the effect of the by-products formed during these oxidation processes, in relation to the generation of estrogenic activity, are largely unknown. Therefore, this work proposes the evaluation of estrogenic activity from the oxidation with chlorine and ozone of emerging contaminants in water and the effect that the by-products formed could contribute to this activity. Oxidation processes with chlorine and ozone were investigated independently to remove Bisphenol-A (BPA), 4-Nonylphenol (4NP) and Triclosan (TCS) from fortified well water. Removal was determined by Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). Likewise, the estrogenic activity of these compounds and the effect of the by-products formed during the processes was determined using the BioLuminescent Yeast Estrogen Screen (BLYES) methodology. Oxidation processes with chlorine and ozone were effective to remove BPA, 4NP and TCS in the fortified well water. Applying chlorine doses between 0.2 and 1.5 mgCl₂/l and 10min of contact time, removal percentages were achieved up to 94.7% for BPA, 97.3% for 4NP and 99.5% for TCS. Regarding ozone, it was established that with 3mgO₃/l and of 10min contact time, 98.5% of BPA and 99.3% of TCS were removed; for 4NP it was found that with 3mgO₃/l and 8.2min a 99.9% removal is achieved. With GC-MS it was determined that during the oxidation process with chlorine, *o-chloro-p-phenylphenol* was generated as a by-product of BPA, no by-products were found for 4NP and TCS. For ozone it was found that from BPA, 4NP and TCS the by-products formed were *4-hydroxy-benzoic acid*, *3-buten-2-ol* and *chlorocatechol* respectively. The estrogenic activity in the fortified samples was determined before and after of each oxidation process. It was found that both chlorine and ozone contributed to the reduction of estrogenicity in water. The percentages of removal of the estrogenic activity expressed as ng/l EEQ of 17β-estradiol from BPA, 4NP and TCS in the fortified well water applying chlorine, were calculated in 86.2%, 94.3% and 97.8% respectively, without being found an increase in that activity caused by the by-products after the process. In the case of ozone, percentages of estrogenic activity removal were established of 98.7% for BPA, 79.3% for 4NP and 97.0% for TCS; it was determined that the generated by-products did not contribute to any increase in estrogenicity. To assess whether the oxidation processes with chlorine and ozone can mitigate any possible risk due to the presence of BPA, 4NP and TCS in water supply, a risk assessment was carried out. This analysis indicated that the consumption of water containing BPA or 4NP at the level of fortification analyzed does not represent risk, while water with TCS or with the three compounds simultaneously with the concentrations of fortification studied, would represent a probable health risk. The processes of oxidation with chlorine and ozone contributed to eliminate the possible risks in all cases. This thesis contributes to verify that the byproducts generated from oxidation processes with chlorine and ozone applied in the removal of emerging contaminants such as BPA, 4NP and TCS in fortified well water, do not contribute any increase in estrogenic activity. Therefore, the processes studied are effective to remove these emerging compounds and contribute to decrease their estrogenic activity in water supply, without representing any risk to health.

Keywords: BioLuminescent Yeast Estrogen Screen (BLYES), Chlorination, Emerging contaminants, Estrogenic activity, Oxidation by-products, Ozonation

Índice

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
INTRODUCCIÓN	1
1. OBJETIVOS	3
1.1 General	3
1.2 Específicos	3
Hipótesis	3
Alcances	3
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Contaminantes emergentes en México	4
2.2 Oxidación de contaminantes emergentes y subproductos	6
2.2.1 Bisfenol-A (BPA)	6
2.2.2 4-Nonilfenol (4NP).....	8
2.2.3 Triclosán (TCS)	9
2.3 Actividad estrogénica en agua	15
2.4 BioLuminescent Yeast Estrogen Screen (BLYES)	16
3. MARCO TEÓRICO	18
3.1 Contaminantes emergentes (CE)	18
3.1.1 Bisfenol-A (BPA)	20
3.1.2 4-Nonilfenol (4NP).....	22
3.1.3 Triclosán (TCS)	23
3.1.4 Extracción en fase sólida	24
3.1.5 Cromatografía Gaseosa – Espectrometría de Masas	26
3.2 Disrupción endócrina y actividad estrogénica	27
3.2.1 Medición de la actividad estrogénica.....	30
3.3 Cloración	33
3.3.1 Subproductos de la cloración.....	34
3.4 Ozonación	35
3.4.1 Subproductos de la ozonación.....	39
3.5 Evaluación de riesgos para la salud humana	40
4. METODOLOGÍA	41
4.1 Muestreo del pozo de abastecimiento	42
4.1.1 Parámetros de calidad del agua.....	43
4.2 Tecnologías de oxidación	43
4.2.1 Cloro.....	43
Análisis de cloro libre	44
4.2.2 Ozono.....	45
Parámetros de control de la prueba de oxidación	46
Balance de masa	46
4.3 Diseño experimental	47
4.3.1 Cloro.....	47

4.3.2 Ozono.....	48
4.4 Determinación de EDC y subproductos mediante CG-MS.....	48
4.5 Determinación de la Actividad estrogénica mediante BLYES	49
Cultivo de la cepa <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BLYES	49
Extracción de los compuestos emergentes.....	49
Dilución de las muestras.....	49
Análisis BLYES	51
4.6 Evaluación de riesgos para la salud humana.....	52
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
5.1 Curva de punto de quiebre para cloro.....	53
5.2 Remoción de BPA, 4NP y TCS.....	54
5.2.1 Cloro.....	54
5.2.2 Ozono.....	56
5.3 Subproductos de oxidación	64
5.3.1 Cloro.....	64
5.3.2 Ozono.....	65
5.4 Actividad estrogénica	69
5.4.1 Cloro.....	70
5.4.2 Ozono.....	71
5.5 Evaluación de riesgos para la salud humana.....	72
6. CONCLUSIÓN.....	76
RECOMENDACIÓN.....	76
7. REFERENCIAS	77
ANEXOS.....	83
Anexo 1: Balance de masa en las pruebas de ozonación.....	83
Anexo 2: Preparación del medio de cultivo BLYES.....	85
Anexo 3: Curvas de calibración.....	87

Índice de tablas

Tabla 2.1 Estudios sobre contaminantes emergentes (BPA, 4NP y TCS) en México, ng/l.....	6
Tabla 2.2 Subproductos encontrados en la literatura para la cloración y ozonación de BPA, 4NP y TCS	12
Tabla 4.1 Muestras del pozo de la Facultad de Química.....	42
Tabla 4.2 Parámetros fisicoquímicos evaluados en el agua del pozo de Química.....	43
Tabla 4.3 Concentraciones de cloro para la curva de punto de quiebre	47
Tabla 4.4 Factores y niveles del diseño experimental para la oxidación con ozono	48
Tabla 4.5 Tratamientos del diseño factorial para la oxidación con ozono	48
Tabla 4.6 Condiciones de análisis mediante GC-MS.....	48
Tabla 5.1 Desempeño del método analítico	54
Tabla 5.2 Remoción de BPA, 4NP y TCS con ozono.....	57
Tabla 5.3 Comportamiento del pH del agua con TCS durante la ozonación.....	58
Tabla 5.4 Análisis de varianza para la remoción de BPA.....	58
Tabla 5.5 Análisis de varianza para la remoción de 4NP	58
Tabla 5.6 Análisis de varianza para la remoción de TCS	59
Tabla 5.7 Ecuaciones del modelo matemático ajustado para la remoción de BPA, 4NP y TCS	62
Tabla 5.8 Valores óptimos de los factores para maximizar la remoción	62
Tabla 5.9 Actividad estrogénica de muestras de agua con contaminantes y su remoción después de cloración	70
Tabla 5.10 Actividad estrogénica de muestras de agua con contaminantes y su remoción después de ozonación	71
Tabla 5.11 Cálculos de riesgo para la salud humana a partir de la exposición a contaminantes emergentes en el agua	74
Tabla 5.12 Ingesta diaria de estrógenos admisible para humanos y concentración prevista sin efecto para la vida acuática.....	75

Índice de figuras

Figura 2.1 Esquema de reacción de la cloración del BPA (Yamamoto y Yasuhara, 2002).....	7
Figura 2.2 Esquema de reacción de la ozonación del BPA (Kusvuran y Yildirim, 2013).....	8
Figura 2.3 Esquema de reacción de la cloración del 4NP (Hu et al., 2002b)	9
Figura 2.4 Esquema de reacción de la cloración del TCS (Buth et al., 2011).....	10
Figura 3.1 Mecanismos de acción de los EDC. a) Respuesta normal de la célula b) Respuesta de bloqueo de la célula c) Respuesta insuficiente o antagonista d) Respuesta agonista (Guzmán y Ramírez, 2012).....	19
Figura 3.2 Medios de exposición a los estrógenos (Ramírez-Sánchez et al., 2015)	20
Figura 3.3 Estructura y propiedades fisicoquímicas del Bisfenol-A.....	21
Figura 3.4 Estructura y propiedades fisicoquímicas del 4-Nonilfenol	22
Figura 3.5 Estructura y propiedades fisicoquímicas del Triclosán.....	23
Figura 3.6 Ejemplo de un método SPE (adaptada de Arsenault, 2012).....	25
Figura 3.7 Acoplamiento de la cromatografía de gases a un espectrómetro de masas (Rodas, 2015)..	27
Figura 3.8 Representación esquemática de <i>S. cerevisiae</i> BLYES (Sanseverino et al., 2005).....	32
Figura 3.9 Esquema de reacción para la cloración de compuestos fenólicos (Rule et al., 2005).....	34
Figura 3.10 Reactividad del ozono en solución acuosa (modificado de Langlais et al., 1991).....	36
Figura 3.11 Estructuras de resonancia del ozono (modificado de Langlais et al., 1991)	36
Figura 4.1 Diagrama de la metodología empleada	41
Figura 4.2 Imágenes del muestreo 5.....	42
Figura 4.3 Curva teórica de la cloración a punto de quiebre (CONAGUA, 2007).....	44
Figura 4.4 Procedimiento HACH para el análisis de cloro libre.....	44
Figura 4.5 Sistema experimental de oxidación con ozono (Monje, 2010).....	45
Figura 4.6 Esquema de diluciones para determinar la actividad estrogénica en muestras de agua.....	50
Figura 4.7 Esquema para la preparación de diluciones del estándar 17 β - estradiol, utilizado como control positivo.....	51
Figura 4.8 Esquema para el llenado de las placas serológicas	52
Figura 5.1 Curva de punto de quiebre para la cloración	53
Figura 5.2 a) Reducción de las concentraciones de BPA, 4NP y TCS después de la cloración b) Porcentajes de remoción en cada caso	55
Figura 5.3 Montaje de los experimentos con ozono.....	56
Figura 5.4 Diagramas de Pareto para la remoción de BPA, 4NP y TCS	59
Figura 5.5 Gráficas de efectos principales para la remoción de BPA, 4NP y TCS.....	60
Figura 5.6 Gráficas de superficie de respuesta y contornos para la remoción de BPA, 4NP y TCS	61
Figura 5.7 Remoción de los contaminantes emergentes durante la ozonación.....	62
Figura 5.8 Concentraciones (a) y remociones (b) de los EDC con ozonación.....	63
Figura 5.9 Cromatogramas antes y después de cloración.....	65
Figura 5.10 Cromatograma antes y después de ozonación del BPA.....	66
Figura 5.11 Cromatograma antes y después de ozonación del 4NP.....	67
Figura 5.12 Cromatograma e iones m/z después de ozonación del TCS.....	68
Figura 5.13 Actividad estrogénica de las muestras de agua antes y después de la cloración y la ozonación	72

INTRODUCCIÓN

El término “Contaminantes emergentes” (CE) ha rondado la literatura científica durante los últimos 20 años, haciendo referencia a una amplia gama de compuestos presentes en el ambiente. Con frecuencia se entiende que dicha condición de “emergentes” se debe a su reciente introducción al ambiente, aunque esto no es necesariamente así, ya que el término emergente puede referirse al interés por el estudio de estos compuestos o los efectos que causan. A grandes rasgos, se entienden dos cosas por CE: aquellas sustancias, antropogénicas o de origen natural, presentes en el ambiente y que no están reguladas. Por lo tanto, no hay programas de monitoreo periódico en los que se les dé seguimiento, pero bien pueden ser incluidos en la legislación, dependiendo de los resultados de toxicidad y ecotoxicidad que arrojen las investigaciones. Otra definición válida puede referirse a aquellas sustancias cuyos probables efectos perjudiciales para la salud humana y/o el ambiente recientemente descubiertos hayan despertado el interés de su estudio (Gutiérrez, 2015).

Estos CE (normalmente detectados en niveles de partes por billón o trillón) comprenden una amplia gama de sustancias con toda clase de orígenes, tales como los desechos municipales e industriales, los plaguicidas y los fármacos excretados por el hombre y los animales y, con frecuencia, los productos de la degradación biológica de estas y otras sustancias (Durán, 2013). El destino final de los CE es el ambiente, de manera que se encuentran presentes en prácticamente todas las matrices posibles: el suelo, los cuerpos de agua, las plantas, los animales e incluso en el aire. La principal vía de ingreso de los micro-contaminantes al ambiente es el agua residual, la cual puede ser de origen doméstico, industrial, hospitalario y, en algunos casos, escorrentía de tierras agrícolas y drenajes de granjas de crianza intensiva de animales para consumo humano. El agua residual es una mezcla rica y compleja de contaminantes que incluye fármacos, antibióticos, productos de aseo y cuidado personal, químicos industriales, fertilizantes y plaguicidas, entre otros (Gutiérrez, 2015). Estas sustancias pueden causar efectos nocivos en los organismos expuestos, aún al encontrarse a niveles de trazas (Durán, 2013).

Uno de los efectos nocivos es que pueden actuar como compuestos disruptores endócrinos (EDC, por sus siglas en inglés). Según la Comisión de Comunidades Europeas los EDC son sustancias o mezclas de sustancias exógenas que alteran la función del sistema endócrino y, en consecuencia, causan efectos adversos sobre la salud en un organismo intacto, su descendencia o sus poblaciones (Hernández et al., 2010).

Cada vez son mayores las evidencias referentes a que los cuerpos de agua reciben cantidades tanto de químicos sintéticos (xenobióticos) como de químicos naturales que actúan como EDC, constituyéndose en una amenaza, no sólo para la salud general y reproductiva de los animales, sino para la salud humana. Las fuentes de EDC incluyen las descargas de alcantarillados municipales y de algunos efluentes industriales (Aranzazu et al., 2012).

Algunos de los EDC con más relevancia debido a su alto uso son el Bisfenol A (BPA), el 4-Nonilfenol (4NP) y el Triclosán (TCS). El BPA, usado en resinas epóxicas, plásticos policarbonados y sellantes dentales, tiene actividad estrogénica tanto en pruebas de proliferación celular in vitro como con células de cáncer de mama. Este compuesto se ha detectado en efluentes de alcantarillado y agua de desecho de sistemas sépticos a bajas concentraciones (0.13 - 3.6 µg/l) (Aranzazu et al., 2012). Productos de la biodegradación de los detergentes alquil-poliétoxilatos como el 4NP y el Octilfenol se han encontrado, igualmente, en efluentes de alcantarillados y agua de desecho de sistemas sépticos. Algunos alquilfenoles han mostrado su unión a receptores estrogénicos y estimulan una respuesta biológica similar a 17β-estradiol. Por otra parte, el TCS es un agente antimicrobiano y antifúngico de amplio espectro que no se elimina por completo del agua residual en las plantas de tratamiento y, por lo tanto, se detecta con frecuencia en el agua superficial que recibe sus efluentes. La estructura molecular del TCS se asemeja a la de varios estrógenos no esteroides, tales como dietilestilbestrol y Bisfenol-A, en el sentido de que contiene dos grupos funcionales fenol. Esto sugiere la posibilidad de actuar como un disruptor endócrino (Raut y Angus, 2009). Estudios en especies acuáticas y mamíferos también encontraron que el TCS influye en la función endócrina reproductiva. El informe, Estado de la ciencia de la disrupción endócrina-2012 por la OMS y el PNUMA (Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente), incluyó al TCS en la lista de posibles disruptores endócrinos (Wang y Tian, 2015).

Por otra parte, el desinfectante más ampliamente utilizado en todos los abastecimientos es el cloro y sus afines (hipoclorito sódico o dióxido de cloro) ya que garantiza un efecto desinfectante residual en la red de distribución. Los compuestos de cloro reaccionan con un sinnúmero de compuestos presentes en el agua como los aminoácidos, amoníaco, materia orgánica, hierro, manganeso y otros. De esta variedad de reacciones el resultado es una amplia gama de subproductos con potencial peligro para la salud como son los trihalometanos (THM), los ácidos haloacéticos (AHA), clorofenoles, halocetonas y las cloraminas. Otro oxidante empleado en el tratamiento de agua es el ozono, cuya principal característica es su poder oxidante, superior en mucho a cualquier compuesto de cloro. Tiene efecto residual escaso y la presencia de materia orgánica no supone riesgo de formación de subproductos indeseables, ya que degrada a las sustancias precursoras de los THM (Domenech, 2004).

Si el agua empleada para abastecimiento contiene BPA, 4NP y/o TCS, los procesos de tratamiento con ozono o cloro a los que con frecuencia se somete el agua, generarían subproductos de estos tres compuestos. Teniendo en cuenta que muchos EDC y posiblemente los subproductos de oxidación le pueden conferir estrogénicidad al agua, en el presente trabajo se evaluó la actividad estrogénica de estos subproductos en el agua de abastecimiento al ser tratada con ozono o cloro y se estableció el comportamiento de esta actividad estrogénica con respecto a la del agua con los compuestos originales sin oxidación. Para este análisis se utilizó la técnica BioLuminescent Yeast Estrogen Screen (BLYES).

1. OBJETIVOS

1.1 General

Evaluar la actividad estrogénica de los subproductos generados a partir de compuestos emergentes en agua de abastecimiento después de los procesos de oxidación con ozono o cloro.

1.2 Específicos

Determinar el contenido de BPA, 4NP y TCS en el agua del pozo de la Facultad de Química o en el agua fortificada, mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-MS).

Evaluar la eficiencia de oxidación con cloro y con ozono para remover: BPA, 4NP y TCS contenidos en el agua del pozo o en el agua fortificada.

Identificar los subproductos formados a partir de BPA, 4NP y TCS posterior a los procesos de oxidación, mediante GC-MS.

Evaluar el efecto en la actividad estrogénica de los subproductos formados a partir de los compuestos emergentes BPA, 4NP y TCS después de los procesos de oxidación, usando la metodología BLYES.

Hipótesis

Los procesos de oxidación con ozono y cloro tienen la capacidad de remover contaminantes emergentes de aguas naturales fortificadas y, además, permiten reducir o eliminar la actividad estrogénica proveniente de estos compuestos y de los subproductos formados durante los tratamientos de oxidación.

Alcances

- Los experimentos se llevaron a cabo a escala laboratorio.
- Se empleó agua natural fortificada proveniente del pozo de la Facultad de Química-CU.
- Se realizaron fortificaciones individuales al agua natural con cada uno de los compuestos de interés a un nivel de 1000 ng/l.

2. ANTECEDENTES

2.1 Contaminantes emergentes en México

Muñoz (2012) propuso una lista de 49 contaminantes de importancia potencial en México, en función de los volúmenes de uso, relevancia en la salud pública, interés en su acción toxicológica e interés científico por su mecanismo de acción. Estos contaminantes están divididos en cinco categorías: 1) esteroides y hormonas, 2) productos para el cuidado personal, 3) industriales, 4) fármacos y 5) antibióticos. Dentro de la categoría industriales se incluyen el Bisfenol-A y los Nonilfenoles y dentro de productos para el cuidado personal está incluido el Triclosán.

En México se han estudiado contaminantes emergentes en diferentes matrices. Peña-Álvarez y Castillo-Alanís (2015) identificaron y cuantificaron contaminantes emergentes (incluyendo BPA y TCS) en agua residual de tres plantas de tratamiento de la Ciudad de México: Cerro de la estrella, Coyoacán y CU, comparando sus concentraciones en influentes y efluentes. Para el BPA, la mayor concentración se presentó en el influente de la planta Coyoacán (4 ng/ml). Para el caso del TCS, esperaban que estuviese presente en mayor concentración ya que se encuentra en una amplia gama de productos para el cuidado personal, sin embargo, mencionan que se debe considerar que el TCS puede ser parcialmente degradado por microorganismos o reaccionar con la luz solar dando lugar a compuestos entre los cuales se encuentran clorofenoles y dioxinas. Para el TCS la mayor concentración se presentó en el influente de la planta Cerro de la estrella (10 ng/ml).

En otro estudio, se encontró BPA, 4NP y TCS en agua subterránea, en este caso tanto las frecuencias de detección como las concentraciones más altas (10, 47 y 345 ng/l, respectivamente) de los microcontaminantes se encontraron en pozos situados al norte de la Ciudad de México. La mayor incidencia y concentración de estos microcontaminantes orgánicos en pozos ubicados al norte de la ciudad coincide con la ruta seguida por los tres grandes túneles utilizados para extraer agua residual del Valle de la Ciudad de México. Esto sugiere que la filtración de agua residual de los alcantarillados puede ser la principal fuente de contaminantes orgánicos del acuífero. En cuanto al agua superficial (presas), también se encontró BPA, 4NP y TCS, pero en concentraciones mayores a las del agua subterránea, lo cual se debe a que el agua superficial está más expuesta a la contaminación. La presencia de estos microcontaminantes orgánicos en fuentes de agua implica que pueden alcanzar el agua del grifo si no se tratan adecuadamente el agua superficial y subterránea. La cloración es el método más común para tratar el agua potable antes de su distribución a la población de la Ciudad de México. Sin embargo, este método no garantiza la eliminación completa de los microcontaminantes orgánicos en agua, además, es importante considerar que una gran variedad de subproductos están formados por reacciones de oxidación de contaminantes orgánicos con cloro (Félix-Cañedo et al., 2013).

Un ejemplo destacado de reutilización de agua residual en la agricultura que ha dado lugar a la recarga de acuíferos se produce cerca de la Ciudad de México, una de las mega ciudades del mundo. La ciudad genera más de 52 m³/s de agua residual cruda que es descargada en su mayoría sin tratamiento al Valle de Tula en el Estado de Hidalgo al norte de la ciudad, donde el agua se distribuye a través de un sistema de canales y presas de almacenamiento para regar tierras agrícolas. Los acuíferos bajo el Valle están siendo infiltrados con agua residual, pero no se han observado efectos adversos en la población local a pesar de que han extraído el suministro de agua de estos mismos acuíferos por más de 40 años. Las concentraciones de TCS (320-1821 ng/l) y BPA (432-3177 ng/l) encontradas en el agua residual están en el intervalo de influentes vistos en otros países, mientras que la concentración de 4NP (5847-33798 ng/l) fue notablemente alta. En el agua infiltrada se encontraron estos tres compuestos esporádicamente y en muchas más bajas concentraciones que en los canales de distribución para riego. Por ejemplo, de 36 mediciones, 4NP se registró sólo en un pozo, BPA en 6, y TCS en 10 (Chávez et al., 2011).

Gibson et al. (2007) desarrollaron un método analítico para la determinación de fármacos ácidos, potenciales disruptores endócrinos (incluyendo BPA, 4NP y TCS) y dos plaguicidas. Para la validación del método utilizaron dos aguas representativas, agua de manantial y agua residual no tratada. Las muestras fueron fortificadas con los analitos objetivo al menos en dos concentraciones. Con el método desarrollado estudiaron muestras de agua residual del emisor central y muestras del manantial Cerro Colorado. Algunos de los analitos fueron detectados en el agua de manantial, aunque las concentraciones fueron varios órdenes de magnitud por debajo de las observadas en el agua residual, lo que sugiere que la mayoría de los contaminantes fueron eliminados al pasar a través del suelo y subsuelo.

En la zona lacustre de Xochimilco también se han estudiado disruptores endócrinos (como BPA y TCS). Para el caso del TCS no se encontraron diferencias significativas en su concentración en época de lluvias y de secas, mientras que para el BPA se encontró mayor concentración en época de lluvias, lo cual puede ser debido a escurrimientos que llegan directamente a los canales (Díaz, 2009).

En la Tabla 2.1 se muestra un resumen de los estudios realizados en México sobre contaminantes emergentes y sus resultados. Sin embargo, en el país parece no haber estudios sobre los subproductos de oxidación generados al ozonar o clorar el agua que contiene estos contaminantes.

Tabla 2.1 Estudios sobre contaminantes emergentes (BPA, 4NP y TCS) en México, ng/l

Muestras		BPA	4NP	TCS	Autores
Agua residual Cerro de la estrella	Influyente	210 – 2460	-	870 – 10090	Peña-Álvarez y Castillo- Alanís, 2015
	Efluente	NC - 410	-	80 – 7330	
Agua residual Coyoacán	Influyente	810 – 4270	-	2500 – 9340	
	Efluente	20 - 70	-	320 - 2630	
Agua Residual CU	Influyente	ND – 810	-	910 – 1590	
Agua Subterránea		1 - 10	1 - 47	1 - 345	
Agua Superficial		7	89 - 655	16 - 19	
Agua residual	Secas	432 - 2809	17064 - 33798	341 - 1821	Chávez et al., 2011
	Lluvias	635 - 3177	5847 - 6970	320 - 432	
Pozo	Secas	<LD - 5.1	<LD	<LD - 4.9	Gibson et al., 2007
	Lluvias	<LD - 153	<LD - 67	<LD - 2.4	
Agua de manantial		0.4 - 0.41	1.8 - 8	1.12 - 1.3	
Agua residual		770 - 2500	11000 - 22400	660 - 2040	
Zona lacustre Xochimilco		0 - 150	-	1 - 87	Díaz, 2009

ND: no detectado

NC: no cuantificado

LD: límite de detección

2.2 Oxidación de contaminantes emergentes y subproductos

2.2.1 Bisfenol-A (BPA)

Este compuesto químico es considerado disruptor endócrino. Durante la producción y el transporte de agua potable, la migración de BPA del plástico al agua puede representar una importante fuente de exposición humana al contaminante tóxico. La cloración no es un proceso eficiente para remover la actividad estrogénica que genera (Deborde et al., 2008). Estudios realizados sobre la cloración de BPA demostraron que, como se esperaba por su estructura fenólica, reacciona fuertemente con el cloro conduciendo a la formación de congéneres de BPA

clorados. También se encontró la formación de fenoxifenoles policlorados en una solución de BPA clorada. Se determinó que el BPA desaparecía de la solución en pocos minutos hasta 1 hora con dosis de cloro que variaban de 1-10 mg/l como Cl_2 . Sin embargo, se encontró que la afinidad de unión del BPA acuoso clorado a 60 minutos era 24 veces mayor que antes de la cloración, lo que sugiere que la solución de BPA clorada tiene la capacidad para imitar el efecto de la hormona estrógeno. Los resultados sugieren que la actividad estrogénica aumentaría cuando el agua que contiene BPA es clorada (Hu et al., 2002), aunque la actividad estrogénica específica de los congéneres clorados de BPA no ha sido claramente identificada (Gallard et al., 2004). Por otra parte, Yamamoto y Yasuhara (2002) mencionan que se podría asumir que la halogenación de BPA debilita un poco sus propiedades estrogénicas. La Figura 2.1 muestra el esquema de reacción de la cloración del BPA propuesto por Yamamoto y Yasuhara (2002).

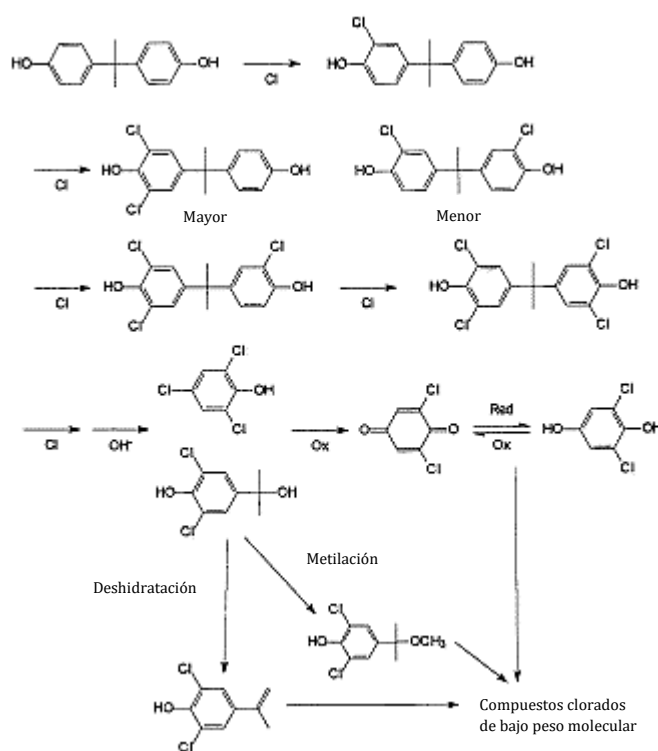


Figura 2.1 Esquema de reacción de la cloración del BPA (Yamamoto y Yasuhara, 2002)

Para el caso del ozono, se reportan cinco productos de transformación principales en la ozonación de agua que contiene BPA. Las estructuras químicas son consistentes con catecol, ortoquinona, derivados del ácido mucónico de BPA, benzoquinona y 2-(4-hidroxifenil)-propan-2-ol. La vía de reacción puede implicar sustitución electrofílica o cicloadición 1,3-dipolar. Para una concentración inicial de $100 \mu\text{M}$, se requirió una concentración de ozono 4 - 4.5 veces más alta para su remoción completa ($400\text{-}450 \mu\text{M O}_3$) y con un pequeño incremento en esta dosis ($>570 \mu\text{M O}_3$) fue posible una degradación completa de los subproductos de BPA principales (Deborde et al., 2008). Garoma et al. (2010), utilizaron una concentración inicial de BPA de $51 \mu\text{M}$ y ozono de 10 mg/l a un flujo de 1.17 l/min . La concentración residual de BPA estuvo por

debajo del límite de detección del método ($0.02 \mu\text{M}$) después de cinco minutos de ozonación. Kusvuran y Yildirim (2013) probaron 3 diferentes pH: 3, 7 y 10 con una solución de BPA de 0.509 mM , encontrando una degradación de BPA del 99.5%, 87% y 94%, respectivamente. La Figura 2.2 muestra el esquema de reacción de la ozonación del BPA propuesto por Kusvuran y Yildirim (2013).

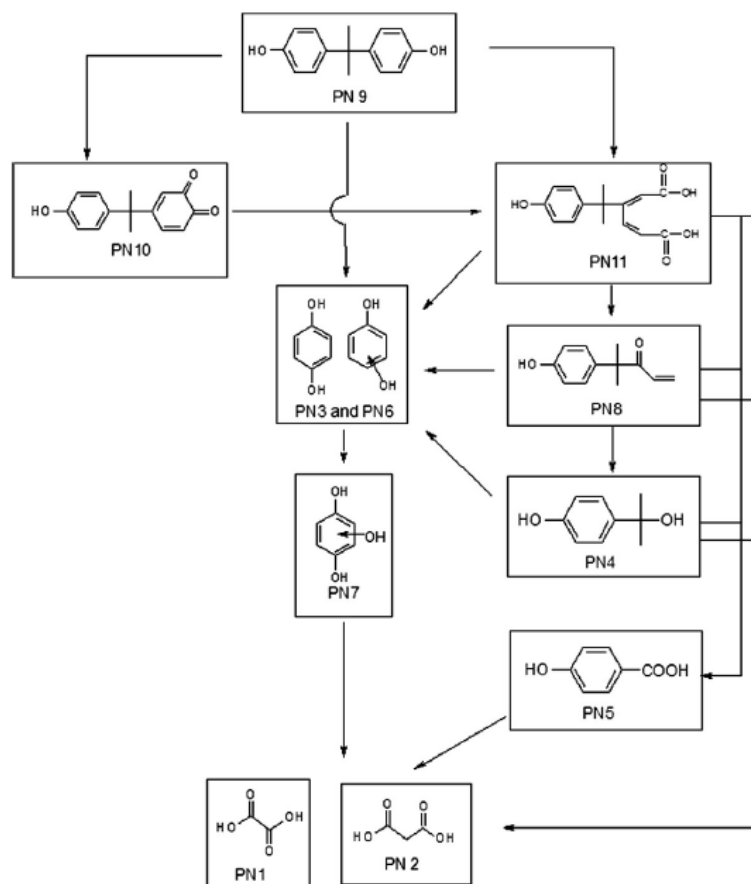


Figura 2.2 Esquema de reacción de la ozonación del BPA (Kusvuran y Yildirim, 2013)

2.2.2 4-Nonilfenol (4NP)

Se ha demostrado que el 4NP es un disruptor endócrino para los organismos acuáticos, especialmente los peces que están en contacto con el agua residual. Recientemente, una serie de pruebas genéticas han demostrado la capacidad de disrupción endócrina no sólo de 4NP sino también de sus productos halogenados, 4NPCL1 y 4NPCL2. Para diferentes dosis de cloro, se encontró la formación de mono-cloronilfenol MCNP, dicloro-nonilfenol D₂CNP, 4NP (dímeros) y 4-Cl NP (dímeros) (Thurman, 2006). Hu et al. (2002b) encontraron 7 productos de reacción del 4NP en agua a diferentes tiempos de cloración: 2-cloro-4-nonilfenol, 2,6-dicloro-4-nonilfenol, triclorofenol, 4-propil-29-hidroxifenol, 4-isoamil-29-hidroxifenol, 4-isobutil-29-hidroxifenol y 4-isopentil-29-hidroxifenol. Los resultados sugieren que algunos productos en la

solución de 4NP clorada actúan antagonizando la inducción de la β -galactosidasa. La acción de 4NP como antagonista parcial se ha encontrado en ratas hembra tratadas en combinación con estradiol. La Figura 2.3 muestra el esquema de reacción de la cloración del 4NP propuesto por Hu et al. (2002b).

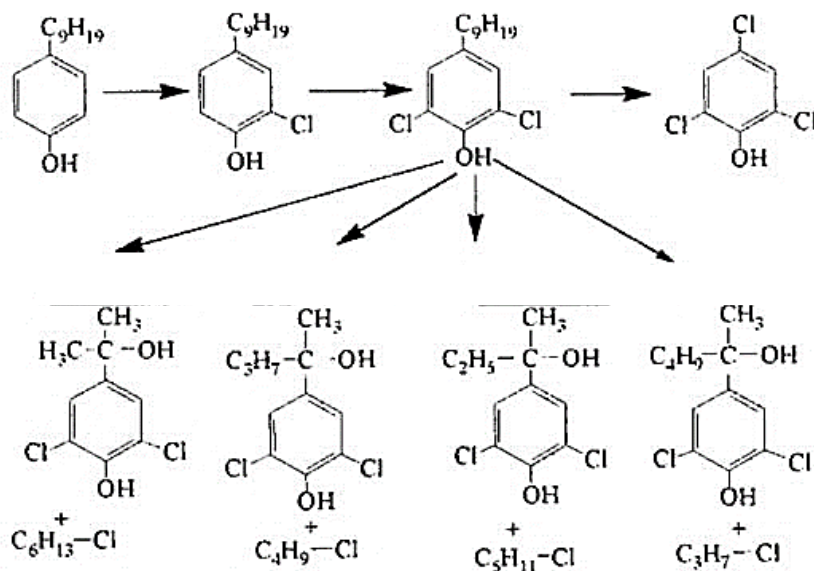


Figura 2.3 Esquema de reacción de la cloración del 4NP (Hu et al., 2002b)

Para el caso del ozono, Sun et al. (2008) estudiaron la relación entre los productos de ozonación del 4NP y su actividad estrogénica. Identificaron la formación de mezclas de homólogos de 4-nonilbenzoquinona, 4-nonilcatecol y compuestos carboxílicos. Las mezclas de 4-nonilcatecol tuvieron mayor actividad estrogénica, mientras que las mezclas de 4-nonilbenzoquinona tuvieron menor actividad estrogénica que 4NP. Lograron eliminar el 4NP, los subproductos y sus actividades estrogénicas mediante ozono. En el tratamiento de agua residual y agua potable, la eliminación de la actividad estrogénica derivada de los NP y sus productos de ozonación fue potenciada por la adición de ácido húmico, el cual puede reaccionar con el ozono para generar radicales.

2.2.3 Triclosán (TCS)

Raut y Angus (2010) indican que el TCS tiene potencial para actuar como disruptor endócrino. Esto se apoya en la observación de que, en ensayos *in vitro*, el TCS desplazó el estradiol de receptores de estrógeno en las células de cáncer de mama humano. En células de rata, el TCS redujo la producción de testosterona mediante la inhibición de la actividad de adenilil ciclasa. Además, en su estudio demostraron que el TCS actúa como disruptor endócrino para organismos acuáticos especialmente en peces machos de la especie *Gambusia affinis*, en los cuales indujo

la expresión del gen vitelogenina e inhibió la producción de esperma. Finalmente mencionan que, alarmantemente, el TCS ha sido detectado en la leche humana, plasma y orina, lo que indica que los seres humanos están acumulando este potencial disruptor endócrino.

Hace varios años Onodera et al. (1987) y Kanetoshi et al. (1987) demostraron que el TCS puede ser clorado para producir éteres difenólicos tetra- y penta-hidroxilados (normalmente denominados tetra- y pentaclosan) así como 2,4-diclorofenol y 2,3,4-triclorofenol. Por su parte, Rule et al. (2005), reevaluaron la importancia de esos procesos confirmando la formación de todos los subproductos presentados anteriormente con la excepción del 2,3,4-triclorofenol. Canosa et al. (2005), demostraron que a pH cercanos al neutro (7.3 y 8.3), la estabilidad del TCS fue muy baja, concentraciones de Cl menores a 1 mg/l fueron suficientes para su degradación. Con pH más altos y más bajos que el neutro, el TCS tuvo más estabilidad. Emplearon una concentración de TCS de 9 ng/ml para analizar el efecto del pH, mencionando que esta concentración empleada es del mismo orden que las concentraciones medidas en muestras reales de agua contaminada. Además, indican que la formación de subproductos del TCS persistentes y tóxicos debe tenerse en cuenta durante la cloración de agua residual tratada que normalmente todavía contiene una cierta cantidad de TCS. La Figura 2.4 muestra el esquema de reacción de la cloración del TCS propuesto por Buth et al. (2011).

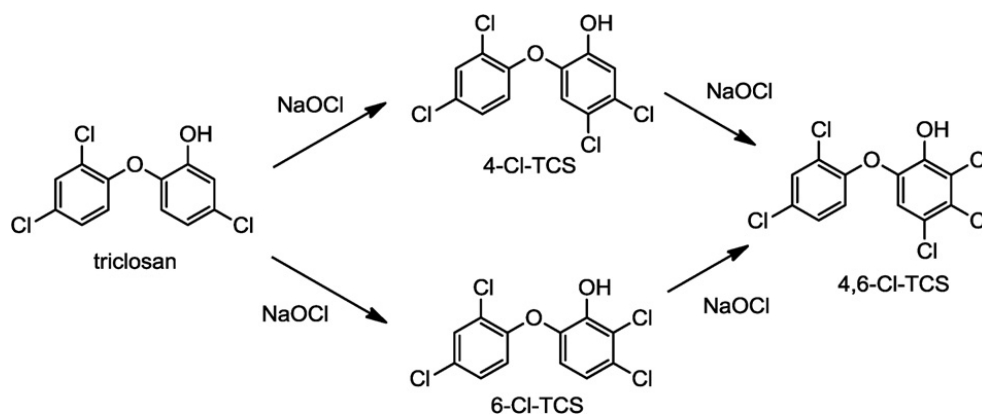


Figura 2.4 Esquema de reacción de la cloración del TCS (Buth et al., 2011)

Chen et al. (2012) estudiaron la eliminación de TCS por ozono y los productos de degradación formados durante la ozonación. Encontraron que el TCS puede ser removido completamente del agua mediante ozono e identificaron los siguientes productos de transformación durante el proceso de tratamiento: 2,4-diclorofenol, clorocatecol, mono-hidroxi-triclosán y di-hidroxi-triclosán. Mencionan que un aumento en las concentraciones de ozono en las reacciones, conduce a una disminución de la concentración de triclosán, así como de sus subproductos de oxidación.

A continuación se mencionan algunas condiciones analíticas encontradas en la literatura para la identificación de subproductos de oxidación:

Hu et al. (2002) caracterizaron los subproductos clorados de BPA mediante las técnicas APCI/LC/MS. Además, mencionan que lograron la separación cromatográfica de los componentes de la solución acuosa clorada añadiendo ácido acético al 0.1% a la fase móvil para suprimir la disociación de los productos.

Zafra et al. (2003) mencionan que la volatilidad y la estabilidad térmica presentadas por el BPA y sus derivados del cloro los hacen adecuados para la detección por GC-MS. Para mejorar la selectividad, la sensibilidad y el rendimiento de las propiedades cromatográficas obtenidas cuando se inyectan analitos directamente, realizaron una etapa de derivatización con N,O-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA).

Hu et al. (2002b) utilizaron GC-MS para analizar los subproductos clorados de 4NP y encontraron que los subproductos que predominan a los 10 minutos de cloración son MCNP y DCNP.

Thurman (2006) empleó las técnicas LC/TOF-MS y determinó que a la dosis más baja de NaOCl (1 ppm) los productos principales fueron MCNP y DCNP, sin embargo, estos productos representan apenas aproximadamente el 2% del total de 4NP después de un periodo de reacción de 3 horas.

Canosa et al. (2005) usaron GC-MS para analizar los subproductos clorados de TCS, derivatizando previamente los analitos con MTBSTFA.

La Tabla 2.2 muestra los resultados obtenidos en varios estudios realizados en diferentes partes del mundo, para la cloración y ozonación de agua que contiene BPA, 4NP y TCS.

Tabla 2.2 Subproductos encontrados en la literatura para la cloración y ozonación de BPA, 4NP y TCS

Cloración				
Compuesto emergente	Tipo de muestra	Concentraciones	Subproductos encontrados	Autores / País
BPA	Agua sintética fortificada pH 8	BPA: 5 μ M (1.14mg/l) Cl: 38 μ M (2.7 mg/l)	MonocloroBPA DicloroBPA TricloroBPA TetracloroBPA	Gallard et al., 2004 Francia
BPA	Agua sintética fortificada pH 8-9	BPA: 4.45 mg/l 4.91 mg/l Cl: 1.03 mg/l 2.07 mg/l 5.12 mg/l 10.24 mg/l	MCBPA D ₂ CBPA T ₃ CBPA T ₄ CBPA Al continuar la cloración, la degradación de los subproductos clorados forman compuestos fenólicos (figura 2.1)	Yamamoto y Yasuhara, 2002 Japón
BPA	Agua sintética fortificada pH 7.5	BPA: 500 μ g/l Cl: 1.46 mg/l	MCBPA D ₂ CBPA T ₃ CBPA T ₄ CBPA Triclorofenol 4-isopropil-2-hidroxilfenol 6 tipos de fenoxifenoles policlorados (PCPPs)	Hu et al., 2002 China
BPA	Agua sintética fortificada pH 7.5	BPA: 1 mg/l Cl: 1, 2 y 5 mg/l	MCBPA D ₂ CBPA T ₃ CBPA T ₄ CBPA Triclorofenol	Li et al., 2016 China
4NP	Agua sintética fortificada pH 7.5	4NP: 0.5 mg/l Cl: 1.3 mg/l	MCNF D ₂ CNF T ₃ CF 4-Propil-2-Hidroxilfenol 4-Isobutil-2-Hidroxilfenol 4-Isoamil-2-Hidroxilfenol 4-Isopentil-2-Hidroxilfenol	Hu et al., 2002b China

Compuesto emergente	Tipo de muestra	Concentraciones	Subproductos encontrados	Autores / País
4NP	Agua sintética fortificada pH 7.5 ±0.5	4NP: 100 ng/ml Cl: 1 mg/l 10 mg/l 100 mg/l *	MCNF D ₂ CNF 4NP (dímeros)* 4-Cl NP (dímeros)*	Thurman, 2006 España
TCS	Agua sintética fortificada pH 7.3 Agua de grifo Agua residual no tratada	TCS: 12 ng/ml Cl: 0.4 mg/l 1.4 mg/l TCS: 50 ng/ml Cl: 0.43 mg/l	2,4-Diclorofenol 2,4,6-Triclorofenol Tetraclosan I Tetraclosan II Pentaclosan TCS, 2,4-DCF y 2,4,6-TCF (todas las muestras) Tetraclosan I, Tetraclosan II y Pentaclosan (algunas)	Canosa et al., 2005 España
TCS	Agua sintética fortificada	TCS: 0.72 – 8.0 mg/l Cl: 0.192 - 1.77 mg/l	4-Cl-TCS 6-Cl-TCS 4,6-Cl-TCS 2,4-Diclorofenol 2,4,6-Triclorofenol (con exceso de cloro libre) Cloroformo	Rule et al., 2005 USA
TCS	Agua sintética fortificada	TCS: 0.347 mM (100.5 mg/l) Cl: 20 equiv./mol de compuesto	2,4-Diclorofenol 2,3,4-Triclorofenol 4-Cl-TCS 6-Cl-TCS 4,6-Cl-TCS	Onodera et al., 1987 Japón
Ozonación				
Compuesto emergente	Tipo de muestra	Concentraciones	Subproductos encontrados	Autores / País
BPA	Agua sintética fortificada pH 6.5	BPA: 100 µM (22.8 mg/l) O₃: 15-400 µM	Catecol Ortoquinona Derivados del ácido mucónico Benzoquinona 2- (4-hidroxifenil)-propan-2-ol	Deborde et al., 2008 Francia

Compuesto emergente	Tipo de muestra	Concentraciones	Subproductos encontrados	Autores / País
BPA	Agua sintética fortificada pH 7	BPA: 51 µM (11.6 mg/l) O₃: 10 mg/l 1.17 l/min (flujo constante)	Catecol Resorcinol Acetona Formaldehido Ácidos orgánicos: ácido acético, fórmico, málico y oxálico	Garoma et al., 2010 USA
BPA	Agua sintética fortificada pH 3, 7 y 10	BPA: 0.051 – 0.509 mM (11.6-116.2 mg/l) O₃: 0.239 mmol/min 720 ml/min (flujo constante)	Ácido oxálico y malónico 1,2-dihidroxibenceno 2-(p-hidroxifenil)-2-propanol Ácido 4-hidroxibenzoico 1,4-dihidroxibenceno Trihidroxibenceno 4-(p-hidroxifenil),4,4-dimetil,-1-buten-3-on 4-(2-(4-hidroxifenil)propan-2il)ciclohexa-3,5-diene-1,2-diona Ácido (2E,4Z)-3-(2-(4-hidroxifenil)propan-2-il)hexa-2,4-dienedioico	Kusvuran y Yildirim, 2013 Turquía
4NP	Agua sintética fortificada pH 6.3	4NP: 0.4 mg/l 4 mg/l O₃: 1.5 mg/l	Homólogos de 4-nonilbenzoquinona Homólogos de 4-nonilcatecol Compuestos carboxílicos	Sun et al., 2008 China
TCS	Agua sintética fortificada pH 7± 0.5	Relación molar TCS:O₃ 1:1 (4.5:1.1 mg/l) 1:3 (2.9:1.42 mg/l) 1:5 (1.4:1.72 mg/l) 0.5 l/min O ₃ (flujo constante)	2,4-diclorofenol Clorocatecol Mono-hidroxi-triclosán Di-hidroxi-triclosán	Chen et al., 2012 Dinamarca

2.3 Actividad estrogénica en agua

La creciente incidencia de algunos tipos de cáncer, los daños a los sistemas reproductivos y los problemas de desarrollo, tanto en seres humanos como en la vida silvestre, han causado preocupación por la ubicuidad de los contaminantes ambientales que imitan inadvertidamente las actividades biológicas de la hormona femenina (estrógeno). Routledge y Sumpter (1996) reportan que se ha encontrado una amplia gama de productos químicos, tanto naturales como artificiales, que son débilmente estrogénicos.

En diferentes partes del mundo se ha analizado la actividad estrogénica del agua empleando técnicas *in vitro* e *in vivo*. En Brasil, emplearon el bioensayo *in vitro* Yeast Estrogen Screen (YES) para analizar la actividad estrogénica en muestras de agua de río. Posteriormente encontraron que dosis de ozono de 1 y 2 mgO₃/l fueron adecuadas para reducir la actividad estrogénica de 5 y 2.5 ng/l a un valor promedio de 0.3 ng/l de equivalentes de 17 β-estradiol (EEQ). La cloración también fue eficaz en la eliminación de la estrogénicidad usando dosis de 1.5 y 3.2 mgCl₂/l. Sin embargo, se obtuvo un mejor resultado combinando una dosis baja de ozono (0.5 mgO₃/l) con una dosis baja de cloro (1.5 mgCl₂/l). Esta condición condujo al nivel estrogénico residual más bajo en el agua (0.1 ng/l). Así, la combinación de cloración y ozonación parece ser una alternativa interesante para eliminar la estrogénicidad y reducir el uso de oxidantes (Vieira et al., 2015).

En Japón (Kuruto-Niwa et al., 2005) concluyeron que varios compuestos relacionados con 4NP y Octilfenol (OP) mostraron actividad estrogénica. Sin embargo, los derivados clorados utilizados en este estudio mostraron una actividad estrogénica más débil que sus productos químicos originales. Por ejemplo, el cloronilfenol (CINP) mostró una actividad estrogénica ligeramente inferior a la del NP original y el dicloronilfenol (Cl₂NP) mostró una actividad estrogénica 10 veces menor que la del NP original.

En Suiza (Huber et al., 2004) emplearon la técnica Recombinant Yeast Estrogen Screen (YES) para analizar agua sintética fortificada con 17α-etinilestradiol (EE2) y demostraron que las dosis de O₃ típicamente aplicadas (alrededor de 1 mgO₃/l) para la desinfección del agua potable eran suficientes para reducir la estrogénicidad en un factor de más de 200. Sin embargo, les resultó imposible eliminar completamente la actividad estrogénica debido a la lenta reaparición de 0.1 a 0.2% de la concentración inicial de EE2 después de la ozonación.

En China (Wang et al., 2011) demostraron la presencia de compuestos con actividad estrogénica en el sistema del río Liao utilizando análisis químicos y biológicos (YES) combinados. Encontraron que estos compuestos estrogénicos tienen tendencia a adsorberse en el sedimento debido a su carácter hidrófobo moderado. Concluyen que deben tomarse medidas adecuadas para reducir la descarga de efluentes que contienen compuestos estrogénicos en el sistema fluvial para proteger a los organismos acuáticos de los ríos.

En México (Vega-López et al., 2007) realizaron un estudio *in vivo* evaluando los efectos estrogénicos y antiestrogénicos en la especie endémica de peces en peligro de extinción *Girardinichthys viviparus*, causados por el agua de los lagos Texcoco y Zumpango, los cuales son alimentados por agua residual tratada a nivel secundario que contiene varios productos químicos disruptores endócrinos como bifenilos policlorados. También realizaron estudios *in vitro* utilizando el ensayo con células MCF-7. El agua de ambas localidades produjo efectos estrogénicos y antiestrogénicos, aunque fue mayor para el agua del lago Texcoco. Debido a los efectos estrogénicos observados, concluyen que es esencial mejorar el tratamiento del agua que alimenta estas localidades existentes, porque no es posible omitir el potencial efecto adverso que las contaminaciones estrogénicas podrían causar en el desarrollo de la población y de las especies acuáticas.

De igual forma, en México (Torres-Duarte et al., 2012) estudiaron el uso potencial de la enzima lacasa de *Coriopsis gallica* inmovilizada para el tratamiento de aguas contaminadas con productos químicos disruptores endócrinos, especialmente los utilizados para la acuicultura. Encontraron que la lacasa de *C. gallica* es capaz de transformar eficientemente BPA, 17 β -estradiol (E2), NP y TCS en material polimérico, transformación que elimina su afinidad por el ER α tanto del humano como del pez cebrá y por lo tanto el uso de lacasa inmovilizada tiene el potencial de ser utilizada para la eliminación de la actividad estrogénica de los contaminantes encontrados en el agua utilizada para la acuicultura.

La mayoría de estos xenoestrógenos tienen poco parecido estructural con los estrógenos naturales. Por lo tanto, es actualmente imposible predecir si un producto químico es estrogénico basado solamente en la estructura química. Se requiere pues, un método analítico apropiado para analizar la actividad estrogénica, como lo es la técnica BioLuminescent Yeast Estrogen Screen (BLYES).

2.4 BioLuminescent Yeast Estrogen Screen (BLYES)

Sanseverino et al. (2005) desarrollaron la técnica de BLYES en Estados Unidos para determinar actividad estrogénica. Para ello emplearon una bacteria “reportera” cultivada en una cepa recombinante de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, este bioreportero bioluminiscente responde a compuestos con actividad estrogénica. Para la validación de la técnica hicieron comparaciones con la técnica colorimétrica YES que es ampliamente usada, encontrando respuestas y límites de detección muy similares. La ventaja de la técnica de BLYES es que en ella se observa bioluminiscencia en sólo una hora alcanzando su máximo en seis horas, mientras que con YES se requieren mínimo tres días para tener los resultados. La cepa BLYES proporciona un análisis rápido y eficiente de la estrogenicidad y puede utilizarse para monitoreo remoto, casi en tiempo real, de los compuestos químicos con actividad estrogénica en el medio ambiente.

El mismo autor, en el año 2009, aplicó la técnica para evaluar la reproducibilidad y utilidad de la cepa BLYES en el análisis de 68 sustancias químicas con actividad estrogénica conocida, identificadas por el Comité Coordinador Interagencial sobre la Validación de Métodos Alternativos (ICCVAM, por sus siglas en inglés), con el objetivo de validar el ensayo *in vitro*. Los resultados demostraron que este ensayo es aplicable en el monitoreo rápido de la actividad de disrupción endócrina de sustancias químicas desconocidas en el agua, que pueden requerir caracterizaciones adicionales.

Por su parte, Bergamasco et al. (2011) emplearon esta técnica en Brasil para evaluar la estrogenicidad de agua cruda y tratada con diferentes grados de contaminación. BLYES mostró ser más sensible que el análisis químico (cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem) para la evaluación de la calidad del agua. Los autores concluyen que es una herramienta adecuada para el monitoreo del agua ya que es fácil de realizar, relativamente económica y adecuada para análisis de alto rendimiento. Por lo tanto, es una buena opción en los estudios de monitoreo de agua que permite analizar un gran número de muestras y seleccionar sólo los positivos para el análisis químico y la identificación de fuentes de contaminación.

En China Ruan et al. (2015) evaluaron la estrogenicidad de varias especies de Bisfenol y su contribución estrogénica a los lodos obtenidos del tratamiento de agua residual, usando BLYES. El orden en las actividades estrogénicas encontradas fue: Bisfenol-AF > Tetracloro-BPA > Bisfenol-F > BPA > Bisfenol-E > Tetrabromo-BPA > Dihidroxibenzofenona > Bisfenol-S.

Debido a que se ha demostrado que esta técnica es adecuada para el análisis de muestras de agua, se utilizó para medir la carga de estrogenicidad que la fortificación con EDC (BPA, 4NP y TCS) le aporta al agua de pozo, así como el efecto que tienen los procesos de oxidación con ozono y cloro en este parámetro.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Contaminantes emergentes (CE)

Con el desarrollo de la tecnología se han producido muchos compuestos químicos sintéticos, lo que ha generado un incremento en el número de contaminantes que son considerados un potencial amenazador para el ambiente y todo organismo vivo. Hoy en día se habla de contaminantes emergentes refiriéndose a productos farmacéuticos, del cuidado personal, surfactantes, aditivos industriales, plastificantes, plaguicidas y una gran variedad de compuestos químicos que alteran las funciones endócrinas (Kuster et al., 2008).

El término compuesto disruptor-endócrino define un conjunto diverso y heterogéneo de compuestos químicos capaces de alterar el equilibrio hormonal (USEPA, 1997). Los disruptores endócrinos, como los productos químicos estrogénicos, son introducidos en el medio acuático por la actividad humana, tanto doméstica como industrial. En los países desarrollados, los efluentes de las plantas de tratamiento de agua residual municipal son la principal fuente de productos químicos estrogénicos en aguas naturales, ya que estas sustancias no se eliminan por completo en los procesos de tratamiento convencionales. En los países en desarrollo, el problema parece ser más agudo, ya que el agua residual sin tratamiento previo es comúnmente liberada al medio ambiente y esta es sin duda la principal fuente de compuestos estrogénicos en el agua superficial (Estrada et al., 2013).

El sistema hormonal o endócrino regula diversos procesos en todos los organismos en respuesta a estímulos ambientales y fisiológicos. Este sistema está formado por glándulas que liberan las hormonas (mensajeros químicos); estas últimas se distribuyen por el torrente sanguíneo hasta llegar a sus receptores que se localizan en diversos órganos y tejidos. Muchos procesos como el desarrollo, el crecimiento, la maduración, la reproducción y el balance de agua y de iones están bajo regulación endócrina (Guzmán y Ramirez, 2012).

Los compuestos químicos que causan disrupción endócrina (EDC) pueden interferir en la biosíntesis, transporte, metabolismo o en la unión a los receptores a nivel celular (Guzmán y Ramirez, 2012). El EDC puede dañar las glándulas que producen hormonas de las siguientes maneras: induciendo muerte celular, alterando directamente la respuesta funcional específica y la producción hormonal y alterando su patrón general de síntesis y metabolismo (tiempo y estructura). Los mecanismos de acción de los alteradores endócrinos se muestran en la Figura 3.1. El literal (a) indica una respuesta normal de la célula, cuyo receptor celular se une a la hormona y produce la respuesta adecuada en el momento adecuado. Algunas sustancias químicas pueden mimetizar o bloquear el sitio receptor de la célula interrumpiendo la respuesta normal de una hormona (b). Se genera una reacción más débil de lo normal cuando un análogo se une al receptor y se produce una respuesta menor, en el momento inadecuado, o se pueden producir hormonas que son degradadas más rápidamente que la manera usual (antagonista) (c).

Se puede también generar una reacción más potente cuando un imitador de la hormona se une al receptor y se produce una respuesta exagerada en el momento inadecuado (agonista) (d). (Guzmán y Ramírez, 2012).

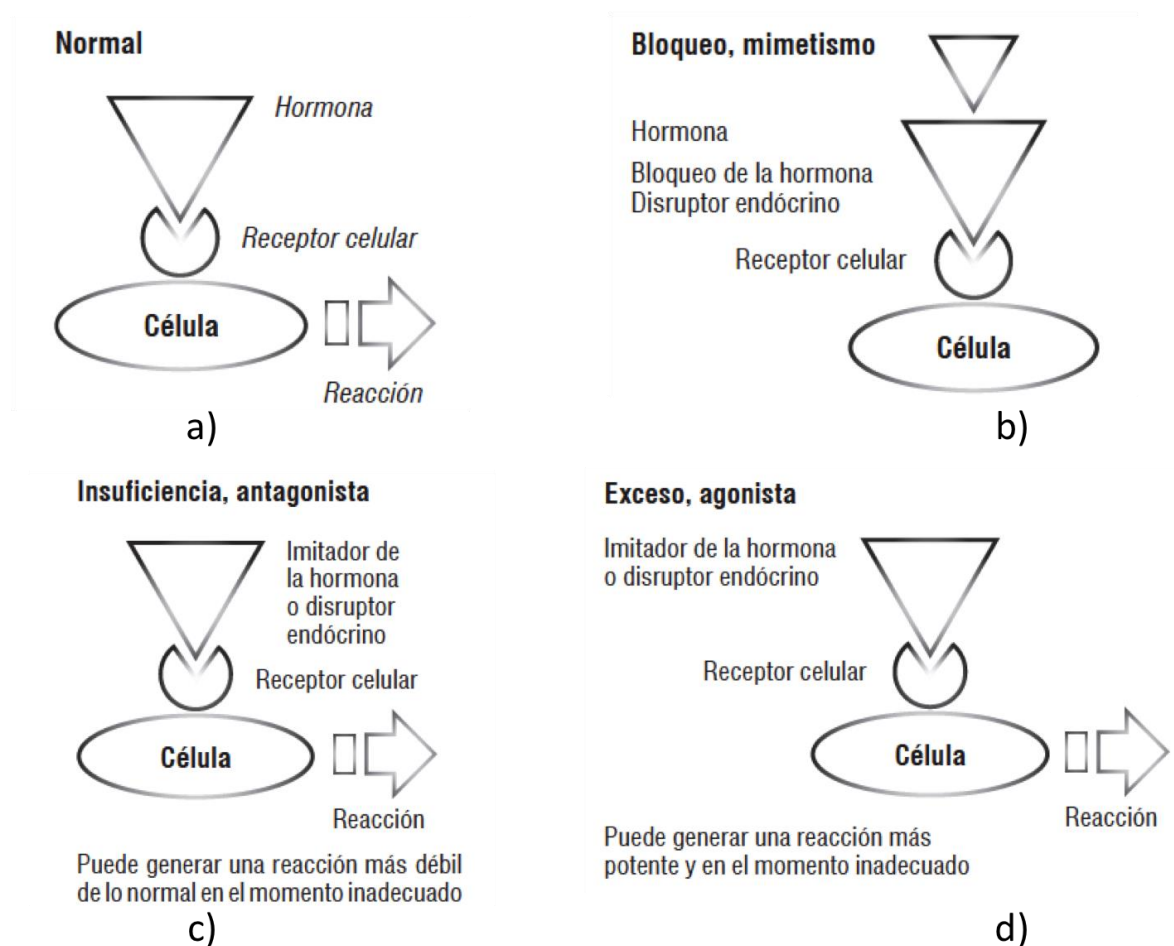


Figura 3.1 Mecanismos de acción de los EDC. a) Respuesta normal de la célula b) Respuesta de bloqueo de la célula c) Respuesta insuficiente o antagonista d) Respuesta agonista (Guzmán y Ramírez, 2012)

Uno de los principales grupos de EDC son los estrógenos. La presencia de los estrógenos en el ambiente puede ser de origen natural o antropogénico. Como fuente natural, la excreción diaria humana de estradiol, estrona y estriol varía de hombre (1.6, 3.9, 1.5 μg , respectivamente) a mujer (3.5, 8, 4.8 μg); en mujeres embarazadas, la excreción diaria de estriol llega hasta 6000 μg (Ramírez-Sánchez et al., 2015).

Como fuente antropogénica, la concentración de los estrógenos en el ambiente se relaciona con la masa total manufacturada, prescrita o adquirida para terapias hormonales tanto para seres humanos como para ganado y animales domésticos (Ramírez-Sánchez et al., 2015). La Figura 3.2 propone un modelo conceptual del ciclo de vida para estas sustancias, en la que se muestra que, a partir de los consumidores, los estrógenos sintéticos pueden alcanzar las plantas de

tratamiento de agua residual y los rellenos sanitarios, posteriormente descargarse al agua superficial o filtrarse al agua subterránea, llegando a peces y al agua potable reiniciando el ciclo con el consumidor.

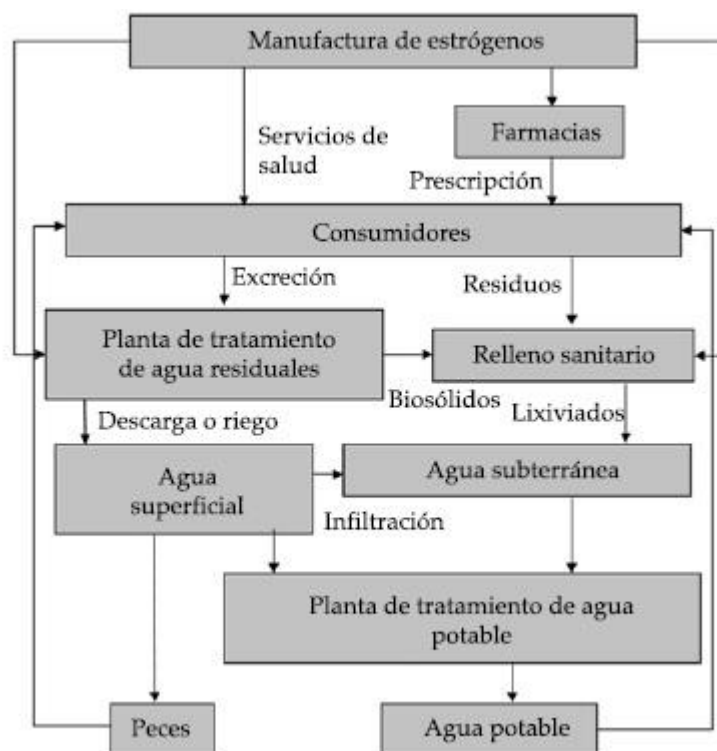


Figura 3.2 Medios de exposición a los estrógenos (Ramírez-Sánchez et al., 2015)

La causa principal de la presencia de estos microcontaminantes en los sistemas acuáticos son las descargas de agua residual municipal, siendo la fuente principal de liberación de estos compuestos las excreciones humanas (heces fecales y orina) y el vertido incontrolado de medicamentos caducos. Los EDC se descargan en el ambiente sin recibir algún tratamiento y recientemente se ha estimado un aumento de éstos debido a la sobrepoblación de las áreas urbanas (Johnson et al., 2000; Körne et al., 2000; Katori et al., 2002). Algunos de los contaminantes emergentes con más incidencia en el ambiente dado su alto uso son el BPA, el 4NP y el TCS.

3.1.1 Bisfenol-A (BPA)

El BPA es el disruptor endócrino al que más estamos expuestos, ya que está presente en todo tipo de productos que utilizamos casi a diario. Son numerosos los estudios encaminados a establecer su toxicidad y a desarrollar métodos de análisis para establecer los niveles de contaminación en muestras biológicas y medioambientales, así como el mecanismo de migración desde diferentes productos, especialmente los envases destinados a la alimentación.

El BPA ha sido muy usado en la fabricación de productos como plásticos, resinas epoxi, PVC, dispensadores de agua, recubrimiento de latas de comida, selladores dentales, etc., por lo que el ser humano está altamente expuesto a este compuesto. En 2002 se produjeron 2.8 millones de toneladas de BPA, y se estima que en 2011 la producción fue de 5.5 millones de toneladas. En 2011 el uso del BPA en la fabricación de biberones fue prohibido en Europa como medida preventiva ya que los bebés y los niños son más vulnerables a los efectos de los disruptores endócrinos. El BPA puede ligarse a los receptores del estrógeno, del andrógeno y de la tiroides. También puede afectar a otros órganos y sistemas fisiológicos, como el sistema nervioso en desarrollo, el páncreas y el sistema inmunológico y tiene efecto sobre el metabolismo de la tiroides y la función cerebral (Martínez, 2014). En la Figura 3.3 se muestra la estructura y propiedades fisicoquímicas del BPA.

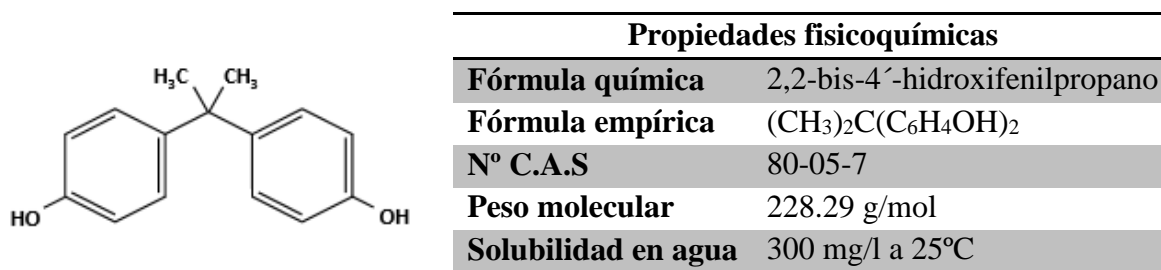


Figura 3.3 Estructura y propiedades fisicoquímicas del Bisfenol-A

Se ha descrito que el BPA es capaz de unirse a diferentes tipos de receptores, entre los que se encuentran los receptores de estrógenos y de andrógenos, así como el receptor de aril hidrocarburos y del receptor activado por los proliferadores de peroxisomas, los cuales están implicados en la regulación del sistema endócrino y de otros sistemas del organismo. Por otro lado, se ha demostrado que el BPA presenta actividad disruptora endócrina en numerosas especies de vertebrados, en las que provoca alteraciones en la reproducción y el desarrollo, en el sistema inmune y el sistema nervioso (Martínez de Paz, 2014). También se ha reportado que el BPA causa toxicidad reproductiva y afecta el desarrollo celular en ratas y ratones. Éste es un monómero usado en la fabricación de resinas epoxi, policarbonato y resinas de poliesterestireno. Tales resinas se usan ampliamente en alimentos enlatados, envasado de bebidas y resinas dentales que conducen a una posible exposición humana a BPA. Otra fuente de exposición humana al BPA es el agua potable. Se ha reportado que el BPA en agua potable proviene de resinas epoxi y poliéster-estireno utilizadas en revestimientos de barniz de tanques de concreto y del revestimiento de tuberías de acero en sistemas de suministro de agua. Es bien sabido que los compuestos fenólicos son reactivos con hipoclorito. Por lo tanto, el conocimiento de los productos de reacción de BPA después de la cloración es necesaria para permitir la evaluación eficaz del potencial de disrupción endócrina de BPA residual en el agua potable (Hu et al., 2002). De igual manera es necesario conocer los productos de reacción de BPA después de la ozonación del agua.

3.1.2 4-Nonilfenol (4NP)

El compuesto 4NP se usa principalmente como un intermedio en la industria química, por ejemplo, como agente conservante en la industria del curtido, como co-estabilizador y antioxidante en diversos polímeros tales como caucho y plásticos y como estabilizante en cloruro de polivinilo (PVC). Sin embargo, el 4NP residual en el medio acuoso se origina predominantemente a partir del amplio uso de tensoactivos de polietoxilato de nonilfenol (NPEO) de varias longitudes de cadena de etoxilato. Los surfactantes NPEO se usan comúnmente en todo el mundo como agentes emulsionantes, dispersantes, humectantes y espumantes. Estos tensoactivos se degradan en un medio acuoso para formar una variedad de metabolitos, incluyendo oligómero de NPEO de cadena más corta, NPEO carboxilado (NPEC), 4NP y metabolitos dicarboxilados (Hu et al., 2002).

De estos metabolitos, el 4NP es especialmente preocupante debido a sus características de disrupción endócrina. Este compuesto puede unirse al receptor de estrógeno y provocar acciones estrogénicas *in vivo* e *in vitro*. Las pruebas en ratas para efectos reproductivos de 4NP durante tres generaciones confirmaron tanto en los varones (disminución de la densidad de espermatozoides epididimales y recuentos de espermátides testiculares) como en las hembras (aumento de la duración del ciclo de celo y disminución de los pesos ováricos) cambios reproductivos (Hu et al., 2002). En la Figura 3.4 se muestra la estructura y propiedades fisicoquímicas del 4NP.

Propiedades fisicoquímicas	
Fórmula química	4-nonilfenol
Fórmula empírica	C ₁₅ H ₂₄ O
Nº C.A.S	104-40-5
Peso molecular	220.35 g/mol
Solubilidad en agua	7 mg/l a 25°C

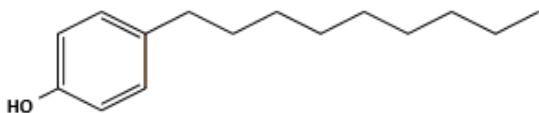
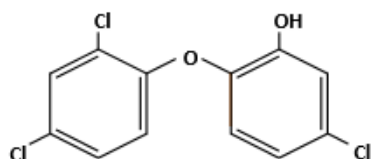


Figura 3.4 Estructura y propiedades fisicoquímicas del 4-Nonilfenol

Se ha descrito que el 4NP es un agonista de los receptores de estrógeno compitiendo con el estradiol por el sitio de unión a ligando, aunque es 100,000 veces menos potente que el estradiol. Además, se ha relacionado la infertilidad en los hombres con la exposición a este compuesto. Por otro lado, se ha demostrado su actividad estrogénica al inducir y sobreexpresar el receptor de la progesterona en células tumorales de mama, su unión al ERR γ humano y su actividad antiandrogénica mediada por el receptor de andrógenos. También se ha estudiado su efecto en organismos acuáticos, principalmente en peces, en los que se ha observado que es capaz de inducir la síntesis de proteínas características de las hembras, afectar a la morfología de los testículos y la fertilidad en machos (Martínez de Paz, 2014).

3.1.3 Triclosán (TCS)

El TCS es un difenil éter hidroxilado con propiedades bactericidas y antimicrobianas que se incluye en la formulación de muchos productos de cuidado personal tales como jabones de manos, desodorantes, enjuagues bucales y pastas dentífricas. Además, también se añade a la ropa deportiva, juguetes para bebés y utensilios de cocina de plástico. Todas estas aplicaciones, en menor o mayor medida, podrían contribuir a la dispersión del TCS en el medio ambiente. De hecho, ya se considera como un contaminante emergente con una alta presencia en muestras de agua residual, donde puede alcanzar concentraciones de hasta varios ng/ml (Canosa et al., 2005). Los productos de cuidado personal que contienen TCS son frecuentemente eliminados por los desagües, llegando a las plantas de tratamiento de agua residual, en las que aproximadamente el 30 % es adsorbido por los lodos, los cuales suelen ser empleados como abono en la agricultura. Por lo tanto, las dos vías más importantes de contaminación del medio ambiente con TCS son a través de las descargas de los efluentes de las plantas de tratamiento de agua residual y del empleo de los lodos contaminados en la agricultura (Martínez de Paz, 2014). La Figura 3.5 muestra la estructura y propiedades fisicoquímicas del TCS.



Propiedades fisicoquímicas	
Fórmula química	5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenol
Fórmula empírica	C ₁₂ H ₇ Cl ₃ O ₂
N° C.A.S	3380-34-5
Peso molecular	289.54 g/mol
Solubilidad en agua	10 mg/l a 20°C

Figura 3.5 Estructura y propiedades fisicoquímicas del Triclosán

La creciente preocupación con respecto a la presencia de TCS en el medio ambiente está relacionada tanto con los posibles efectos a largo plazo del compuesto original debido a su toxicidad para algunos organismos acuáticos, como con la formación de subproductos más tóxicos. La bio-metilación y la fotólisis son procesos bien conocidos que conducen a la conversión del TCS en compuestos lipófilos, estables y bioacumulativos (Martínez de Paz, 2014). La incineración de desechos sólidos, como los lodos urbanos secos, contaminados con TCS podría también generar derivados clorados extremadamente tóxicos. Otra reacción de transformación podría tener lugar cuando el TCS, liberado de la ropa, artículos de plástico y productos de cuidado personal, se mezcla con agua del grifo que contiene cierta cantidad de cloro libre (Canosa et al., 2005). A pesar de que este xenobiótico está considerado como apto para su uso, se han descrito alteraciones a nivel del sistema endócrino producidos por el TCS en diferentes organismos, principalmente en el sistema tiroideo en ratas. Además, se ha descrito en cultivos de células humanas su capacidad de desplazar el estradiol y la testosterona de sus

receptores, así como de reducir la actividad transcripcional dependiente de testosterona y de receptores de andrógenos y estrógenos (Martínez de Paz, 2014).

Dada la importancia de cuantificar los compuestos emergentes en el agua, se han implementado técnicas para su análisis, una de las más utilizadas es la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Para llevar a cabo dicho análisis es necesaria la extracción de los analitos a partir de la muestra, para ello una de las metodologías más adecuadas es la extracción en fase sólida SPE.

3.1.4 Extracción en fase sólida

La extracción en fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés) es una tecnología de separación de muestras que usa partículas sólidas, material cromatográfico empacado. Las más comunes son las de sílices enlazadas, polímeros de tipo estireno-divinilbenceno, carbón grafitizado, silicato de magnesio, sílica gel y óxidos de aluminio, usualmente contenido en un cartucho, para separar químicamente los diferentes componentes de una muestra (Arsenault, 2012).

Mediante la SPE se consigue concentrar y/o purificar los analitos mediante su retención en una fase sólida o una fase líquida inmovilizada sobre un soporte sólido, para a continuación proceder a su elución con un disolvente adecuado. Entre las múltiples ventajas que presenta destacan las siguientes (Canosa, 2008):

- Baja manipulación de la muestra
- Alto poder de concentración
- Obtención de extractos purificados con altas recuperaciones
- Menor consumo de disolventes en comparación con extracción líquido-líquido
- Ausencia de emulsiones
- Posibilidad de automatización
- Versatilidad en el tipo de adsorbentes utilizados

Existen dos tipos de SPE, en fase normal y en fase reversa. En la cromatografía en fase normal, la fase estacionaria es polar y la fase móvil es no polar (100% orgánica). En fase reversa la fase estacionaria es no polar (hidrofóbica) y la fase móvil es polar. Por lo tanto, en este último sistema se retendrán más fuertemente los compuestos menos polares y eluirán más rápidamente los compuestos polares afines a la fase móvil. En fase reversa es muy importante el acondicionamiento de los cartuchos ya que las partículas porosas del sorbente son no polares y los analitos normalmente se encuentran en fase acuosa, un solvente muy polar. Como el sorbente y el solvente de la fase móvil son opuestos en polaridad, no hay atracción entre ellos, por lo tanto los analitos no podrán viajar dentro de los poros y la retención no ocurrirá. Es por esto que en el acondicionamiento se asegura que los poros del sorbente se humecten adecuadamente con un solvente polar afín con la muestra para que los analitos puedan ser retenidos (Arsenault, 2012). La Figura 3.6 ejemplifica una muestra de color negro que está siendo procesada por SPE.

Los compuestos individuales que componen la muestra están siendo cromatográficamente separados.



Figura 3.6 Ejemplo de un método SPE (adaptado de Arsenault, 2012)

El proceso de concentración de la muestra en SPE consta de las siguientes etapas básicas (Canosa, 2008):

1. Acondicionamiento de la fase estacionaria. Se hace pasar a través del cartucho un disolvente o mezcla de disolventes adecuados, eliminando así las impurezas, hidratando la fase estacionaria y facilitando la transferencia de materia con la muestra.
2. Paso de la muestra a través del material adsorbente. El objetivo de esta etapa es retener cuantitativamente el analito, consiguiendo además un cierto grado de selectividad.
3. Lavado. Se utilizan disolventes con gran afinidad por las interferencias.
4. Elución. Con un disolvente apropiado se recupera el analito de la fase adsorbente. Por lo general se utiliza un pequeño volumen de disolvente orgánico, aunque también se puede realizar una desorción térmica. Los eluyentes comúnmente usados son acetato de etilo, acetona, metanol y acetonitrilo.

De acuerdo con el objetivo requerido, una de la forma de uso más común de SPE, es capturar y concentrar los analitos de interés procesando grandes volúmenes de muestra, la cual contiene muy bajos niveles de analito. La muestra debe ser pasada a través del cartucho y el flujo debe ser controlado. Esto puede lograrse empleando vacío con un sistema manifold (Canosa, 2008). Posterior a la extracción debe emplearse una técnica analítica adecuada para determinar los compuestos de interés, la cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas es una buena opción para lograrlo.

3.1.5 Cromatografía Gaseosa – Espectrometría de Masas

La cromatografía de gases (CG) es una forma específica del proceso de separación más general de la cromatografía. Todas las formas de cromatografía implican la distribución o partición de un compuesto entre dos fases diferentes, una móvil y la otra estacionaria. En una mezcla, los compuestos se reparten en un grado diferente entre las dos fases dependiendo de su respectiva solubilidad en cada fase. Como los compuestos en una mezcla son llevados por la fase móvil a lo largo de un lecho fijo de fase estacionaria, serán retardados en diferente proporción de acuerdo a su solubilidad y serán separados físicamente. Los que tienen mayor solubilidad en la fase estacionaria tardan más en salir del lecho que aquellos con menor solubilidad. En CG, la fase móvil es un gas portador inerte y la fase estacionaria es un líquido de alto peso molecular que se deposita ya sea sobre la superficie de partículas finamente divididas o sobre las paredes de un tubo capilar largo, que se denomina columna cromatográfica (Karasek y Clement, 2003).

A medida que los componentes de la muestra separados se eluyen de la columna de CG, se monitorean utilizando cualquiera de un gran número de detectores desarrollados para este propósito. El más versátil de estos detectores es el espectrómetro de masas (MS, por sus siglas en inglés). Cuando se utiliza un detector de MS para detectar los compuestos que eluyen a partir de una columna de CG, la técnica combinada se llama Cromatografía de Gases - Espectrometría de Masas (CG-MS). Inicialmente, las moléculas entran en la cámara del espectrómetro de masas mantenido al alto vacío, donde son bombardeadas por electrones. La energía transferida a las moléculas en este proceso hace que se ionicen y disocien en varios fragmentos de iones. Los iones pueden cargarse individual o múltiplemente. Los iones positivos formados se hacen atravesar una sección del analizador, mantenida a 10^{-5} a 10^{-7} Torr. Después de que los iones atraviesan la sección del analizador donde se separan de acuerdo con su relación masa-carga (m/z), son detectados por un dispositivo extremadamente sensible llamado multiplicador de electrones (Clement y Taguchi, 1991). La Figura 3.7 muestra el acoplamiento entre la cromatografía de gases y la espectrometría de masas.

Mediante la gráfica de la abundancia de iones detectados frente a su m/z , se obtiene un espectro de masas. El espectro de masas de un compuesto es como una huella digital que se puede utilizar para identificar la estructura orgánica original. Consiste en una representación gráfica de barras de m/z de los iones y sus abundancias normalizadas al ion más abundante (pico base). Al hacer coincidir el tiempo de retención de CG de un componente de la muestra y su espectro de masas con los de un compuesto de referencia normalizado analizado bajo las mismas condiciones, se obtiene una identificación positiva del componente de la muestra (Clement y Taguchi, 1991).

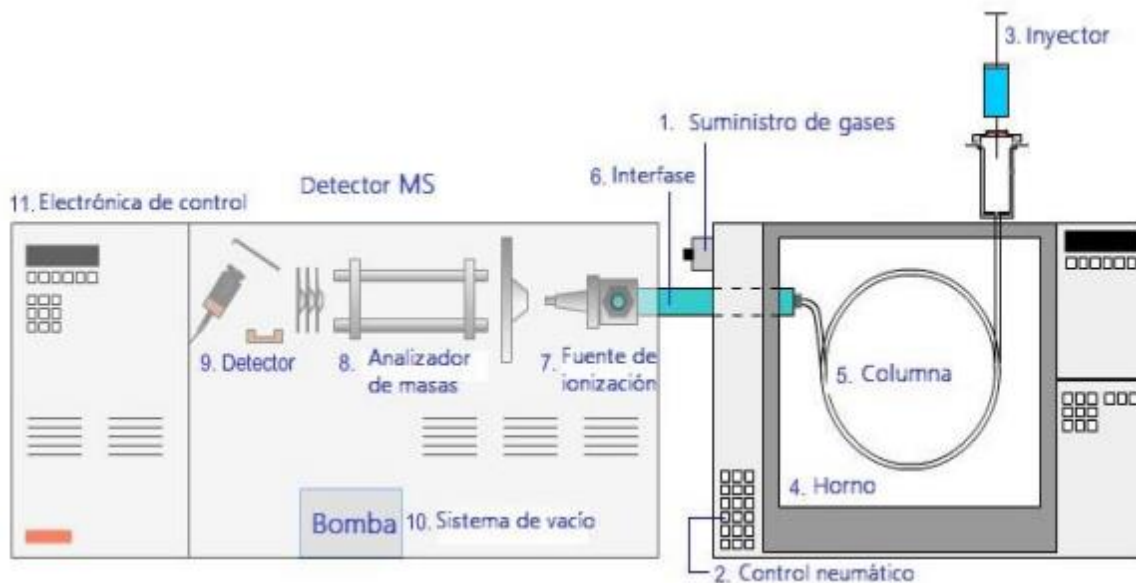


Figura 3.7 Acoplamiento de la cromatografía de gases a un espectrómetro de masas (Rodas, 2015)

Los compuestos emergentes en el agua pueden afectar la salud humana y animal mediante la disrupción endócrina, por lo que es necesario medir la actividad estrogénica de dichos compuestos y de sus subproductos de oxidación.

3.2 Disrupción endócrina y actividad estrogénica

El sistema endócrino y el sistema nervioso son los principales medios por los cuales el cuerpo transmite información entre diferentes células y tejidos. Esta información resulta en la regulación de la mayoría de las funciones corporales. El sistema endócrino usa hormonas para transmitir su información. Una hormona se define como una sustancia liberada por una glándula endócrina y transportada a través del torrente sanguíneo a otro tejido donde actúa para regular las funciones del tejido objetivo. Estas acciones generalmente están mediadas por la unión de la hormona a las moléculas receptoras. El receptor debe ser capaz de distinguir la hormona de un gran número de otras moléculas a las que está expuesto y transmitir la información de enlace a los eventos posteriores al receptor (Tan, 2006).

Los efectos disruptivos endócrinos pueden ser mediados a través de la interferencia con las funciones hormonales en diferentes niveles del sistema endócrino. Algunos de estos efectos pueden ocurrir a través de la señalización del receptor de estrógeno (ER, por sus siglas en inglés). Los estrógenos regulan la expresión de genes específicos y la secreción de ciertas hormonas, y coordinan diversos procesos como la proliferación y diferenciación celular, el desarrollo y la actividad de los tejidos que participan en el proceso de reproducción siendo los responsables de los cambios metabólicos, conductuales y morfológicos que ocurren durante

varias etapas de la reproducción. También controlan la formación ósea, la regulación de la homeostasis del organismo, el sistema cardiovascular y el comportamiento (Sychrová et al., 2012).

Existen muchas variables que determinan si un compuesto químico disruptor endócrino ejerce un efecto biológico, incluyendo la absorción, la distribución, el modo de acción y la naturaleza de la exposición:

1) Absorción y distribución: para provocar un efecto, primero los productos químicos deben ingresar al cuerpo, ya sea por ingestión de alimentos o bebidas, por adsorción cutánea o por inhalación. El producto químico se distribuirá a través del cuerpo, generalmente por el sistema circulatorio.

2) Biodisponibilidad: la concentración en la sangre de las hormonas naturales como los estrógenos es modificada por la globulina fijadora de hormonas sexuales y la albúmina, que unen la mayoría de las hormonas en la sangre, regulando así su disponibilidad para unirse a receptores e iniciar respuestas. La globulina fijadora de hormonas sexuales se une muy fuertemente y específicamente al estradiol, mientras que la unión a la albúmina es más débil y menos específica.

3) Exposición: el momento de la exposición a un disruptor endócrino puede ser crucial, ya que algunas etapas de desarrollo, por ejemplo, durante la primera infancia o la pubertad, son mucho más sensibles a los efectos perjudiciales de estos compuestos químicos. La duración de la exposición a un disruptor endócrino también contribuye a los efectos biológicos del contaminante químico; una exposición crónica sin duda causaría un efecto más grave en comparación con una exposición aguda a los EDC (Tan, 2006).

Una amplia gama de productos químicos naturales, farmacéuticos y sintéticos liberados en el medio ambiente son estrogénicos y pueden imitar (agonizar) o bloquear (antagonizar) la acción de las hormonas. Un agonista hormonal es un compuesto que se une a un receptor y transmite una respuesta hormonal, mientras que un antagonista es un compuesto que se une a un receptor dado y no transmite una respuesta. La exposición humana a contaminantes químicos puede ser a través de los alimentos (contaminantes naturales, residuos de plaguicidas, contaminantes debidos al transporte o recipientes de almacenamiento), a través del uso de productos domésticos y de consumo (empaques de alimentos, fármacos) y potencialmente a través del consumo de agua (Tan, 2006). Estos productos químicos entran en los ecosistemas acuáticos a través de fuentes puntuales (tratamiento de agua residual, efluentes industriales) y no puntuales (de origen urbano y agrícola) e incluyen productos químicos naturales y farmacéuticos excretados en la orina de humanos y ganado (Folmar et al., 2002).

Los más potentes son los estrógenos naturales, como el 17β -estradiol y el estrógeno sintético 17α -etinilestradiol. La mayoría, y tal vez todos los xenoestrógenos (compuestos químicos sintéticos que imitan el efecto de los estrógenos) son mucho menos potentes, por lo general en 3 o 4 órdenes de magnitud, pero a veces incluso más. Por lo tanto, para obtener el mismo grado

de respuesta estrogénica, generalmente es necesario que el organismo esté expuesto a una concentración de xenoestrógenos mucho mayor que la del 17β -estradiol y el 17α -etinilestradiol (Tan, 2006).

En términos generales, los productos químicos disruptores endócrinos se pueden agrupar en tres tipos: a) hormonas sintéticas (sustancias químicas diseñadas para alterar intencionalmente el sistema endócrino, como el 17α -etinilestradiol); b) compuestos naturales como los fitoestrógenos encontrados en una amplia variedad de plantas; y c) productos químicos fabricados por el hombre (diseñados para varios usos, que ahora se sospecha que alteran involuntariamente los sistemas endócrinos de los seres humanos y la vida silvestre) (Baker, 2001).

En individuos de la vida silvestre, se han reportado asociaciones entre los efectos reproductivos y del desarrollo con la exposición a sustancias químicas que alteran el sistema endócrino. Algunos de los efectos reportados incluyen: 1) masculinización observada en caracoles hembra expuestos a tributilestano (TBT, un agente antiincrustante en pinturas) que resulta en la disminución o extinción de poblaciones locales en todo el mundo; 2) deterioro del desarrollo y función sexual en caimanes en el lago Apopka-Florida, luego de un derrame de plaguicidas en 1980. Se formuló la hipótesis de que los efectos observados estaban relacionados con el DDT; 3) efectos reproductivos reportados en varias especies de peces en asociación con efluentes cloacales, industria papelera y químicos industriales; 4) reproducción alterada en las focas grises y anilladas del Báltico y estudios de campo en focas de puerto donde la reproducción ha sido afectada por los PCB (y metabolitos) en la cadena alimenticia; 5) en las aves, el adelgazamiento de la cáscara de huevo se ha relacionado con la exposición al DDE, lo que provoca una disminución de la población en varias especies de aves depredadoras en Europa y América del Norte (Baker, 2001).

Las preocupaciones sobre los posibles efectos adversos de los compuestos químicos ambientales en la salud reproductiva humana también han resultado de reportes sobre: reducciones en el conteo y la calidad de los espermatozoides; aumento de la incidencia de anomalías genitales masculinas criptorquidia e hipospadias y aumento de la incidencia de cáncer testicular, de próstata y de mama y trastornos reproductivos en hijos nacidos de mujeres tratadas con dietilestilbestrol (DES) (Baker, 2001).

Las sustancias que pueden actuar como estrógenos muestran una amplia diversidad en sus estructuras químicas. Para abordar a fondo la cuestión de los posibles efectos estrogénicos adversos, se necesitan métodos confiables para detectar e identificar los productos químicos de estas diversas clases estructurales (Fang et al., 2000). Los sistemas de prueba *in vitro* son potentes para el análisis rutinario de grandes cantidades de sustancias químicas, particularmente cuando se usan en combinación, y pueden ser útiles para caracterizar el mecanismo de acción y la potencia. Sin embargo, los ensayos *in vitro* no siempre predicen confiablemente el resultado *in vivo* debido a las diferencias en las capacidades metabólicas de los sistemas de prueba y la diversa gama de mecanismos por los cuales pueden actuar los productos químicos disruptores

endócrinos. Debido a que los bioensayos *in vivo* requieren mucho tiempo y son intensivos en mano de obra, es recomendable utilizar una batería de ensayos *in vitro* e *in vivo* a corto plazo para utilizarlos en la exploración de la estrogenicidad (Baker, 2001).

3.2.1 Medición de la actividad estrogénica

En 1996, el Congreso de Estados Unidos ordenó a la Agencia de Protección Ambiental (EPA) que desarrollara e implementara técnicas para analizar posibles sustancias químicas que alteran el sistema endócrino, haciendo énfasis en los productos químicos que simulan los estrógenos. Para cumplir con esos requisitos, la EPA organizó el Comité Asesor de Pruebas y Detección de Disruptores Endócrinos (EDSTAC, por sus siglas en inglés) para recomendar protocolos específicos de detección y pruebas para evaluar los efectos de los químicos disruptores endócrinos en la salud humana y ambiental (Folmar et al., 2002).

Las sustancias clasificadas como disruptores endócrinos deben ser monitoreadas periódicamente. Sin embargo, la detección química en agua de estas moléculas, no es suficiente para garantizar la existencia o ausencia de tales efectos. Es por tanto necesario acudir a sistemas biológicos capaces de ofrecer la información necesaria para una predicción o estimación del efecto disruptor endócrino más real. A ello hay que añadir la importancia que actualmente se está dando a la utilización de métodos alternativos al uso de animales de laboratorio en la evaluación toxicológica y ecotoxicológica, entre los que destacan los métodos *in vitro*.

El objetivo de la metodología que se detalla a continuación es su aplicación en la evaluación de la capacidad estrogénica de un extracto obtenido a partir de una muestra de agua. Con ella se obtiene información del riesgo del agua evaluada, independientemente de la caracterización química que se haya podido hacer de la misma.

Biosensores

Las células de levadura pueden ser usadas como biosensores para la detección de muchos analitos. Esto se debe principalmente a que las últimas técnicas de biología molecular permiten la modificación del genoma de la levadura para dar a las células propiedades metabólicas útiles. Un biosensor tiene la particularidad de utilizar una parte biológica (proteína), que puede ser estrictamente idéntica o derivada de una molécula natural producida por un organismo vivo o un organismo entero y que es capaz de reconocer el analito requerido. La segunda parte de un biosensor es el transductor, que debe transformar esta interacción biológica en información físicamente detectable. Esta información puede ser transportada en varios estados (por ejemplo: luz, corriente, calor) a un detector que transformará, amplificará y procesará esta información para dar un valor numérico (Chamas et al., 2017).

Receptores de esteroides

Uno de los principales objetivos de estos biosensores son los disruptores endócrinos. La detección de moléculas que se unen a receptores de hormonas esteroides aumentó su importancia desde el descubrimiento de que estos EDC pueden interferir con el sistema endócrino de los vertebrados, pueden conducir a riesgos para la salud y, por lo tanto, presentan una amenaza potencial para el medio ambiente. En todos los organismos la primera etapa del diseño del biosensor es la integración de un receptor de esteroides humano bajo el control de un promotor constitutivo. Si un ligando objetivo está presente en el medio de cultivo, puede entrar en la célula por difusión pasiva a través de la membrana y unirse al receptor. Esta unión induce un cambio conformacional que permite la homodimerización del receptor en el citoplasma. La señal de localización nuclear del receptor permitirá entonces la translocación del receptor homodímero en el núcleo para unirse a su elemento de respuesta de ADN, iniciando así la actividad del factor de transcripción (Chamas et al., 2017).

Transducción de Señal Biológica: Proteínas Reporteras

En biosensores de levadura se utilizan dos tipos principales de proteínas reporteras: enzimas y proteínas fluorescentes. La β -galactosidasa, la fitasa y la tansasa son las enzimas reporteras más utilizadas en los biosensores de levadura. En *Saccharomyces cerevisiae*, se emplean genes reporteros lacZ y luc para la producción de β -galactosidasa y luciferasa, respectivamente. Un nuevo desarrollo es el uso de proteínas reporteras que producen fluorescencia o bioluminiscencia sin la necesidad de un sustrato. En los últimos años se han empleado dos estrategias principales para detectar la fluorescencia directa: la utilización de luciferasa bacteriana (lux) y la utilización de proteínas autofluorescentes como GFP o DsRed (Chamas et al., 2017).

Sistema Lux

El sistema lux es la base del biosensor de *S. cerevisiae* BLYES, que tiene como objetivo la detección de estrógenos. Existen varias luciferasas bacterianas diferentes, que son heterodímeros compuestos de dos subunidades, α y β , y que están codificados por dos genes en un operón, luxA y luxB. Esta proteína cataliza la oxidación de los ácidos grasos, una reacción que produce luz a una longitud de onda de 490 nm. Tres genes adicionales (luxC, luxD y luxE), situados en el mismo operón y responsables de la síntesis de tres enzimas, están implicados en la producción y reciclaje de ácidos grasos. Tener los cinco genes en el mismo operón permite la bioluminiscencia sin necesidad de un sustrato externo. En BLYES, estos cinco genes se han insertado en el genoma de *S. cerevisiae*, y con un promotor adecuado, la translocación del receptor homodímero nuclear da como resultado la expresión de los cinco genes, produciendo bioluminiscencia (Chamas et al., 2017).

BioLuminescent Yeast Estrogen Screen (BLYES)

La técnica BLYES ha sido implementada en USA y es usada como técnica de rutina en Brasil para monitorear compuestos con actividad estrogénica en el agua. Esta técnica utiliza una bacteria “reportera” desarrollada en una cepa recombinante de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la bacteria funciona como un sensor químico. La cepa de *S. cerevisiae* contiene el estrógeno humano receptor (hER- α) y un elemento de respuesta a estrógenos basado en plásmido (ERE)-lacZ. La presencia de compuestos con potencial estrogénico es detectada por la levadura genéticamente modificada. El contaminante se une a su receptor, el cual se transforma en un receptor activo, éste estimula al activador transcripcional y se expresa el gen reportero Lac Z, produciéndose la enzima β -galactosidasa, la cual sale al medio y actúa sobre un sustrato cromógeno. La cinética de la aparición del nuevo compuesto está directamente relacionada con la cantidad de enzima producido, que a su vez se relaciona con la concentración del compuesto estrogénico (Sanseverino et al., 2005). La Figura 3.8 muestra como los compuestos estrogénicos cruzan la membrana celular y se unen al receptor de estrógeno humano (hER). Este complejo interactúa con los elementos de respuesta al estrógeno (ERE) que inician la transcripción de *luxA* y *luxB*. *S. cerevisiae* BLYES contiene el receptor de estrógeno humano en su genoma.

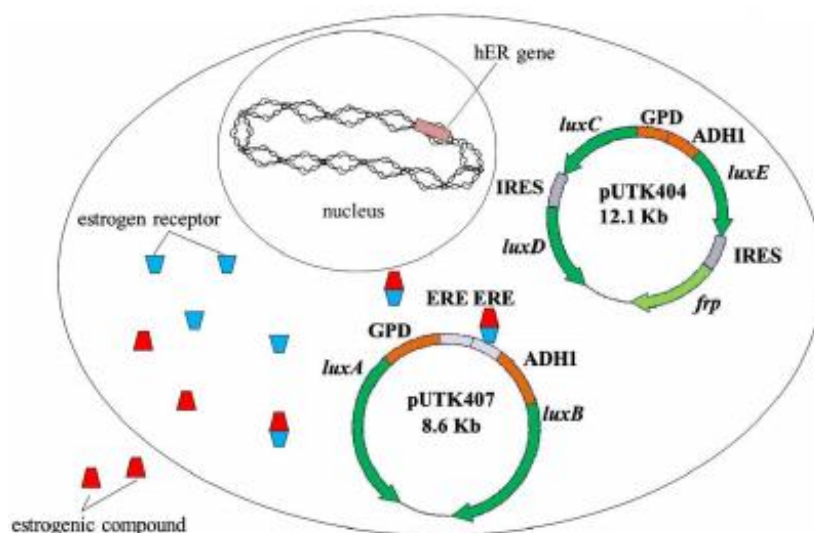


Figura 3.8 Representación esquemática de *S. cerevisiae* BLYES (Sanseverino et al., 2005)

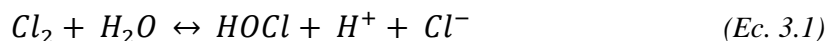
Todo el ensayo se lleva a cabo en una placa multipocillo de polipropileno lo que permite realizar diluciones seriadas de la muestra así como medidas repetidas. El incremento de fluorescencia es registrado y los valores de actividad de β -galactosidasa se calculan a partir de la pendiente de la recta de regresión como incremento de la fluorescencia con respecto al tiempo. La concentración de sustancias con actividad estrogénica se presenta en ng/l de equivalentes de 17 β -estradiol (EEQ) (control positivo) (Ruiz et al., 2013).

3.3 Cloración

El objetivo principal de la desinfección de los suministros públicos de agua y de los efluentes de agua residual es prevenir la propagación de enfermedades transmitidas por el agua. En años más recientes, se ha encontrado que la cloración produce trihalometanos (THMs) y otros compuestos orgánicos de interés para la salud. Los THMs son formados por la reacción entre cloro libre y ciertos tipos de impurezas orgánicas en el agua. La materia orgánica natural (MON), compuesta de ácidos húmicos y fúlvicos, es la principal precursora de THMs en la mayoría de aguas, y representa la mayor proporción del contenido de carbono orgánico total (COT) (Krasner, 1989). Se sospecha que los THMs son cancerígenos en humanos y se han regulado en agua potable con un nivel máximo total de contaminantes de 100µg/l. Los principales THMs formados en la cloración del agua son cloroformo, bromodiclorometano, dibromoclorometano y bromoformo. Las especies bromadas resultan cuando hay trazas de bromuro presentes en el agua que está siendo clorada. Además, hay muchos otros compuestos halogenados formados durante la cloración, algunos de los cuales aún no han sido identificados (Sawyer et al., 1994).

El cloro es usado en forma de cloro libre o como hipoclorito. En cualquiera de las dos formas actúa como un potente agente oxidante y a menudo se disipa en reacciones secundarias tan rápidamente que se realiza poca desinfección hasta que se han añadido cantidades superiores a la demanda de cloro (Sawyer et al., 1994).

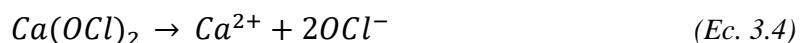
El cloro se combina con el agua para formar ácido hipocloroso y ácido clorhídrico.



En solución diluida y a niveles de pH superiores a aproximadamente 4, el equilibrio mostrado en la Ecuación 3.1 se desplaza grandemente a la derecha y muy poco Cl_2 existe como tal en solución. El ácido hipocloroso formado es un ácido débil y está muy poco disociado a niveles de pH inferiores a 6 (Sawyer et al., 1994).



Los hipocloritos se utilizan en forma de soluciones de hipoclorito de sodio e hipoclorito de calcio. El primero es usado cuando se requieren grandes cantidades, como en la desinfección de agua residual, donde los suministros están disponibles o cuando es factible la generación in situ de soluciones de sal. El hipoclorito de calcio es usado para situaciones en las que se requieren cantidades limitadas o uso intermitente. Ambos compuestos se ionizan en agua para dar el ion hipoclorito, como se ilustra a continuación:



Este ion, por supuesto, establece un equilibrio con iones hidrógeno como se mostró anteriormente. Por lo tanto, se puede concluir que en el agua se establecen los mismos equilibrios independientemente de si se añade cloro o hipoclorito. La diferencia significativa sería en los efectos del pH y su influencia en las cantidades relativas de OCl^- y HOCl en el equilibrio. El cloro tiende a disminuir el pH, mientras que los hipocloritos tienden a aumentarlo (Sawyer et al., 1994).

3.3.1 Subproductos de la cloración

Los contaminantes emergentes estudiados en este trabajo (BPA, 4NP y TCS), por su estructura fenólica, reaccionan fuertemente con el cloro, lo que conduce a la formación de congéneres clorados (Hu et al., 2002). La Figura 3.9 muestra el esquema de reacción para la cloración de compuestos fenólicos. Oxidantes como el cloro llevan a cabo un ataque electrofílico en las posiciones orto y para del anillo fenólico. Por lo tanto, cuando el cloro libre reacciona con el fenol, el 2-clorofenol y el 4-clorofenol son los productos iniciales. Estas especies se cloran adicionalmente para formar 2,6-diclorofenol o 2,4-diclorofenol, los cuales se cloran adicionalmente para producir 2,4,6-triclorofenol. En presencia de cloro libre en exceso, se propone que la posición para de 2,4,6-triclorofenol es hidrolizada y oxidada por HOCl para producir la 2,6-dicloro-p-benzoquinona intermedia. La oxidación adicional de este intermediario conduce a la producción de ácidos carboxílicos clorados y trihalometanos (Rule et al., 2005).

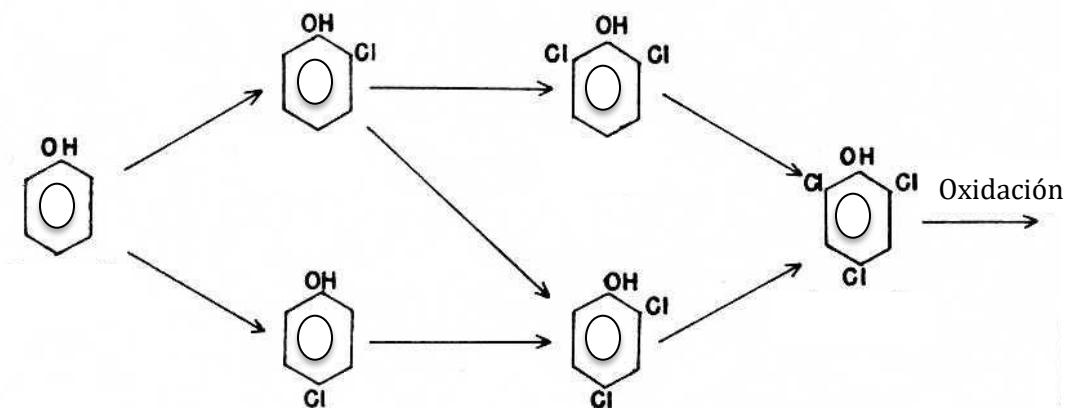
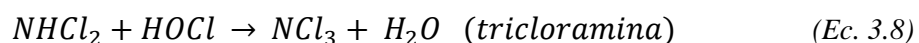
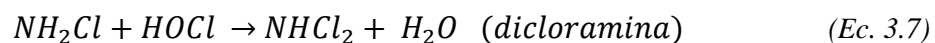
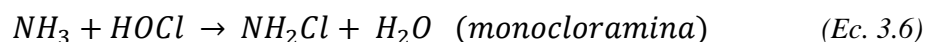


Figura 3.9 Esquema de reacción para la cloración de compuestos fenólicos (Rule et al., 2005)

Por otra parte, el cloro y el ácido hipocloroso reaccionan con una amplia variedad de sustancias, incluyendo amoníaco y materiales húmicos naturales. El ion amonio existe en equilibrio con el amoníaco y el ion hidrógeno (Ec. 3.5).



El amoníaco reacciona con el cloro o con el ácido hipocloroso para formar monocloraminas, dicloraminas y tricloraminas, dependiendo de las cantidades relativas de cada uno y hasta cierto punto del pH, como sigue:



La monocloramina (NH_2Cl), la dicloramina ($NHCl_2$) y el tricloruro de nitrógeno o tricloramina (NCl_3) se forman en las reacciones sucesivas de sustitución. Las dos formas que predominan, en la mayoría de los casos, son la NH_2Cl y $NHCl_2$ a las que se llama comúnmente cloro combinado disponible. Las cloraminas sirven igualmente como desinfectantes aunque reaccionan de una manera sumamente lenta (Sawyer et al., 1994).

Debido al interés en reducir las concentraciones de THMs y otros productos orgánicos halogenados de la cloración actualmente no regulados en el agua potable, muchos otros desinfectantes están siendo considerados. Sin embargo, los beneficios de la desinfección con cloro son inmensos; es el único método reconocido de desinfección que es capaz de proporcionar residuales dentro del sistema de distribución para proteger contra la contaminación bacteriana inadvertida. Además, otros desinfectantes tienen sus propias desventajas, y la experiencia con ellos es limitada en este momento. Mientras que la exploración de otros desinfectantes vale la pena y debe ser perseguida, los esfuerzos dirigidos a minimizar la producción de compuestos orgánicos clorados por la cloración también son necesarios. Existen muchas posibilidades de mejora. Por ejemplo, el ozono puede usarse como desinfectante primario en la planta de tratamiento de agua, seguido por la adición de amoníaco y cloración para formar una cloramina residual en el sistema de distribución que protege, pero es mucho menos reactiva con los compuestos orgánicos naturales que con el cloro libre (Sawyer et al., 1994).

3.4 Ozonación

El ozono existe como un gas a temperatura ambiente. El gas es incoloro con un olor picante fácilmente detectable a concentraciones tan bajas como 0.02 a 0.05ppm (por volumen), las cuales están por debajo de las concentraciones de preocupación para la salud. El gas ozono es altamente corrosivo y tóxico. Es un poderoso oxidante, capaz de oxidar muchos compuestos orgánicos e inorgánicos en el agua. El ozono es más soluble que el oxígeno, mientras que el cloro es doce veces más soluble que el ozono (Trujillo et al., 2010).

El ozono se descompone espontáneamente durante el tratamiento del agua por un mecanismo complejo que involucra la generación de radicales libres hidroxilo. Estos radicales están entre los agentes oxidantes más reactivos en el agua. Su vida media está en el orden de microsegundos,

por lo tanto la concentración de radicales libres hidroxilo nunca alcanza niveles por encima de 10^{-12}M (EPA, 1999).

Los procesos de oxidación por ozono se caracterizan por el ataque directo del ozono molecular sobre los compuestos y/o indirectamente por la generación de radicales hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), que son formados cuando el ozono se descompone en el agua y que se caracterizan por un gran potencial de oxidación, lo que representa una buena alternativa para el tratamiento de contaminantes (Trujillo et al., 2010). Estas dos vías de reacción se ilustran en la Figura 3.10.

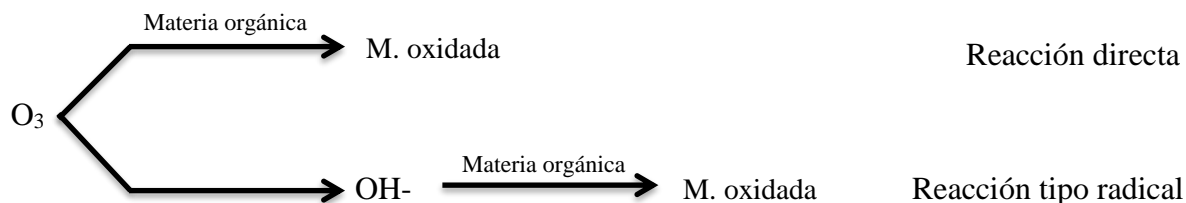


Figura 3.10 Reactividad del ozono en solución acuosa (modificado de Langlais et al., 1991)

Reactividad del Ozono molecular

Las estructuras de resonancia de la molécula de ozono se pueden representar como lo muestra la Figura 3.11, dada la deslocalización de sus electrones.

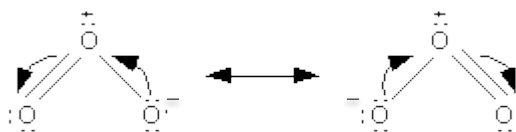


Figura 3.11 Estructuras de resonancia del ozono (modificado de Langlais et al., 1991)

Esta estructura ilustra que el ozono molecular actuará como un dipolo, como un agente electrofílico y como un agente nucleofílico. Estos tres tipos de reacciones se describen a continuación.

Ciclo adición (Mecanismo de Criegee). Como resultado de su estructura dipolar, la molécula de ozono puede conducir a una 1-3 cicloadición dipolar en enlaces insaturados, con la formación de un ozónido primario. En un solvente protónico como el agua, este ozónido primario se descompone en un compuesto carbonilo (aldehído o cetona) y en un zwitterion que rápidamente produce un hidroxí-hidroperóxido que, a su vez, se descompone en un compuesto carbonilo y en peróxido de hidrógeno.

Reacción electrofílica. La reacción electrofílica está restringida a sitios moleculares con una fuerte densidad electrónica y, en particular, ciertos compuestos aromáticos. Aromáticos sustituidos con grupos donadores de electrones (OH , NH_2 , y compuestos similares) muestran

alta densidad electrónica en los carbonos localizados en las posiciones orto y para, y entonces son altamente reactivos con ozono en esas posiciones. Por el contrario, los aromáticos sustituidos con grupos atrayentes de electrones (-COOH, -NO₂) son débilmente reactivos con ozono. En este caso, el ataque inicial de la molécula de ozono se lleva a cabo principalmente en la posición meta menos desactivada. El resultado de esta reactividad es que los compuestos aromáticos que tienen grupos donadores de electrones (por ejemplo, fenol y anilina) reaccionan rápidamente con el ozono. El ataque inicial de la molécula de ozono conlleva primero a la formación de subproductos orto y para hidroxilados. Estos compuestos hidroxilados son altamente susceptibles a ozonación adicional. Los compuestos conducen a la formación de quinoides y, debido a la apertura del ciclo aromático, a la formación de productos alifáticos con funciones carbonilo y carboxilo.

Reacción nucleofílica. La reacción nucleofílica se encuentra en sitios moleculares con déficit electrónico y, más frecuentemente, en carbonos que tienen grupos atrayentes de electrones.

En resumen, las reacciones del ozono molecular son extremadamente selectivas y limitadas a compuestos aromáticos y alifáticos insaturados como también a grupos funcionales específicos (Langlais et al., 1991).

Factores que favorecen la vía molecular (inhiben la descomposición del ozono): medio ácido, “secuestradores” de radicales como: CO₃²⁻, HCO₃⁻ (alcalinidad), t-BuOH, etc.

La vía con radicales son reacciones en las que las especies reaccionantes son radicales generados en la descomposición del ozono, principalmente el radical hidroxilo. Estas reacciones son muy rápidas y no selectivas. Los sustratos típicos que reaccionan con el ozono según esta vía son hidrocarburos saturados y derivados halogenados, ácidos alifáticos, aldehídos, cetonas, alcoholes, hidrocarburos aromáticos desactivados (con grupos electrón-atradores).

Factores que favorecen la vía radicalaria (promueven la descomposición del ozono): medio básico (OH⁻), H₂O₂, radiación UV (253.7nm), ácido fórmico, Fe²⁺, etc.

El ozono se puede usar en el tratamiento del agua potable para diversos fines, entre los que destacan los siguientes (Rodríguez, 2003):

- a) Desinfección y control de algas
- b) Oxidación de microcontaminantes inorgánicos (Fe³⁺ y Mn²⁺)
- c) Oxidación de microcontaminantes orgánicos (eliminación de olores y sabores, compuestos fenólicos, plaguicidas, etc.)
- d) Oxidación de la materia orgánica natural (MON) del agua, con diversos objetivos: eliminación del color, incremento de la biodegradabilidad de la MON, reducción en el potencial de formación de THMs y de halogenuros totales
- e) Mejora del proceso de coagulación-floculación

El ozono es un excelente agente desinfectante (eliminación o inactivación de bacterias, virus y protozoos). Su principal limitación es su inestabilidad en agua, por lo que no puede usarse como desinfectante residual en la red de distribución; sin embargo, si es efectivo como desinfectante primario en las plantas de tratamiento de agua, controlando su velocidad de descomposición según las características del agua a tratar, como el pH, la presencia de contaminantes inorgánicos y orgánicos que originen una demanda adicional de ozono, etc.

En la secuencia de potabilización del agua el ozono puede aplicarse en tres puntos distintos (Rodríguez, 2003):

- a) Preozonación: aplicación en cabeza de tratamiento. Puede suministrarse en la toma de agua para proteger las líneas de conducción que llevan a la estación potabilizadora de posibles crecimientos microbianos, para el control de olores y sabores y como una primera desinfección; sin embargo, lo más común es aplicar la preozonación como primera etapa en la misma planta de tratamiento, utilizándose principalmente para la eliminación de Fe y Mn, para el control de olores y sabores, como ayuda del proceso de coagulación y como desinfectante. Las últimas investigaciones muestran que este proceso es también efectivo en la eliminación de arsénico del agua.
- b) Ozonación intermedia: se aplica antes de la etapa de filtración. Se utiliza principalmente para oxidar la MON, aumentando su biodegradabilidad y favoreciendo su eliminación biológica en los filtros (de arena o de carbón activado granular); también se puede usar para la eliminación de microcontaminantes orgánicos y para eliminar Fe y Mn en aguas con alto contenido de MON.
- c) Postozonación: aplicación al final de la secuencia de tratamiento. Se usa exclusivamente para la desinfección

Guedes et al. (2008) demostraron que el proceso de ozonación fue efectivo en remover por encima del 96% los estrógenos 17β -estradiol (natural) y 17α -etinilestradiol (sintético) de una solución acuosa. La adición de H_2O_2 en la ozonación no mejoró la remoción de estrógenos. A pH 3 la remoción fue total incluso con bajas dosis de ozono, mientras que a pH 7 y 11 no se removió por completo.

Vieira et al. (2015) encontraron que los tratamientos convencionales como clarificación y filtración con arena no fueron efectivos para reducir la estrogenicidad. Sin embargo, al aplicar ozono posterior a estos tratamientos, se logró reducir la estrogenicidad de 5 y 2.5ng/l a 1ng/l.

3.4.1 Subproductos de la ozonación

Los principales subproductos de desinfección (DBP, por sus siglas en inglés) procedentes de la desinfección con ozono son:

- Bromato
- Carbono Orgánico Disuelto Biodegradable
- Aldehídos y cetonas
- Cetoácidos y ácidos carboxílicos
- Bromoformo y compuestos bromados
- Peróxidos y epóxidos
- Nitrosaminas
- Otros: fenoles, quinonas, furanos

Tanto la vía molecular como la de radicales intervienen en la formación de subproductos derivados de la aplicación de ozono en el agua. La formación de DBP del ozono se ve influida principalmente por la dosis aplicada de ozono y por las características del agua natural (pH, presencia de eliminadores de radicales como el HCO_3^- , etc.); dichos DBP se generan debido a la reacción del ozono con compuestos inorgánicos (bromuro principalmente) y orgánicos (MON, principalmente sustancias húmicas). La ozonación de la MON, a las dosis habituales de trabajo en las plantas potabilizadoras, no provoca la mineralización total hasta CO_2 sino que se forman una serie de subproductos orgánicos generalmente con mayor carácter polar (Glaze, 1986).

A niveles de pH bajos, la destrucción de precursores por parte del ozono es bastante eficaz, sin embargo, por encima de un pH crítico, el ozono en realidad es menos eficaz y de hecho algunas veces aumenta la cantidad de precursores de subproductos de cloración. Para la mayoría de las sustancias húmicas, este pH crítico es 7.5, que es el nivel aproximado en el que la descomposición del ozono a radicales libres hidroxilo aumenta rápidamente, aumentando así las tasas de oxidación orgánica. Por lo tanto, a un pH inferior (aproximadamente 6-7), en el que predomina el ozono molecular sobre el radical libre hidroxilo, los subproductos precursores de THMs iniciales son de naturaleza diferente a los formados por los radicales libres hidroxilo oxidados a niveles de pH más altos. Esto es lógico teniendo en cuenta el mayor potencial de oxidación del radical libre hidroxilo sobre el del ozono (Glaze, 1986).

A medida que aumenta la alcalinidad, favorece el potencial de formación de THMs (THMFP). Esto se debe a que la alcalinidad depura cualquier radical libre hidroxilo formado durante la ozonación, dejando el ozono molecular como el único oxidante, que sólo es capaz de oxidar los precursores orgánicos a una secuencia de oxidación inferior que el radical libre hidroxilo. Dado un pH neutro y niveles moderados de alcalinidad de bicarbonato, se han mostrado reducciones en los niveles de THMFP de 3 a 20% con dosis de ozono que van desde 0.2 a 1.6 mg de ozono por mg de carbono (EPA, 1999).

3.5 Evaluación de riesgos para la salud humana

La evaluación del riesgo para la salud humana es un proceso destinado a estimar el riesgo para un determinado organismo, sistema o población objetivo. Se pueden realizar evaluaciones de los riesgos para la salud humana de los productos químicos para evaluar las exposiciones pasadas, actuales e incluso futuras a cualquier sustancia química que se encuentre en el aire, suelo, agua, alimentos, productos de consumo u otros materiales. Pueden ser de naturaleza cuantitativa o cualitativa. En términos generales, el riesgo depende de los siguientes factores (OMS, 2010):

- La cantidad del producto químico presente en el medio ambiental (suelo, agua, aire), en alimentos y/o en un producto;
- La cantidad de contacto (exposición) que tiene una persona con el contaminante en el medio; y
- La toxicidad del químico.

La ingestión de agua es una importante vía de exposición a contaminantes químicos. La contaminación del agua puede ocurrir en la fuente de suministro de agua (agua subterránea o superficial); durante el tratamiento (por ejemplo, se pueden formar subproductos tóxicos durante la cloración); o post tratamiento (como lixiviación de plomo u otros materiales de los sistemas de plomería) (USEPA, 2011). La contaminación del agua con contaminantes emergentes debe expresarse en términos de riesgos para la salud humana.

4. METODOLOGÍA

Se realizó la determinación de la actividad estrogénica de los subproductos generados a partir de los compuestos emergentes: BPA, 4NP y TCS en agua de abastecimiento fortificada individualmente con cada EDC, evaluando los procesos de oxidación con ozono y cloro. Para ello se utilizó muestras de agua del pozo de la Facultad de Química ubicado en el campus central de la UNAM (Ciudad Universitaria). En la Figura 4.1 se muestra un diagrama general de la metodología empleada a lo largo de la investigación, cuyas etapas principales fueron el muestreo del pozo, la fortificación individual con los EDC, las oxidaciones individuales con cloro y ozono, la extracción con SPE y la concentración con nitrógeno. Con el extracto obtenido se realizó el análisis químico con GC-MS para evaluar las remociones y los subproductos. Otra parte del mismo extracto fue empleada para el análisis de la actividad estrogénica mediante la técnica BLYES. Con los resultados obtenidos se llevó a cabo la evaluación de riesgos para la salud humana. Las etapas metodológicas se describen en los siguientes numerales.

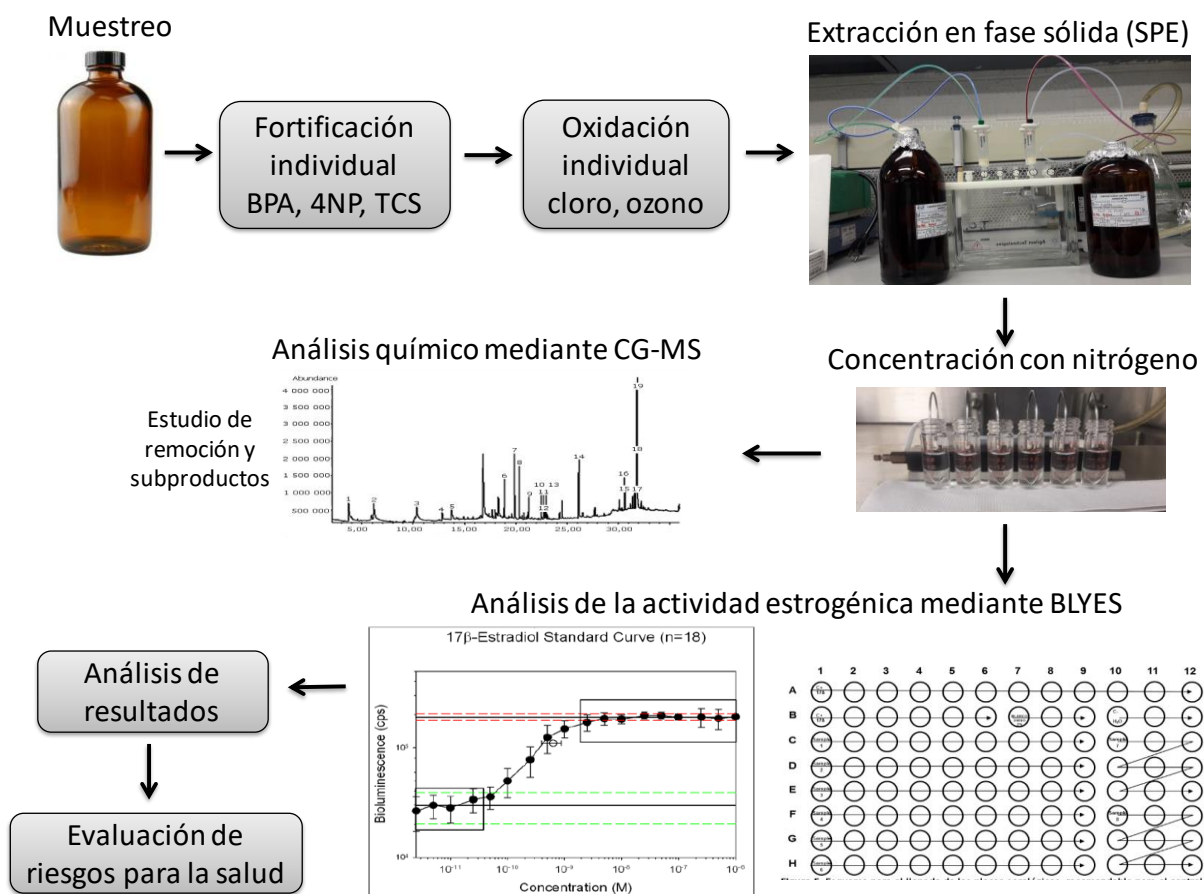


Figura 4.1 Diagrama de la metodología empleada

4.1 Muestreo del pozo de abastecimiento

El pozo de abastecimiento del cual se tomaron las muestras se encuentra ubicado en la Facultad de Química de la UNAM. Se llevaron a cabo 10 muestreos de agua a pie de pozo (previo a la etapa de cloración) durante el periodo comprendido entre los meses de agosto de 2017 y abril de 2018. Las muestras fueron recolectadas en frascos ámbar de 1 litro, el volumen total de muestra tomado en cada uno de los muestreos estuvo entre 4 y 25 litros, tal y como se presenta en la Tabla 4.1. El muestreo se efectuó según el procedimiento establecido en el método EPA 525.2. La Figura 4.2 muestra imágenes del muestreo 5, donde se observa el punto exacto de toma de muestra en el pozo.

Tabla 4.1 Muestreos del pozo de la Facultad de Química

Muestreo	Fecha	Volumen de agua muestreado (L)
1	09-08-2017	4
2	03-10-2017	11
3	09-10-2017	25
4	16-10-2017	20
5	23-10-2017	24
6	13-11-2017	12
7	04-12-2017	16
8	06-02-2018	14
9	12-02-2018	9
10	09-04-2018	12



Figura 4.2 Imágenes del muestreo 5

4.1.1 Parámetros de calidad del agua

Con el fin de caracterizar el agua del pozo de la Facultad de Química, se analizaron los parámetros mostrados en la Tabla 4.2, con las respectivas metodologías para su determinación de acuerdo con los Métodos Estándar para el análisis de agua potable y residual (APHA-AWWA-WPCF, 1992). Todos los resultados obtenidos cumplen con la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994. Adicionalmente y para verificar la presencia de compuestos emergentes se utilizó CG-MS.

Tabla 4.2 Parámetros fisicoquímicos evaluados en el agua del pozo de la Facultad de Química

Parámetro	Resultado	Método Estándar (APHA-AWWA-WPCF)
pH	7.07 ± 0.03	4500-H ⁺ B
Alcalinidad (mg/l CaCO ₃)	123 ± 1	2320 B
Nitrógeno amoniacal (mg/l)	No detectado	4500-NH ₃ C
Nitritos (mg/l)	0.004 ± 0.001	4500-NO ₂ ⁻ B
Nitratos (mg/l)	2.9 ± 0	4500-NO ₃ ⁻ F

Dado que no se detectó la presencia de compuestos emergentes (BPA, 4NP y TCS) en el agua del pozo analizado, se fortificaron individualmente las muestras con cada analito. En la literatura encontrada para la formación de subproductos de los compuestos emergentes en procesos de oxidación con ozono y cloro (Tabla 1.2) se reportan altas concentraciones de fortificación de estos compuestos (12000 ng/l – 1.16x10⁸ ng/l). Debido a que uno de los objetivos de este estudio está enfocado a identificar los subproductos de oxidación de los compuestos emergentes, y para propiciar la formación de éstos, se empleó una concentración de 1000 ng/l para la fortificación de cada uno de los tres compuestos. Posteriormente se llevaron a cabo los procesos de oxidación.

4.2 Tecnologías de oxidación

4.2.1 Cloro

Inicialmente se realizó la curva de punto de quiebre con el fin de encontrar la dosis de cloración óptima. Esta curva está fundamentada en que inicialmente el cloro añadido reacciona con la materia oxidable. Después de haber cubierto esta demanda, el cloro sigue reaccionando con el amoníaco para formar cloraminas, posteriormente las cloraminas se destruyen y una vez alcanzado el punto de quiebre, la adición de cloro resulta en un incremento proporcional del

cloro residual libre (CONAGUA, 2007). La Figura 4.3 muestra la curva teórica para el punto de quiebre.

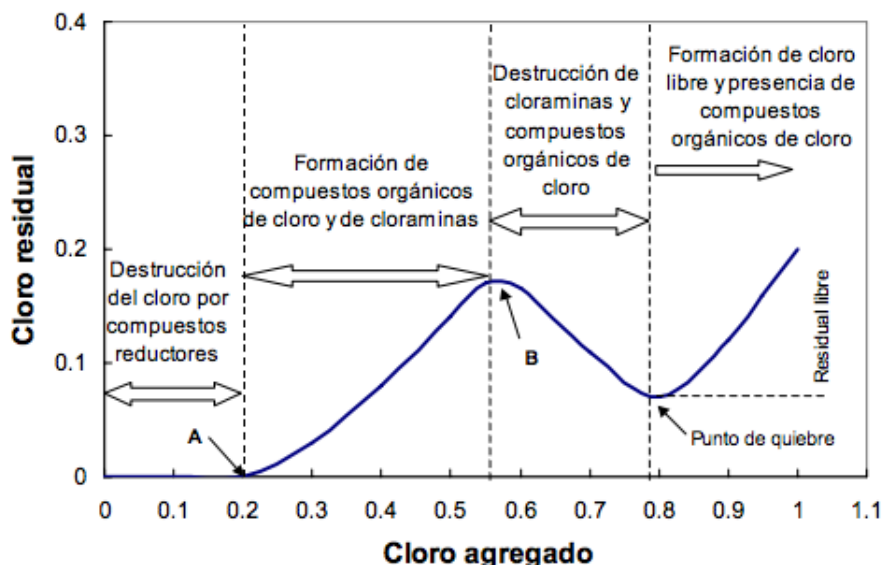


Figura 4.3 Curva teórica de la cloración a punto de quiebre (CONAGUA, 2007)

Para el tiempo de cloración CONAGUA (2007) menciona que éste generalmente se fija en 10 minutos para agua potable. Por esta razón se empleó un tiempo de contacto de 10 minutos para la realización de los experimentos. Para analizar el cloro libre se empleó la técnica que se menciona a continuación.

Análisis de cloro libre

El análisis de cloro libre se llevó a cabo mediante el método HACH 8021 equivalente al Método Estándar 4500-Cl G y aceptado por la USEPA para el análisis de agua potable y residual. Se emplearon las almohadillas HACH para análisis de cloro libre (Cat. 2105569). En esta técnica, el cloro libre en la muestra (ácido hipocloroso e ion hipoclorito) reacciona inmediatamente con el indicador DPD (N,N-dietil-p-fenilendiamina) formando un color magenta proporcional a la concentración de cloro libre en la muestra. El rango de aplicación de este método es de 0 – 2 mg/l. La Figura 4.4 muestra el procedimiento para la determinación.

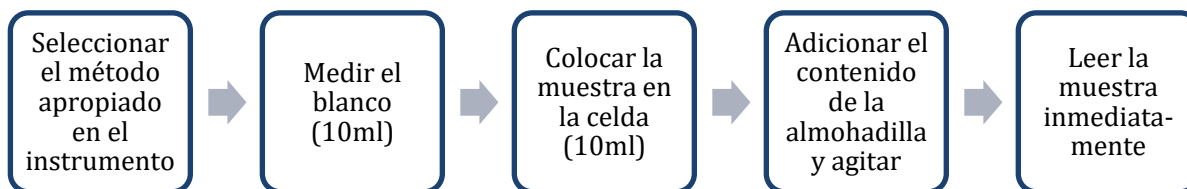


Figura 4.4 Procedimiento HACH para el análisis de cloro libre

4.2.2 Ozono

Los experimentos de oxidación con ozono se realizaron en una unidad de oxidación compuesta por un separador de aire (Airsep modelo AS-12, USA), un generador de ozono Labo 76 (Emery Trailigaz, USA), una columna de burbujeo de vidrio como contactor gas-líquido y al final una unidad de destrucción catalítica donde el excedente de ozono es transformado nuevamente a oxígeno para que sea liberado de forma segura al ambiente. El oxidante es inyectado en el fondo de la columna de contacto por medio de difusores de vidrio de placa porosa. Durante la operación en modo semicontinuo el reactor opera por lote con respecto a la fase líquida y de manera continua con respecto a la fase gas. El contacto de ambas fases (gas-liquido) se favorece mediante la recirculación de la fase líquida y mediante la alimentación del gas a contracorriente. La Figura 4.5 muestra el sistema de oxidación empleado en el laboratorio y posteriormente se describen los parámetros de control de la prueba de oxidación.

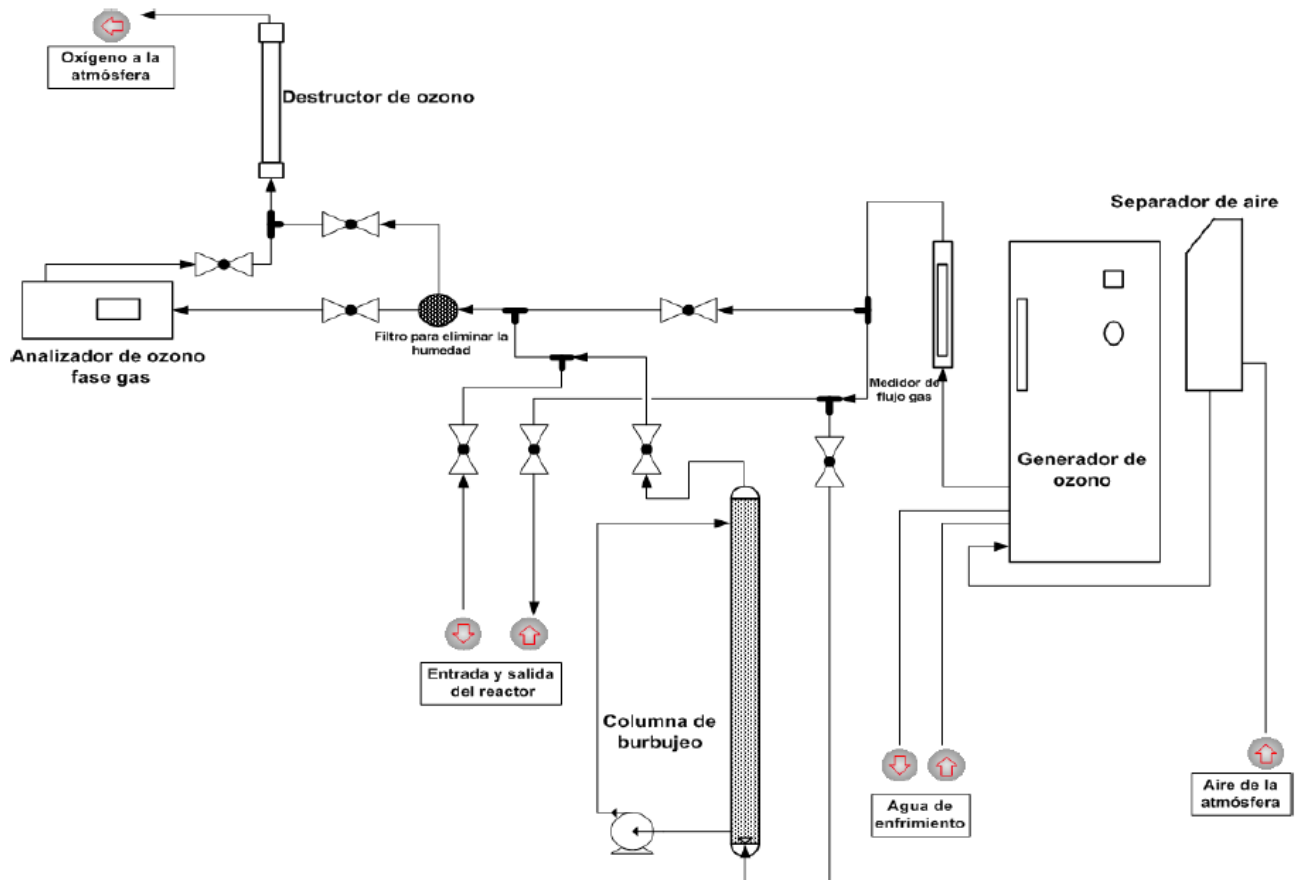


Figura 4.5 Sistema experimental de oxidación con ozono (Monje, 2010)

Parámetros de control de la prueba de oxidación

- Concentración de ozono en fase gas

Para determinar las concentraciones de ozono en fase gas se empleó el método yodométrico, en el cual el ozono gaseoso es absorbido en una solución neutra o alcalina de ioduro de potasio (KI), posteriormente la solución es acidificada y los iones de yodo libre (I_2) se titulan con una solución reductora de tiosulfato de sodio ($Na_2S_2O_3$). Finalmente se calcula la concentración de ozono en fase gas utilizando la Ecuación 4.1.

$$C_g = \frac{(T)x(N)(24)}{(V_{gas})} \quad (Ec. 4.1)$$

Donde:

C_{ge} ó C_{gs} : Ozono en fase gas a la entrada o salida del reactor (mg/l)

T: ml de tiosulfato de sodio consumidos

N: Normalidad del tiosulfato de sodio

24: Factor de corrección (1ml de tiosulfato de sodio equivale a 24 mg de ozono)

V_{gas} : Volumen de gas que se deja pasar

- Concentración de ozono en fase líquida

Para determinar la concentración de ozono transferida a la fase líquida se empleó el método colorimétrico de índigo, el cual relaciona la disminución de la absorbancia con el incremento de la concentración de ozono, debido a que el oxidante actúa sobre el reactivo de índigo decolorando la solución. La disminución de absorbancia es determinada mediante un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm. Posteriormente la concentración de ozono en fase líquida se obtiene mediante la Ecuación 4.2.

$$C_r = \frac{(A_b - A_m)x(100)}{(0.42)x(V_m)x(C)} \quad Ec. 4.2$$

Donde:

C_r : Concentración de ozono residual en fase acuosa

A_b : Absorbancia del blanco

A_m : Absorbancia de la muestra

V_m : Volumen de muestra (ml)

C: Recorrido de la luz en la celda (cm)

Balance de masa

Para conocer la dosis de ozono aplicada (DOA), la dosis de ozono transferida (DOT), la dosis de ozono consumida (DOC), así como el porcentaje de eficiencia de transferencia del ozono (ET) durante las pruebas de oxidación es necesario realizar un balance de masa en el reactor.

A continuación se describen las Ecuaciones (4.3-4.6) que se utilizan para el balance, cuyos resultados se muestran en el Anexo 1.

$$DOA = \frac{C_{ge} Q_g t}{V_r} \quad (Ec. 4.3)$$

$$DOT = \frac{Q_g(C_{ge} - C_{gs}) t}{V_r} \quad (Ec. 4.4)$$

$$DOC = \frac{Q_g(C_{ge} - C_{gs}) t}{V_r} - C_r \quad (Ec. 4.5)$$

$$ET = \frac{Q_{ge} - C_{gs}}{C_{ge}} \times 100 \quad (Ec. 4.6)$$

Donde:

DOA: Dosis de ozono aplicada (mg/l)

DOT: Dosis de ozono transferida (mg/l)

DOC: Dosis de ozono consumida (mg/l)

ET: Eficiencia de transferencia (%)

C_{ge} : Concentración de ozono en fase gas a la entrada del reactor (mg/l)

C_{gs} : Concentración de ozono en fase gas a la salida del reactor (mg/l)

C_r : Concentración de ozono en la fase líquida (mg/l)

Q_g : Flujo de gas ozono (l/min)

V_r : Volumen del reactor (l)

t: Tiempo de ozonación (min)

4.3 Diseño experimental

4.3.1 Cloro

Para obtener la dosis óptima de cloro se realizó la curva de punto de quiebre. Para esto, a las muestras de agua se agregaron las concentraciones de cloro mostradas en la Tabla 4.3 (por triplicado) y posteriormente se midió el cloro residual en cada una de ellas a los 10 minutos de haber dosificado.

Tabla 4.3 Concentraciones de cloro para la curva de punto de quiebre

Concentraciones de cloro añadidas (mg/l)													
0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0	1.3	1.5	1.7	2.0

4.3.2 Ozono

Para la oxidación con ozono se utilizó la metodología de superficie de respuesta mediante un diseño factorial 3^2 . Los diseños factoriales consisten en un análisis de varianza donde se prueban dos o más factores, los cuales tienen dos o más niveles. Una vez definidos los factores y los niveles, se definen los tratamientos. Cada tratamiento es una combinación de los factores y niveles. En este estudio se emplearon dos factores (tiempo de contacto y dosis de ozono) con tres niveles cada uno, los cuales se muestran en la Tabla 4.4. Los tratamientos para las pruebas se muestran en la Tabla 4.5. Los experimentos se llevaron a cabo por duplicado. El diseño y el análisis de los resultados se realizó con el software Statgraphics Centurion XVII.

Tabla 4.4 Factores y niveles del diseño experimental para la oxidación con ozono

Factores	Nivel bajo	Nivel medio	Nivel alto
Tiempo (min)	1	5	10
Dosis ozono en fase gas (mg/l)	1	2	3

Tabla 4.5 Tratamientos del diseño factorial para la oxidación con ozono

Dosis ozono en fase gas (mg/l)	1	1	1	2	2	2	3	3	3
Tiempo (min)	1	5	10	1	5	10	1	5	10

4.4 Determinación de EDC y subproductos mediante CG-MS

Los compuestos emergentes en el agua fortificada se cuantificaron a través de CG-MS. Para esto se realizó previamente una extracción en fase sólida (SPE) con cartuchos C18 acondicionados con metanol. Los subproductos de las oxidaciones se identificaron mediante CG-MS. Las condiciones analíticas para la cuantificación y detección de los EDC y subproductos se muestran en la Tabla 4.6. Este análisis químico está acoplado a la determinación de la actividad estrogénica que se explica a continuación.

Tabla 4.6 Condiciones de análisis mediante GC-MS

Cromatógrafo de gases	Agilent Technologies 6890
Temperatura del inyector	250 °C
Gas de arrastre	Helio
Columna	DB5-MS (30m long X 0.25mm i.d. X 0.25 µm film)
Programa de temperaturas	100 °C por 1 min; 20 °C/min hasta 280°C; 280 °C por 10 min
Detector	Espectrómetro de masas Agilent modelo MS 5973
Temperatura del detector	280 °C

4.5 Determinación de la Actividad estrogénica mediante BLYES

La actividad estrogénica se analizó mediante la técnica BLYES. La cepa *Saccharomyces cerevisiae* modificada genéticamente (BLYES) utilizada para este ensayo está patentada. Dicha técnica fue desarrollada por Sanseverino (2005) y es aplicada en la Companhia Ambiental del Estado de Sao Paulo, Brasil (CETESB) como análisis de rutina en muestras de agua para determinar la actividad estrogénica. El proceso de análisis se detalla a continuación.

Cultivo de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* BLYES

La cepa *S. cerevisiae* BLYES es cultivada en medio Yeast Minimal complementado (YMM leu-, ura- comp), el cultivo se realiza en placas adicionadas con 1.3% de agar noble (30°C). El procedimiento para la preparación del medio se muestra en el Anexo 2.

A partir de los cultivos en placa, se preparan cultivos stock sembrando las cepas de *S. cerevisiae* BLYES en YMM leu-, ura- comp, los cuales se incuban por 18-24 horas a 30°C con agitación constante a 200-250 rpm, condiciones generalmente idóneas para obtener una densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀) de 1.0. Los cultivos stock se conservan en 40% glicerol (preparado previamente con agua). Para ello se distribuye 1 ml del cultivo más 1 ml de glicerol al 40% en viales para criogénesis que son almacenados a -70°C. Los cultivos stock se usan para llevar a cabo las pruebas conforme sea requerido.

Para realizar la prueba de BLYES, el cultivo stock contenido en un vial de criogénesis (previamente descongelado) es inoculado en 30 ml de YMM leu-, ura- comp usando frascos ámbar previamente esterilizados. Se incuba durante toda la noche (18-20 horas) a 30°C en agitación constante a 200-250 rpm, condiciones generalmente idóneas para obtener una DO₆₀₀ de 1.0.

Extracción de los compuestos emergentes

Los compuestos con posible actividad estrogénica son extraídos a partir de muestras de agua, mediante su elución con metanol utilizando cartuchos C18 (500 mg) para extracción en fase sólida.

Para llevar a cabo la extracción, se acondiciona el cartucho adicionando 6 ml de metanol, el cual permanece por 15 minutos en el cartucho y posteriormente es eluido aplicando vacío. Un volumen de 1000 ml de muestra es filtrado a través del cartucho con flujo lento a velocidad constante (20 Hg de vacío). A continuación, se hace la extracción de los compuestos emergentes retenidos en la fase sólida del cartucho mediante la adición de 6 ml de metanol con flujo lento a velocidad constante aplicando vacío (Sodre et al., 2010). El extracto se concentra con nitrógeno gas hasta obtener un volumen de 1ml. Una vez extraídas las muestras pueden almacenarse máximo 90 días en refrigeración para su análisis.

Dilución de las muestras

El haber filtrado 1000 ml de agua permite tener una concentración inicial de muestra de 1000X. Las muestras son diluidas para obtener una concentración de 200X. A partir de la dilución 200X

se llevan a cabo diluciones en dos direcciones, esto con la finalidad de obtener más puntos intermedios entre cada dilución, de tal manera que se logre una gráfica más representativa. Dirección vertical 1:2 y dirección horizontal 1:10.

Diluciones verticales: para obtener una dilución 100X, a partir del vial 1 (200X) se transfieren 230 μ l de muestra a un vial 2 conteniendo 230 μ l de DMSO 4% (con ello se logra una concentración final de DMSO de 2%). Posteriormente se realiza el mismo procedimiento hacia el vial 3.

Diluciones horizontales: para obtener la dilución 20X, a partir del vial 2 se transfieren 24 μ l a un vial 4 conteniendo 216 μ l de DMSO, se realiza el mismo procedimiento del vial 4 al vial 7 para obtener una dilución 2X. Siguiendo el mismo procedimiento, a partir de la dilución 100X se obtienen las diluciones 10X y 1X. Y a partir de la dilución 50X, se obtienen las diluciones 5X y 0.5X. La Figura 4.6 muestra el esquema a seguir.

Curva estándar

Se preparan soluciones stock a partir de 17 β - estradiol, de tal manera que se obtengan diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} . A partir de la dilución 10^{-6} se preparan diluciones en dos direcciones conforme se representa en la Figura 4.7.

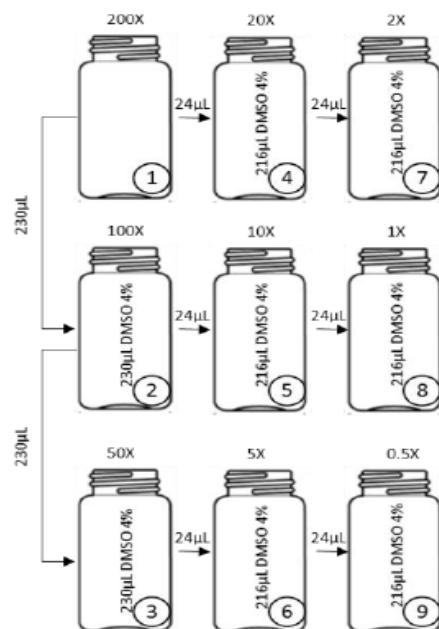


Figura 4.6 Esquema de diluciones para determinar la actividad estrogénica en muestras de agua

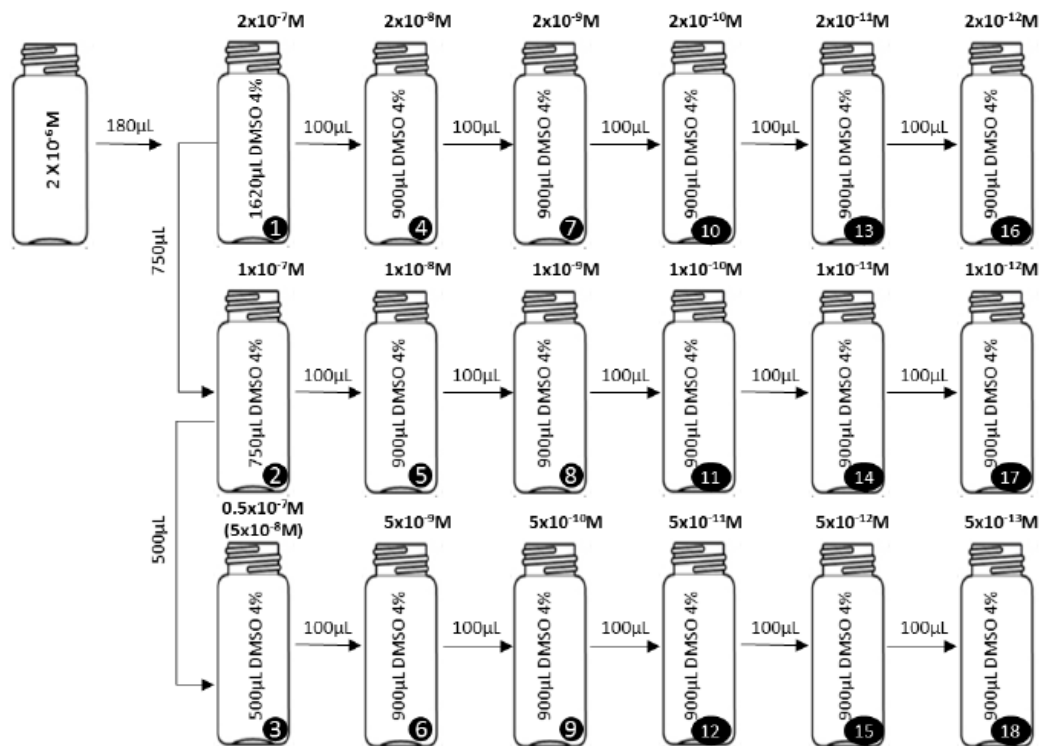


Figura 4.7 Esquema para la preparación de diluciones del estándar 17β-estradiol, utilizado como control positivo

Análisis BLYES

Utilizando una placa serológica blanca se adicionan 100 μl de cada una de las diluciones preparadas anteriormente. Para el caso de los controles se procede de la misma forma, pero utilizando 100 μl de agua ultrapura para el control negativo. Para el control positivo, 100 μl de 17β-estradiol son adicionados en la placa inoculando 18 pozos que correspondan a diluciones de 10^{-7} a 10^{-13} . Para un adecuado control en el llenado de las placas es recomendable seguir el esquema de la Figura 4.8.

Una vez todas las soluciones de prueba estén en la placa, se adicionan 100 μl del cultivo celular de *S. cerevisiae* BLYES DO₆₀₀ 1.0 a los pozos. Posteriormente, las placas son colocadas en un agitador y se incuban a 30°C durante 2 horas.

Lectura de las muestras (placas serológicas). Posterior a la incubación de las placas, se lleva a cabo la lectura de luminiscencia en un lector de microplacas (Biotek FLx800). El equipo hace la lectura de bioluminiscencia (una cuenta por segundo) versus la concentración de compuestos con actividad estrogénica.

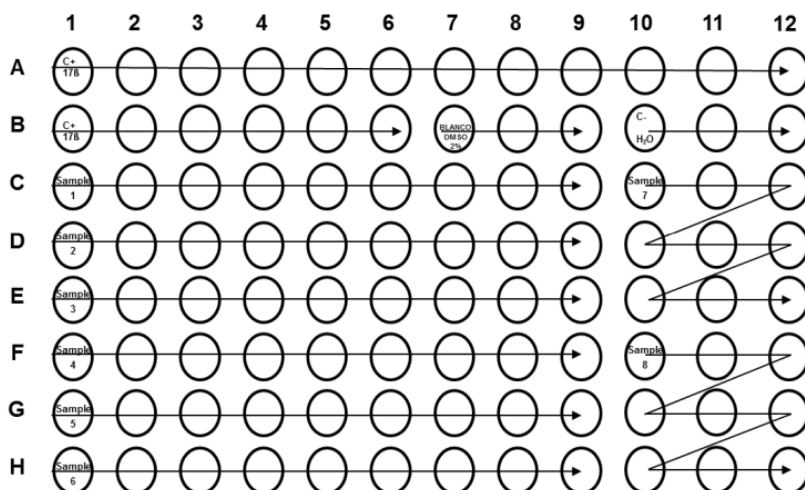


Figura 4.8 Esquema para el llenado de las placas serológicas

Análisis de datos. Los datos son registrados (plotted) en escala logarítmica generando una curva sigmoideal de componentes hormonalmente activos. Para ello, el equipo cuenta con un software especializado, el cual proporciona la lectura de luminiscencia que se refiere a la concentración en moles de 17β -estradiol. Los datos son exportados a un paquete estadístico o una hoja de Excel en la que se hace una regresión lineal y se calcula la concentración mínima inhibitoria que causa efecto al 50% de las muestras (CI50). Posteriormente, la concentración en moles se convierte a nanogramos por litro (ng/l) considerando las diluciones realizadas.

4.6 Evaluación de riesgos para la salud humana

Para evaluar el riesgo asociado con la exposición a los contaminantes estudiados se realizaron cálculos según la metodología de Evaluación de Riesgo Humano (HRA, por sus siglas en inglés) para los consumidores, descrita por Riva et al. (2018). La HRA se hizo considerando las sustancias individualmente y también en mezcla para evaluar el riesgo acumulativo. Por otra parte, se compararon los resultados de los análisis de la actividad estrogénica con la ingesta diaria de estrógenos en alimentos aceptable para humanos y las denominadas "concentraciones previstas sin efecto" en la vida silvestre acuática reportadas por Adeel et al. (2017).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para cubrir los objetivos propuestos se realizaron experimentos cuyos resultados se muestran en este numeral. Éstos se presentan a modo de Tablas y Figuras, entre las cuales se encuentran gráficas de dispersión con coeficiente de correlación, diagramas de Pareto, graficas de efectos principales, gráficas de superficie de respuesta y valores óptimos de los factores empleados.

5.1 Curva de punto de quiebre para cloro

Con el fin de encontrar la dosis óptima de cloro para los experimentos se realizó la curva de punto de quiebre empleando el agua de pozo. El intervalo de cloro analizado incluyó el rango establecido por la norma NOM-127-SSA1-1994. La Figura 5.1 muestra la curva obtenida.

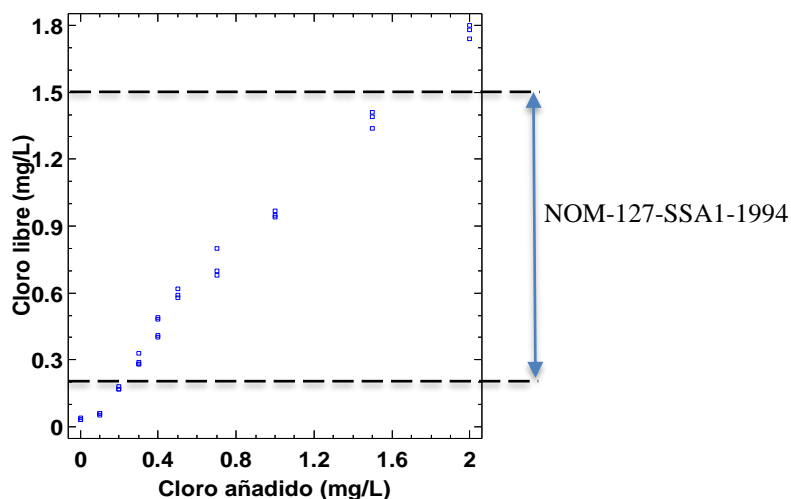


Figura 5.1 Curva de punto de quiebre para la cloración

La curva experimental obtenida no siguió el comportamiento de la curva teórica esperada (Figura 4.3), esto es debido a que el agua del pozo contiene poca materia oxidable y tiene cantidades no detectables de nitrógeno amoniacal por lo que la demanda de cloro es muy baja. Por consiguiente, la adición de cloro resultó en un incremento proporcional del cloro residual libre en el rango analizado. De hecho, la gráfica obtenida tiene un buen ajuste a un modelo lineal con un coeficiente de correlación de 0.994, una pendiente de 0.887 y un intercepto de 0.049. El análisis de ANOVA arroja un valor-P menor que 0.05, lo que significa que existe una relación estadísticamente significativa entre el cloro libre y el cloro añadido con un nivel de confianza del 95%. Se decidió utilizar entonces dosis de cloro de 0.2, 1.0 y 1.5 mg/l para los experimentos, con el fin de cubrir el rango de cloro residual establecido por la norma NOM-127-SSA1-1994 que es de 0.2 – 1.5 mg/l. A continuación se muestran los resultados de los análisis de remoción.

5.2 Remoción de BPA, 4NP y TCS

El agua del pozo de la Facultad de Química resultó idónea para el estudio ya que pudo ser empleada como blanco por no contener los analitos. Se realizó una fortificación individual a una concentración de 1000 ng/l con cada uno de los EDC. Esto permite conocer el efecto que tendrían los procesos de oxidación con ozono o cloro en la remoción, los subproductos formados y la actividad estrogénica, si dichos compuestos estuvieran presentes en el agua. Experimentalmente las muestras fortificadas tuvieron concentraciones de 904 ± 11 , 967 ± 22 y 1064 ± 44 ng/l de BPA, 4NP y TCS, respectivamente. Las curvas de calibración para cada compuesto se muestran en el Anexo 3.

La Tabla 5.1 muestra los parámetros de desempeño del método analítico empleado. El método fue lineal de 5 a 1000 ng/l para BPA, 4NP y TCS con coeficientes de determinación R^2 mayores a 0.98. El límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC) se calcularon según la guía Eurachem (Magnusson y Ornemark, 2014), siendo de 5 y 15 ng/l, respectivamente. Las recuperaciones para las muestras fortificadas variaron entre 90.4 y 106.4%.

Tabla 5.1 Desempeño del método analítico

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Iones característicos (m/z)	Linealidad (R^2)	LD (ng/l)	LC (ng/l)	Recuperación (%)
BPA	9.9	119, 213, 214, 228	0.984	5	15	90.4
4NP	8.3	107, 108, 220, 221	0.995	5	15	96.7
TCS	9.6	146, 218, 288, 290	0.983	5	15	106.4

A continuación se muestran los resultados obtenidos para la remoción de los compuestos durante los procesos de oxidación con cloro y ozono.

5.2.1 Cloro

Para las pruebas de cloración se emplearon dosis de cloro de 0.2, 1.0 y 1.5 mg/l y un tiempo de contacto de 10 minutos en cada caso. Los ensayos se realizaron por duplicado. El cloro residual se descompuso mediante la adición de tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$). Posteriormente se realizó la extracción en fase sólida (SPE), la concentración con nitrógeno y el análisis por CG-MS. La Figura 5.2 muestra los resultados obtenidos en la remoción de los compuestos emergentes, el literal a) representa la reducción de las concentraciones de los contaminantes después de aplicarse las diferentes dosis de cloro y el b) muestra los porcentajes de remoción en cada caso.

Los resultados muestran que una dosis de cloro de 0.2 mg/l con un tiempo de contacto de 10 minutos permitió remover 81.2% de BPA, 95.8% de 4NP y 92.9% de TCS. Con dosis de cloro de 1.0 mg/l las remociones se incrementaron en casi 5% para BPA, 0.5% para 4NP y más del 5.7% para TCS, con respecto a la dosis de 0.2 mg/l. Finalmente, para la dosis de 1.5 mg/l las remociones se incrementaron en 13.5%, 1.5% y más del 5.7%, con respecto a la dosis de 0.2 mg/l. Estos resultados coinciden con autores como Hu et al. (2002) quienes mencionan que el BPA reacciona rápidamente con el hipoclorito de sodio y que alrededor del 80% de éste había desaparecido a los 10 minutos de tiempo de reacción. En otro artículo, los mismos autores (Hu et al., 2002b) encontraron que el 4NP reacciona rápidamente con el hipoclorito de sodio y que aproximadamente el 84% había desaparecido a los 10 minutos de cloración. Para el TCS se reportan remociones con cloro entre el 94% y el 99.9% (Chen et al., 2012).

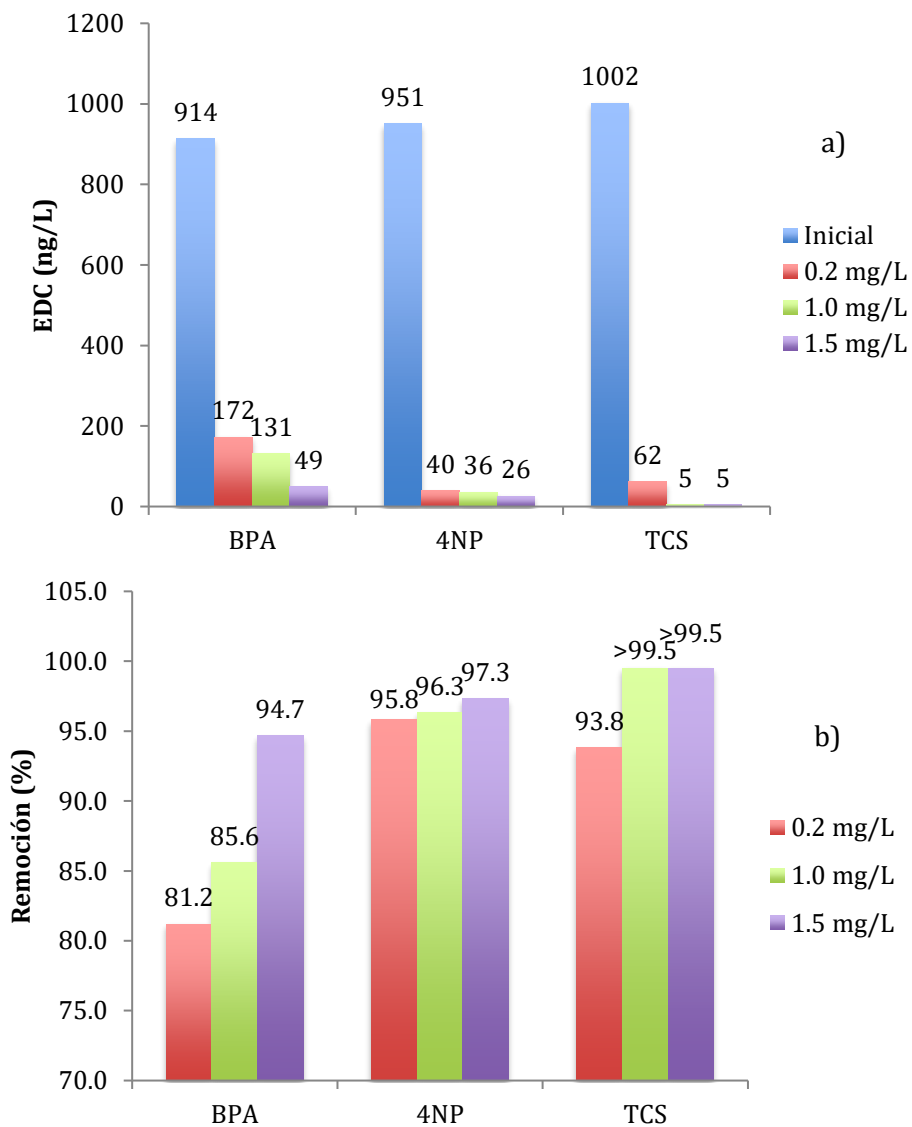


Figura 5.2 a) Reducción de las concentraciones de BPA, 4NP y TCS después de la cloración
b) Porcentajes de remoción en cada caso

5.2.2 Ozono

Se emplearon dosis aproximadas de 1, 2 y 3 mg/l de ozono en fase gas a la entrada (C_{ge}) y tiempos de contacto de 1, 5 y 10 minutos para cada EDC. El ozono residual en las muestras se eliminó mediante la adición de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. La Figura 5.3 muestra una imagen del proceso de ozonación. Posteriormente se realizó la extracción en fase sólida SPE y la concentración con nitrógeno para finalmente hacer los análisis por duplicado con CG-MS.

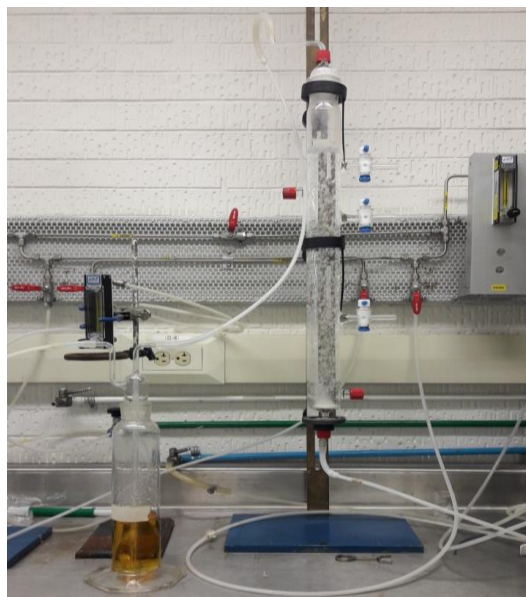


Figura 5.3 Montaje de los experimentos con ozono

En el Anexo 1 se muestra el balance de masa correspondiente a las pruebas de ozonación. El balance de masa permite conocer la dosis de ozono que se aplicó en cada uno de los experimentos (Dosis de Ozono Aplicada, DOA), qué parte de esta fue realmente transferida al agua (Dosis de Ozono Transferida, DOT), qué cantidad de la dosis transferida fue consumida por el agua (Dosis de Ozono Consumida, DOC) y cuál es la eficiencia de transferencia (ET) teniendo en cuenta las concentraciones de ozono en fase gas en la entrada y salida del reactor. En la Tabla del Anexo 1 se observa que las eficiencias de transferencia estuvieron entre 50-86%. Los principales factores que afectan el rendimiento de la transferencia de ozono son: las características del sistema de contacto (difusor de placa porosa y flujo del gas a contracorriente), las características del gas de alimentación (concentración, tamaño de burbuja) y las características del agua (temperatura, pH y calidad) (Gramcko, 2010). La Tabla 5.2 muestra los resultados promedio obtenidos en la remoción de los compuestos emergentes con ozono.

Tabla 5.2 Remoción de BPA, 4NP y TCS con ozono

EDC	C _{ge} (mg/l)	Tiempo (min)	Remoción (%)	Remoción promedio (%)
BPA	0.96	1	73.7	77.0
		5	77.7	
		10	79.5	
	1.92	1	88.3	84.2
		5	80.1	
		10	84.2	
	2.88	1	92.6	96.9
		5	> 99.4	
		10	98.8	
4NP	1.08	1	91.4	94.1
		5	93.9	
		10	97.1	
	2.04	1	93.8	97.2
		5	98.2	
		10	> 99.5	
	3.06	1	> 99.5	> 99.5
		5	> 99.5	
		10	> 99.5	
TCS	0.96	1	94.8	94.5
		5	94.3	
		10	94.5	
	2.04	1	95.0	95.7
		5	96.0	
		10	96.1	
	2.88	1	97.3	98.0
		5	97.2	
		10	> 99.6	

Adicionalmente, para los experimentos realizados con TCS se midió el pH de las muestras a lo largo de los tratamientos con ozono, los resultados se muestran en la Tabla 5.3. El pH tuvo un aumento desde 7.07 (inicial) hasta 8.39, lo cual evidencia que el proceso de ozonación se llevó a cabo vía molecular (pH neutro) y vía radical (causa un incremento del pH por la generación de radicales OH⁻). Esta situación es acorde con la literatura que dice que, en la ozonación de agua natural y residual, se llevan a cabo simultáneamente tanto reacciones directas como indirectas y que la contribución realizada por las reacciones indirectas (a través del ataque radical) aumenta con el incremento del pH (Ning et al., 2007b). Los mismos autores demostraron que las dos vías de oxidación son importantes en la degradación de alquifenoles a

un pH neutro y concluyen que con un pH mayor a 7, el ozono aplicado se descompone en la solución, produciendo especies que son responsables de la mayor parte de la degradación de estos compuestos.

Tabla 5.3 Comportamiento del pH del agua con TCS durante la ozonación

Cge (mg/l)	Tiempo (min)	pH
0.96	1	7.66
	5	8.32
	10	8.41
2.04	1	7.88
	5	8.14
	10	8.41
2.88	1	8.07
	5	8.32
	10	8.39

Las Tablas 5.4, 5.5 y 5.6 muestran el análisis de varianza (ANOVA) para la remoción de BPA, 4NP y TCS, respectivamente. Este análisis permite evaluar la importancia de uno o más factores al comparar las medias de la variable de respuesta en los diferentes niveles de los factores. Todos los efectos e interacciones que presentan un valor-P menor a 0.05 son significativos con un nivel de confianza del 95.0%. En el caso del BPA sólo un efecto, la concentración de ozono en fase gas (Cge), es significativo; el modelo explica el 90.1% de las variables que afectan la remoción de este compuesto. Para el 4NP tanto la Cge como el tiempo de contacto son factores significativos y el modelo explica el 94.8% de las variables. Para el TCS sólo la Cge es significativa en su remoción y el modelo explica el 95.9% de las variables.

Tabla 5.4 Análisis de varianza para la remoción de BPA

Fuente	Suma de Cuadrados	Razón-F	Valor-P
A:Concentración ozono	598.002	26.10	0.0145
B:Tiempo	10.4017	0.45	0.5487
AA	15.125	0.66	0.4760
AB	0.04	0.00	0.9693
BB	0.405	0.02	0.9027
		R ²	90.1

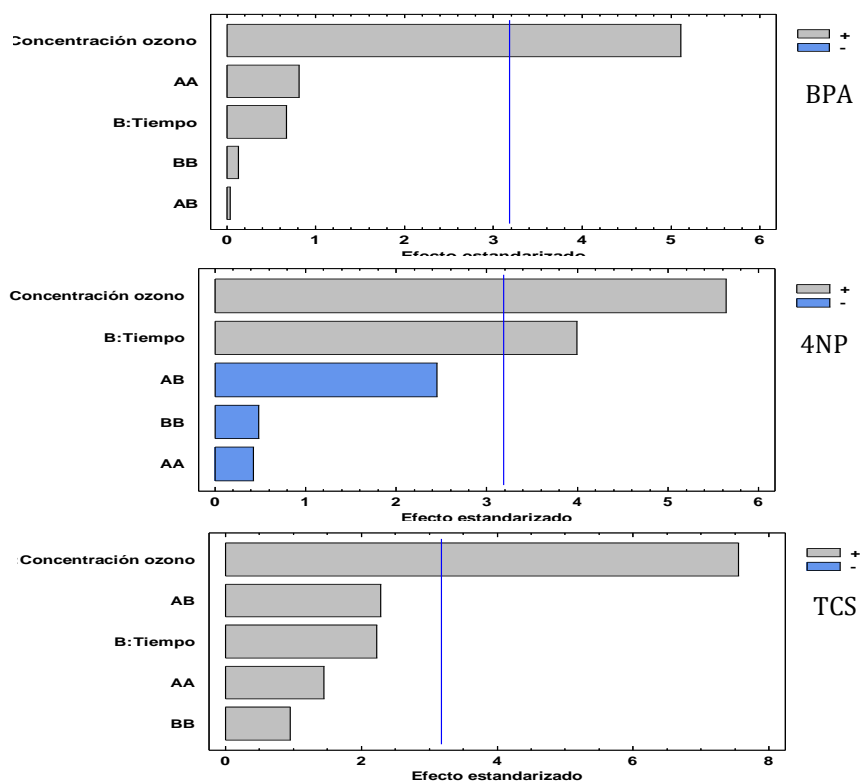
Tabla 5.5 Análisis de varianza para la remoción de 4NP

Fuente	Suma de Cuadrados	Razón-F	Valor-P
A:Concentración ozono	43.2017	31.84	0.0110
B:Tiempo	21.66	15.96	0.0281
AA	0.245	0.18	0.6995
AB	8.1225	5.99	0.0920
BB	0.32	0.24	0.6605
		R ²	94.8

Tabla 5.6 Análisis de varianza para la remoción de TCS

Fuente	Suma de Cuadrados	Razón-F	Valor-P
A:Concentración ozono	18.375	56.96	0.0048
B:Tiempo	1.60167	4.96	0.1122
AA	0.680556	2.11	0.2423
AB	1.69	5.24	0.1061
BB	0.293889	0.91	0.4103
		R ²	95.9

La influencia en la respuesta del sistema ante cambios en las variables puede ser observada claramente y de manera estandarizada en los diagramas de Pareto (Figura 5.4), en los cuales, se confirma que para el BPA y el TCS la Cge es la variable que mayor predominio tiene sobre la respuesta, mientras que para el 4NP tanto la Cge como el tiempo influyen significativamente en la remoción. Las interacciones que no sobrepasan el límite estadístico del valor t representan un aporte insignificante, por lo cual ninguna aparece en la ecuación de regresión que representa a cada sistema (Tabla 5.7). Estos resultados coinciden con otros estudios que reportan que el aumento de la Cge incrementa la remoción de BPA (Deborde et al., 2008; Xu et al., 2007) y TCS (Chen et al., 2012; Suarez et al., 2007). En el caso del 4NP se ha reportado que el incremento de la Cge (Sun et al., 2008; Choi et al., 2006) y del tiempo de exposición (Ning et al., 2007) favorecen su remoción.

**Figura 5.4** Diagramas de Pareto para la remoción de BPA, 4NP y TCS

En la Figura 5.5 se muestran las gráficas de efectos principales para la remoción de BPA, 4NP y TCS. A medida que la pendiente sea mayor, es decir, que la diferencia entre el nivel bajo y alto es más grande, el efecto sobre la respuesta es más influyente. En el BPA, si se observa la interacción de la relación de Cge-tiempo, se puede concluir que las condiciones favorables del proceso de remoción se dan a una Cge y tiempos altos. Para el caso del 4NP, se aprecia el mismo comportamiento, sin embargo, el efecto del tiempo sobre la remoción es más influyente (mayor pendiente). Para el TCS la remoción se incrementa al aumentar la Cge y el tiempo de contacto. Es preciso aclarar que estos efectos son representativos para los intervalos establecidos para cada una de las variables con las cuales se trabajó (Muñoz et al., 2009).

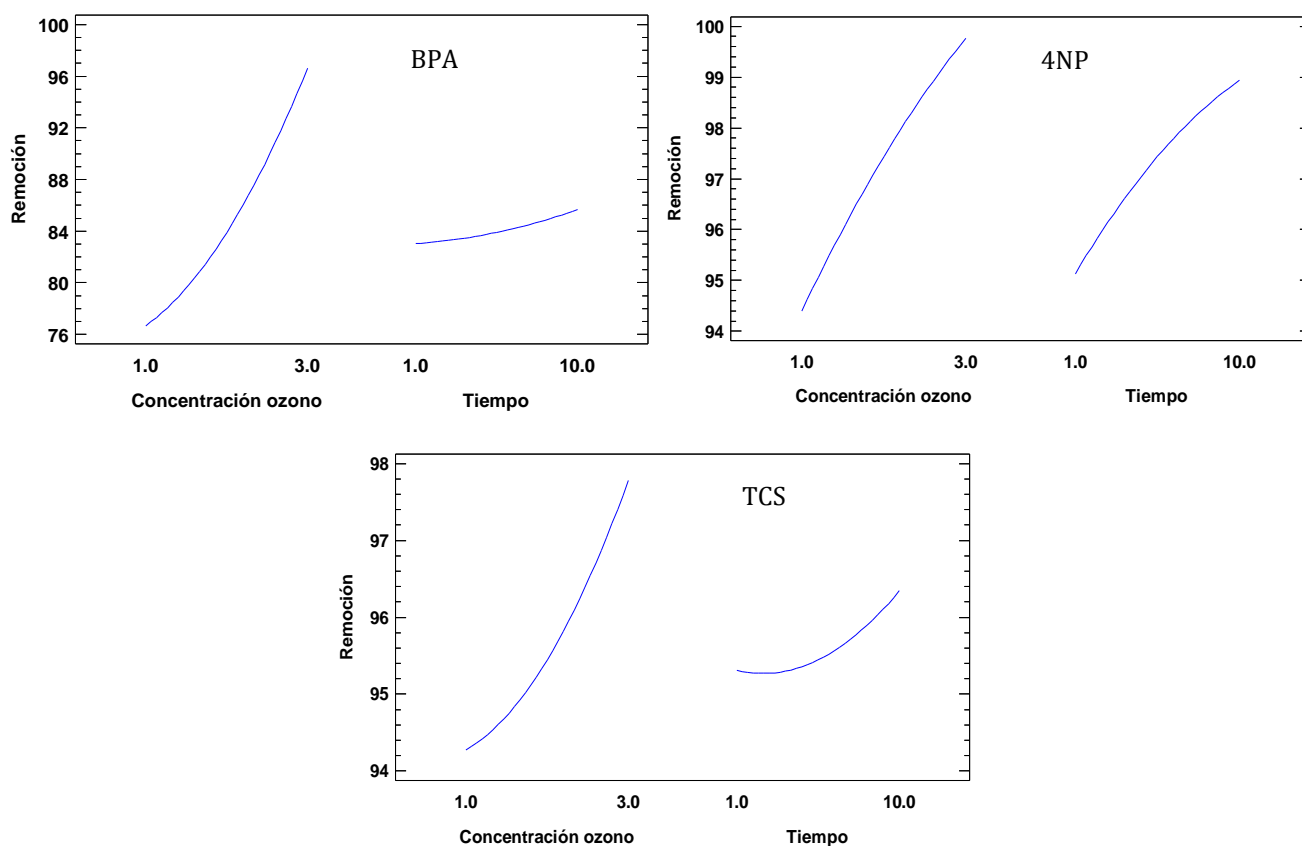


Figura 5.5 Gráficas de efectos principales para la remoción de BPA, 4NP y TCS

Las gráficas de superficie de respuesta y de contornos permiten visualizar conjuntamente el efecto de los diferentes factores en la variable de respuesta. La Figura 5.6 muestra estas gráficas para la remoción de BPA, 4NP y TCS. Con éstas se demuestra que para los tres EDC la Cge es la variable de mayor influencia. El tiempo también influye positivamente en la remoción, siendo más marcado su efecto en 4NP y TCS. Con las gráficas de contornos se puede evidenciar la interacción de los factores en la remoción, la cual se ve favorecida a Cge y tiempos altos para los tres compuestos (área superior derecha en la gráfica).

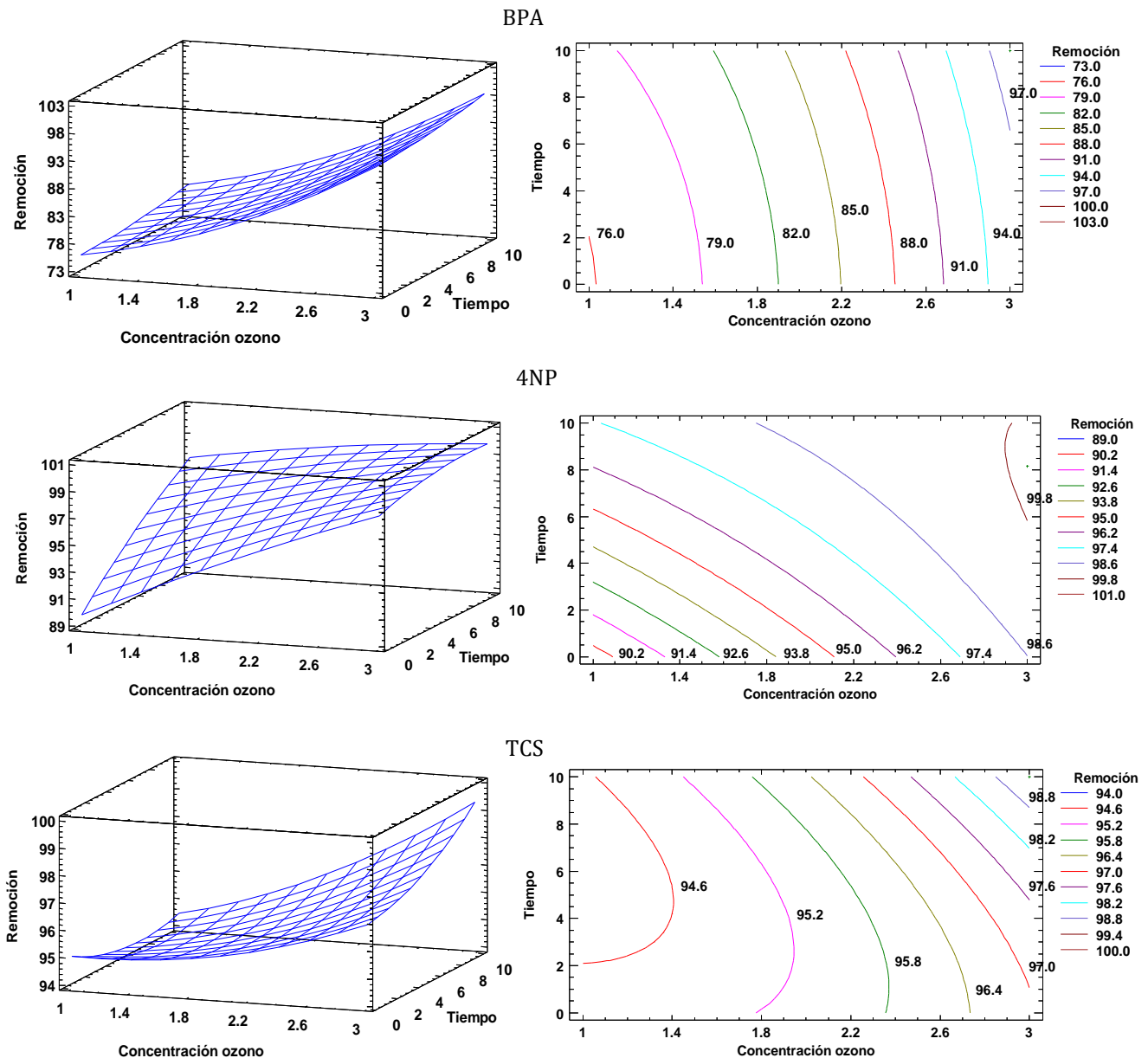


Figura 5.6 Gráficas de superficie de respuesta y contornos para la remoción de BPA, 4NP y TCS

La metodología de superficie de respuesta es un conjunto de técnicas matemáticas utilizadas en el tratamiento de problemas en los que una respuesta de interés está influenciada por varios factores de carácter cuantitativo. El propósito de estas técnicas es determinar el modelo matemático que mejor se ajusta a los datos obtenidos (Del Ángel Sánchez et al., 2015). Las ecuaciones de regresión del modelo ajustado para la remoción de BPA, 4NP y TCS se muestran en la Tabla 5.7. El objetivo final de esta metodología es establecer los valores de los factores que optimizan el valor de la variable de respuesta. Estos valores óptimos para maximizar la remoción de los tres compuestos se muestran en la Tabla 5.8.

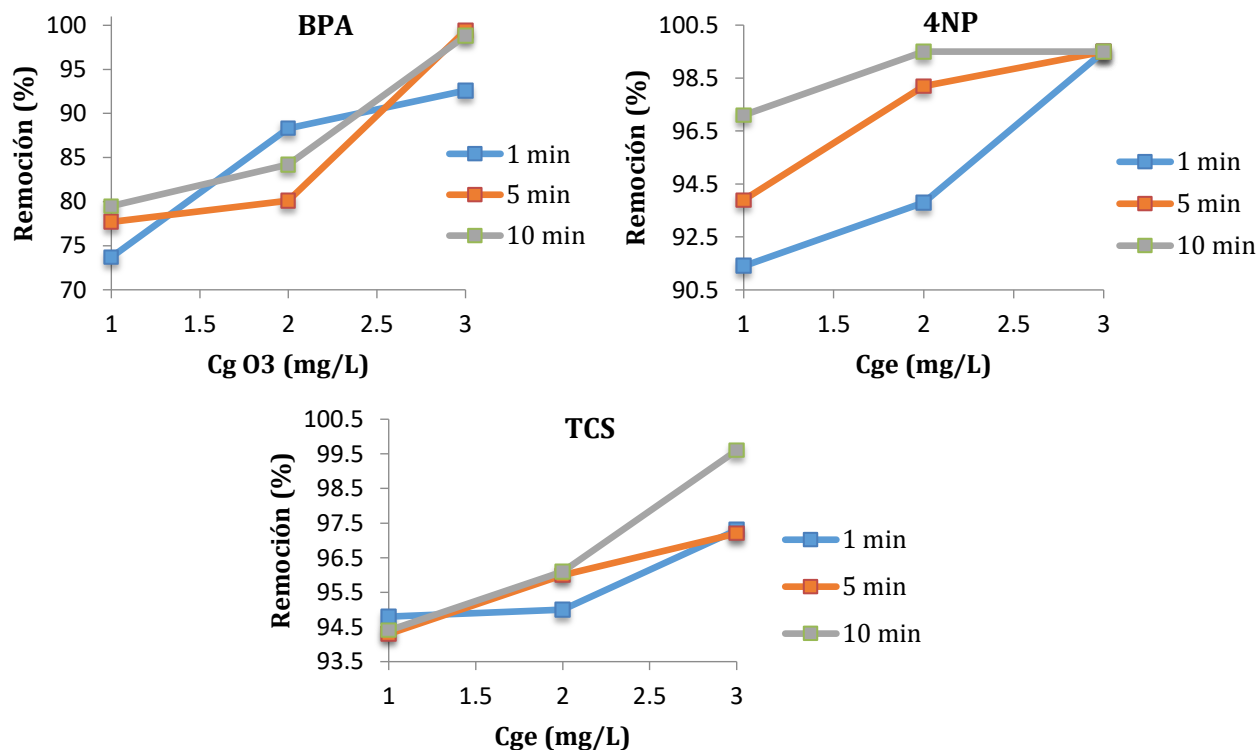
Tabla 5.7 Ecuaciones del modelo matemático ajustado para la remoción de BPA, 4NP y TCS

EDC	Ecuación del modelo ajustado
BPA	$\text{Remoción} = 74.2407 - 1.13889 \cdot \text{Concentración ozono} + 0.0037037 \cdot \text{Tiempo} + 2.75 \cdot \text{Concentración ozono}^2 + 0.0222222 \cdot \text{Concentración ozono} \cdot \text{Tiempo} + 0.0222222 \cdot \text{Tiempo}^2$
4NP	$\text{Remoción} = 84.2636 + 5.825 \cdot \text{Concentración ozono} + 1.27284 \cdot \text{Tiempo} - 0.35 \cdot \text{Concentración ozono}^2 - 0.316667 \cdot \text{Concentración ozono} \cdot \text{Tiempo} - 0.0197531 \cdot \text{Tiempo}^2$
TCS	$\text{Remoción} = 95.8078 - 1.37778 \cdot \text{Concentración ozono} - 0.382305 \cdot \text{Tiempo} + 0.583333 \cdot \text{Concentración ozono}^2 + 0.144444 \cdot \text{Concentración ozono} \cdot \text{Tiempo} + 0.01893 \cdot \text{Tiempo}^2$

Tabla 5.8 Valores óptimos de los factores para maximizar la remoción

Factores	BPA	4NP	TCS
Tiempo (min)	10	8.2	10
C _{ge} (mg/l)	3	3	3
Remoción (%)	98.5	99.9	99.3

La Figura 5.7 muestra el comportamiento de la remoción con el incremento del tiempo y de la concentración de ozono en fase gas (C_{ge}) en los experimentos de ozonación para los tres compuestos, esta remoción en todos los casos es directamente proporcional a la concentración y tiempo de ozono aplicado.

**Figura 5.7** Remoción de los contaminantes emergentes durante la ozonación

Finalmente, la Figura 5.8a) muestra la disminución de la concentración inicial de fortificación con cada condición de ozonación y la Figura 5.8b) su equivalencia en porcentaje de remoción para cada caso.

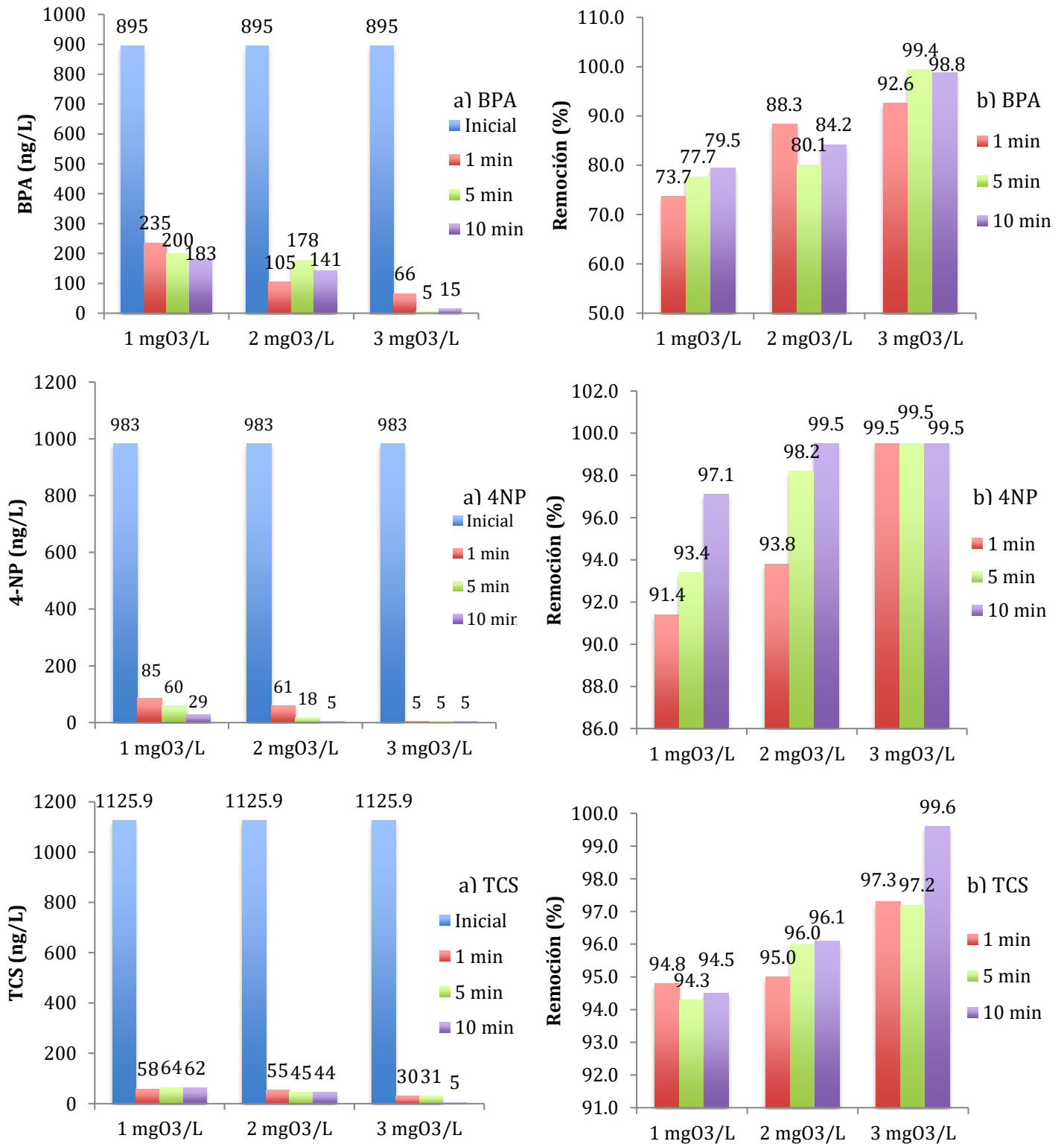


Figura 5.8 Concentraciones (a) y remociones (b) de los EDC con ozonación

Los resultados obtenidos en este estudio coinciden con lo reportado en la literatura. Para el caso del BPA con las mejores condiciones (3mg/l de ozono y 10min de tiempo de contacto) se obtiene cerca del 99% de remoción. Garoma et al. (2010) encontraron que la concentración residual de BPA estuvo por debajo de su límite de detección (5µg/l) después de 5 minutos de ozonación, ellos emplearon una dosis de ozono de 10mg/l y muestras sintéticas de agua desionizada con una concentración de fortificación de BPA de 11.6mg/l. Para el 4NP se encontró que la dosis de ozono de 3mg/l fue suficiente para remover más del 99% a cualquier tiempo de ozonación, determinándose a través del software 8.2 minutos como tiempo óptimo. Sun et al. (2008) emplearon muestras sintéticas con 0.4mg/l de 4NP y dosis de ozono de 1.5mg/l, determinando que en 10 minutos de ozonación había desaparecido prácticamente todo el 4NP. Finalmente, para el TCS se encontró que las mejores condiciones (3mg/l de ozono y 10min de contacto) permitieron remover más del 99% del contaminante. Chen et al. (2012) encontraron remociones del 94-99.9% en agua sintética fortificada entre 1.4-4.5mg/l de TCS y concentraciones de ozono entre 1.1-1.7mg/l.

Posterior a los análisis de remoción, se procedió a analizar cualitativamente subproductos generados en las oxidaciones con cloro y ozono. Dicho análisis se muestra en el siguiente numeral.

5.3 Subproductos de oxidación

5.3.1 Cloro

Se ha reportado que el mecanismo de reacción entre los compuestos fenólicos y el hipoclorito de sodio procede a través del ataque electrofílico. De acuerdo con este mecanismo, la presencia de una carga negativa en el sustrato nucleofílico facilitará la reacción (Hu et al., 2002). Para identificar los subproductos se emplearon los extractos concentrados obtenidos en las pruebas de remoción. Se inyectó un microlitro de muestra para el análisis por CG-MS en modo Scan.

- **BPA**

La Figura 5.9 muestra el cromatograma superpuesto de la solución fortificada inicial (1000 ng/l) de BPA y de las soluciones cloradas a las tres dosis, también se muestra con una flecha un pico ampliado que se encontró únicamente en las soluciones cloradas, el espectro de masas correspondiente y la estructura propuesta para este subproducto de la cloración.

Teniendo en cuenta el pico adicional encontrado en las soluciones cloradas, sus iones diagnóstico y la biblioteca del espectrómetro de masas, se propone para la cloración del BPA la formación del subproducto *o*-cloro-*p*-fenilfenol, el cual tiene un peso molecular de 204 g/mol. Su fórmula es C₁₂H₉ClO y sus principales iones característicos se encuentran a m/z: 139, 204 y 206.

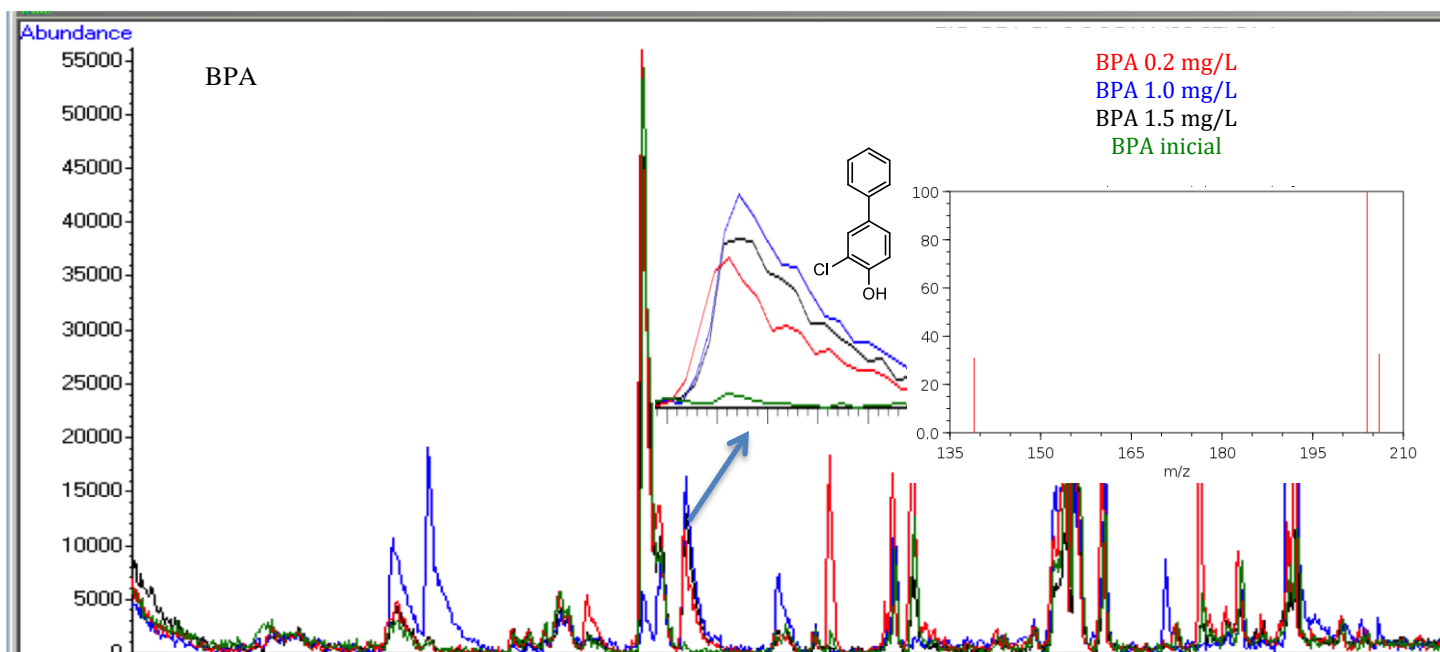


Figura 5.9 Cromatogramas antes y después de cloración del BPA

- **4NP y TCS**

Con las condiciones analíticas empleadas fue posible identificar un subproducto de cloración del BPA, pero no se identificaron subproductos de cloración de 4NP y TCS. Según la literatura se debe esperar para la cloración del 4NP la formación de: monocloronilfenol (MCNP), dicloronilfenol (D₂CNP), triclorofenol (T₃CP) y algunos hidroxifenoles (Hu et al., 2002b; Thurman, 2006). Para la cloración del TCS se ha reportado la formación de: 4-Cl-TCS, 6-Cl-TCS, 4,6-Cl-TCS, 2,4-Diclorofenol y 2,4,6-Triclorofenol (Canosa et al., 2005; Rule et al., 2005). Algunas posibles razones por las cuales los subproductos de cloración de 4NP y TCS pudieron no ser identificados son: técnicas como APCI-LC-MS y LC-TOF-MS podrían proporcionar mejores resultados; con CG-MS puede ser necesario realizar una derivatización adecuada que permita mejorar la selectividad, la sensibilidad y el rendimiento; el tiempo de cloración de 10 min puede ser muy corto para la formación de cantidades detectables de los subproductos; la concentración inicial de los compuestos emergentes (1000 ng/l) pudo ser muy baja para propiciar la formación de estos subproductos en cantidades detectables. Además, para tener mayor certeza en la identificación de las estructuras propuestas podría emplearse técnicas espectroscópicas como la Resonancia Magnética Nuclear.

5.3.2 Ozono

Debido a su carácter electrofílico, el ozono comúnmente reacciona con anillos aromáticos mediante sustitución electrofílica o cicloadición 1,3-dipolar (Deborde et al., 2008).

- **BPA**

La degradación del BPA por ozonación se puede dividir en tres pasos. En el primer paso, la degradación resulta en la formación de resorcinol, catecol, acetona y formaldehído. La reacción en este paso es rápida y los intermedios alcanzan las concentraciones pico en aproximadamente 15 minutos. Estos compuestos intermedios son posteriormente oxidados a los ácidos orgánicos: ácido acético, ácido fórmico, ácido maleico y ácido oxálico, durante el período de reacción de 40-90 minutos de ozonación. Finalmente, los ácidos orgánicos se descomponen en dióxido de carbono. Este último paso puede requerir una ozonación prolongada para completar la oxidación de los ácidos orgánicos (Garoma et al., 2010). Deborde et al. (2008) mencionan que realizaron algunos experimentos en presencia de BPA en exceso para estudiar la estructura química de los productos de transformación primaria con bajas dosis de ozono.

La Figura 5.10 muestra los cromatogramas superpuestos de la solución inicial de BPA (color verde) y las soluciones ozonadas a 1, 2 y 3 mg/l de ozono en fase gas (Cge), las cuales se muestran con colores negro, azul y rojo, respectivamente. El único pico adicional en las muestras ozonadas es el pico indicado con una flecha y mostrado con aumento. También se muestra el espectro de masas y la estructura propuesta para este subproducto. Para este pico se encontraron 3 iones característicos con m/z de 151, 90 y 138 en las muestras ozonadas, los cuales podrían ser atribuidos a los iones moleculares de 2-(4-hidroxifenil)-2-propanol, ácido oxálico y 4-hidroxi-ácido benzoico, respectivamente. Sin embargo, al buscar los demás iones característicos de cada una de estas estructuras, sólo se encontraron los correspondientes a 4-hidroxi-ácido benzoico, los cuales son m/z : 65, 121 y 138, por lo que se sugiere este compuesto como subproducto formado, el cual tiene un peso molecular de 138 g/mol y su fórmula es $C_7H_6O_3$. Este compuesto hace parte de los subproductos reportados por Kusruran & Yildirim (2013) en la ozonación de BPA.

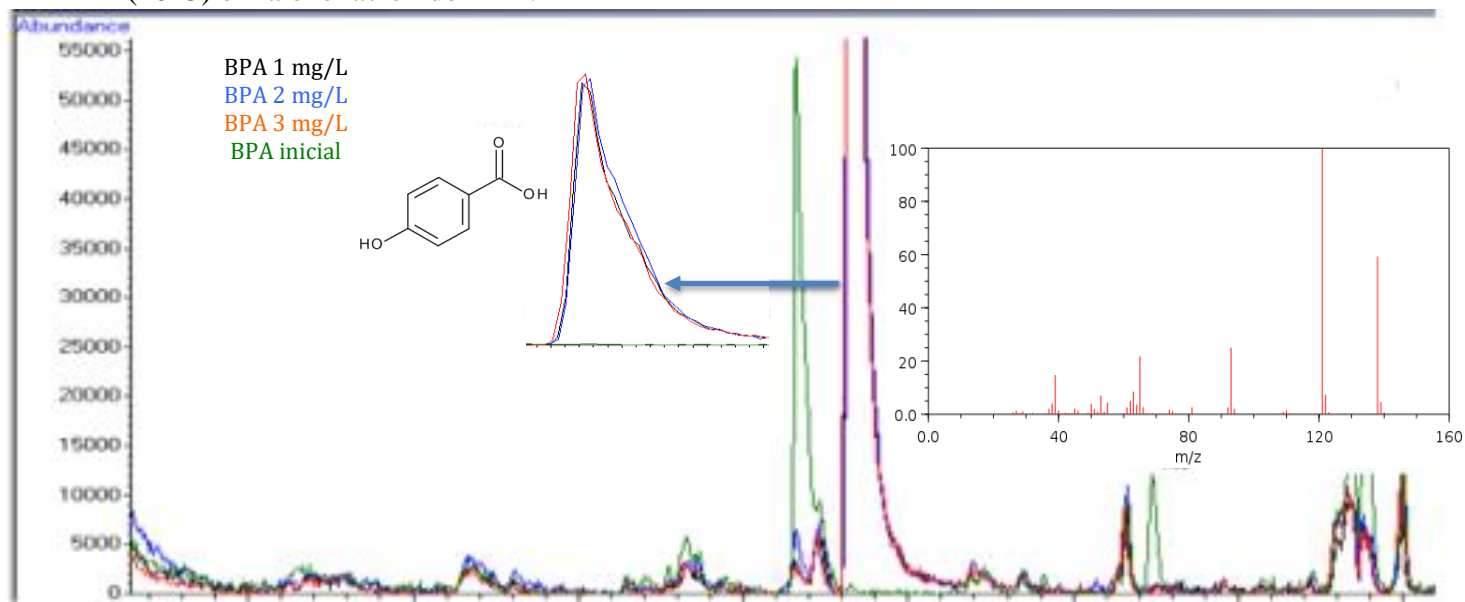


Figura 5.10 Cromatograma antes y después de ozonación del BPA

- 4NP

La vía de ozonación del 4NP es la misma que la del fenol, donde primero se oxida a sus compuestos intermedios hidroxilados como hidroquinonas, catecoles y dioles, luego a benzoquinonas, lo que conduce a la escisión del anillo. Sun et al. (2008) emplearon una concentración inicial de 4NP de 4 mg/l para el análisis cualitativo de los subproductos de ozonación mediante GC-MS. Mencionan que observaron sustancias amarillas cuando se burbujeó ozono a través de la solución de 4NP. Explican que es una reacción cromogénica típica cuando los fenoles se ozonizan a intermediarios de benzoquinona. Por lo tanto, dedujeron preliminarmente que se habían formado algunos compuestos intermedios de benzoquinona.

La Figura 5.11 muestra los cromatogramas superpuestos de la solución inicial de 4NP (color verde) y las soluciones ozonadas a 1, 2 y 3 mg/l de ozono en fase gas (Cge), las cuales se muestran con colores negro, azul y rojo, respectivamente. Se observa un pico adicional en las muestras ozonadas, este pico se muestra con aumento en el cromatograma y se señala con una flecha. Como puede verse el contorno verde de la muestra inicial se encuentra en la línea base. La estructura sugerida por la biblioteca para este compuesto es *3-buten-2-ol*, con un peso molecular de 72 g/mol, con fórmula C_4H_8O e iones característicos en 43, 45 y 57.

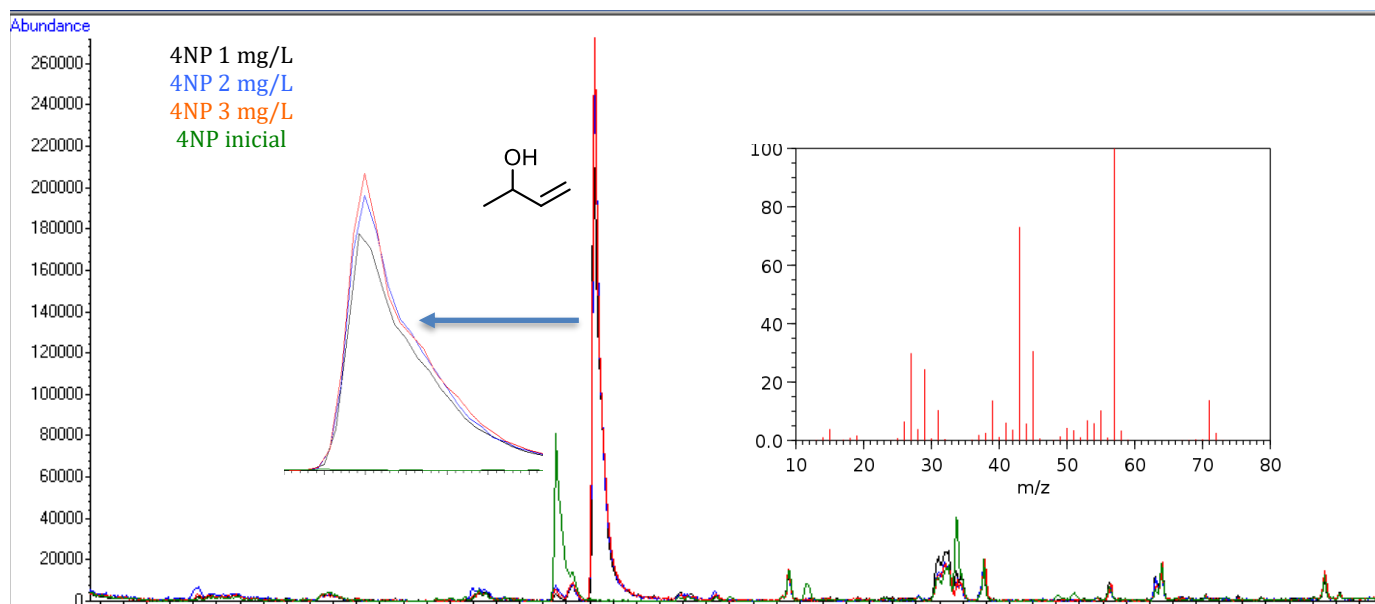


Figura 5.11 Cromatograma antes y después de ozonación del 4NP

- TCS

La oxidación química usando ozono es un proceso de tratamiento altamente efectivo para un amplio espectro de contaminantes orgánicos emergentes, incluyendo plaguicidas, fármacos, productos de cuidado personal, surfactantes, toxinas microbianas y ácidos grasos naturales. Las remociones de TCS con ozono están entre el 94% y 99.9% y la identificación de subproductos se puede realizar mediante GC-MS previa SPE con metil ter-butil éter (MTBE) como solvente de elución y mediante LC-MS-MS (Chen et al., 2012).

La Figura 5.12 muestra los cromatogramas superpuestos de la solución inicial de TCS (color azul) y las soluciones ozonadas a 1, 2 y 3 mg/l de ozono en fase gas (Cge), las cuales se muestran con colores negro, rojo y verde, respectivamente. El pico adicional más notorio en las muestras ozonadas se muestra con aumento y se señala con una flecha. Se encontraron cuatro iones característicos con m/z: 144, 115, 81 y 52 correspondientes a dicho pico en las muestras ozonadas. La presencia de estos iones permite proponer el *clorocatecol* como subproducto formado con un peso molecular de 144 g/mol y con fórmula $C_6H_5ClO_2$. Este compuesto hace parte de los subproductos reportados por Chen et al. (2012) en la ozonación del TCS.

En la Figura 5.12 también se pueden observar picos adicionales para la solución ozonada a 2 mg/l (color rojo), sin embargo, estos picos no pudieron ser atribuidos a una estructura química coherente, por lo que pueden ser producto de algún tipo de contaminación de esta muestra específica, ya que las muestras de 1 y 3 mg/l no presentan dichos picos.

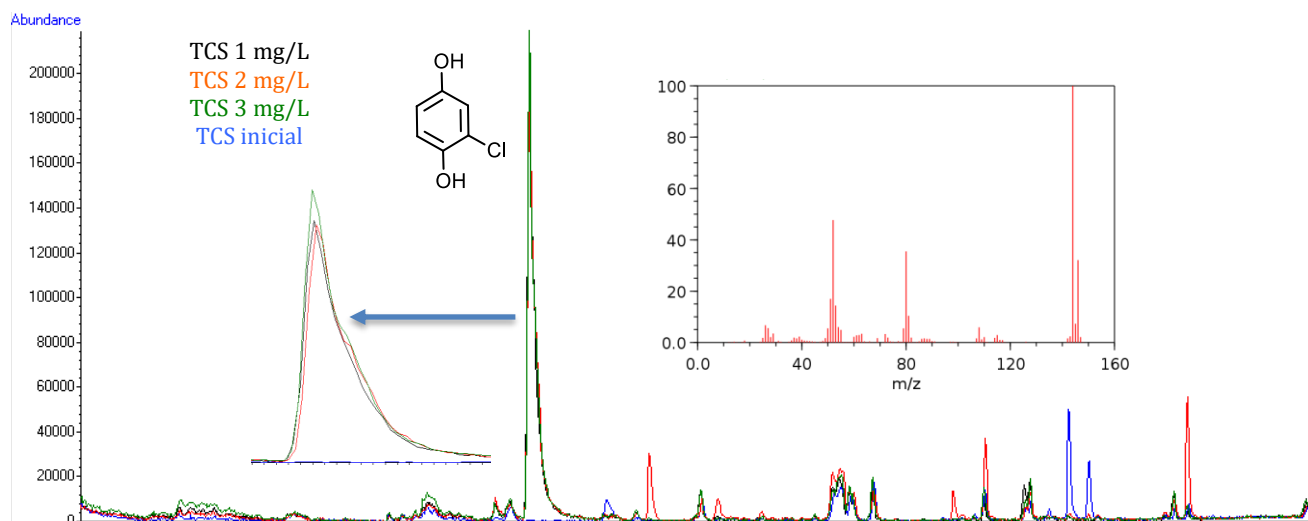


Figura 5.12 Cromatograma antes y después de ozonación del TCS

Para establecer como contribuyen en la actividad estrogénica del agua los subproductos generados a partir de cada uno de los contaminantes estudiados, se empleó la metodología BLYES cuyos resultados se muestran y discuten a continuación.

5.4 Actividad estrogénica

Se ha expresado preocupación con respecto a la entrada de estrógenos en la cadena alimentaria humana, que a su vez se relaciona con la forma en que las plantas toman estrógenos y los metabolizan. Los estrógenos en niveles de contaminantes se han relacionado con el cáncer de mama en mujeres y cáncer de próstata en hombres. Los estrógenos también perturban la fisiología de los peces y pueden afectar el desarrollo reproductivo en animales domésticos y salvajes. Igualmente pueden alterar el desarrollo de raíces y brotes, la floración y la germinación en plantas. La población humana del mundo de cerca de 7 mil millones descarga aproximadamente 30,000 kg/año de estrógenos esteroides naturales y un adicional de 700 kg/año de estrógenos sintéticos únicamente considerando las píldoras anticonceptivas. Además, la posible liberación de estrógenos al medio ambiente por parte del ganado es mucho más alta (Adeel et al., 2017).

Debido a que estudios previos han encontrado contaminación con sustancias estrogénicas en todo el mundo, se necesita un método para detectar de forma rápida y económica este tipo de sustancias en muestras ambientales como agua y además en el agua sometida a procesos de tratamiento como ozonación o cloración. Se ha demostrado que *S. cerevisiae* BLYES es capaz de medir la carga estrogénica de las muestras de agua con un alto rendimiento y de manera sensible (Eldridge et al., 2015).

Para llevar a cabo los análisis de actividad estrogénica mediante la técnica BLYES, se utilizó el extracto obtenido con SPE y concentrado con nitrógeno. En presencia de compuestos estrogénicos la levadura *Saccharomyces cerevisiae* modificada genéticamente produce bioluminiscencia, la cual es detectada por el luminómetro. La estrogénicidad de las muestras se obtuvo después del establecimiento de la curva estándar con 17 β -estradiol (E2). Todos los experimentos se realizaron en condiciones experimentales idénticas para asegurar la reproducibilidad.

El luminómetro proporciona la concentración media efectiva de cada muestra (EC50), la cual es transformada a equivalentes de 17 β -estradiol (EEQ). La EC50 es la concentración de la sustancia química que genera la mitad de la actividad máxima en el ensayo y se usa de forma rutinaria para comparar diferentes tipos de ensayos (Eldridge et al., 2015). El equivalente de 17 β -estradiol (EEQ) es la concentración total de compuestos estrogénicos activos en una muestra ambiental normalizada a la naturaleza del estrógeno 17 β -estradiol. Por lo tanto, los productos químicos que causan una mayor respuesta estrogénica tendrán una EC50 más baja y un EEQ más alto. El valor EEQ se calcula como el cociente de los valores EC50 del E2 y la muestra (Xia, 2009) de acuerdo con la Ecuación 5.1.

$$EEQ = \frac{EC50(E2)}{EC50(muestra) \times CFSPE} \quad (Ec. 5.1)$$

Donde CFSPE es el factor de concentración de la etapa de extracción de la muestra con SPE. A continuación se muestran los resultados de estrogenicidad obtenidos para los procesos de oxidación con cloro y ozono.

5.4.1 Cloro

La Tabla 5.9 y la Figura 5.13 muestran los resultados de actividad estrogénica obtenidos en el caso de la oxidación con cloro. Estos resultados muestran que la actividad estrogénica disminuyó después de aplicar los procesos de cloración al agua de pozo fortificada con los contaminantes. La remoción de la estrogenicidad estuvo entre 86.2 y 97.8%. Resulta importante resaltar la baja concentración de fortificación de contaminantes en el agua que se empleó (1000 ng/l), ya que los estudios que se han realizado al respecto utilizan concentraciones mayores de contaminantes. Aunque esta concentración de fortificación fue la misma para los tres compuestos, el EEQ inicial más alto fue el del 4NP. Esto puede ser explicado ya que según Cortés (2012) el largo de la cadena alifática tiene un papel importante en la afinidad de unión al receptor de estrógenos y en la capacidad de atravesar la membrana celular, este compuesto es el único de los tres que tiene esta cadena. Por otra parte, resulta interesante mencionar que la remoción de los compuestos y la reducción de la estrogenicidad tuvieron una relación directa. El BPA fue el contaminante que tuvo una menor remoción con cloro y a su vez fue el que tuvo una menor reducción de la estrogenicidad, como lo muestra la tabla 5.9. De igual forma el 4NP estuvo en una posición intermedia en ambas remociones y, finalmente, el TCS fue el compuesto que tuvo la mayor remoción y también la mayor reducción de la estrogenicidad.

Tabla 5.9 Actividad estrogénica de muestras de agua con contaminantes y su remoción después de cloración

EDC	Muestra	EEQ (ng/l)	Remoción de estrogenicidad (%)
BPA	Inicial	7.4	86.2
	Final	1.02	
4NP	Inicial	14.4	94.3
	Final	0.82	
TCS	Inicial	3.99	97.8
	Final	0.09	

Hu et al. (2002b) mencionan que la actividad de β -galactosidasa inducida por la solución de 4NP después de 10 minutos de cloración es solo el 30% de la que se produce antes de la cloración a una concentración residual de 1025 M de 4NP. Por su parte Takemura et al. (2005) indican que las afinidades de 3-CIBPA y 3,3'diCIBPA para el receptor de estrógenos ER α fueron más

altas que la afinidad de BPA, aunque la actividad estrogénica *in vivo* de los dos BPA clorados en ratas Sprague-Dawley hembras ovariectomizadas parecía ser comparable a la del BPA. Fan et al. (2013) informaron que la actividad enlazante del receptor de estrógeno de los subproductos clorados MCBPA y DCBPA era mucho más alta que las del BPA. Mientras que Vieira et al. (2015) en un estudio más reciente encontraron que la cloración fue un proceso eficaz en la eliminación de la estrogénicidad, lo cual coincide con los resultados de esta tesis.

5.4.2 Ozono

La Tabla 5.10 y la Figura 5.13 muestran los resultados de actividad estrogénica obtenidos para las muestras tratadas con ozono. Estos resultados muestran que, bajo las condiciones analíticas empleadas, la actividad estrogénica disminuyó posterior al proceso de ozonación. Para el BPA el ozono permitió remover mayor actividad estrogénica del agua (98.7%) que el cloro (86.2%). Para el TCS los dos oxidantes removieron prácticamente la misma proporción (97%). En el caso del 4NP, el cloro removió mayor estrogénicidad (94.3%) que el ozono (79.3%). La más baja reducción de la estrogénicidad con ozono para el 4NP, puede estar explicada debido a la formación de subproductos como 4-nonilcatecol y 4-nonilbenzoquinona (Sun et al., 2008), los cuales tienen cadenas alifáticas con nueve carbonos. Se ha demostrado que los alquilfenoles son estrogénicos, siempre y cuando la cadena alifática tenga al menos cuatro átomos de carbono en posición para con respecto al grupo hidroxilo (Olea et al., 2001). Por lo tanto, estos subproductos podrían estar contribuyendo a la mayor actividad estrogénica que queda en el agua después de la ozonación.

Tabla 5.10 Actividad estrogénica de muestras de agua con contaminantes y su remoción después de ozonación

Compuesto	Muestra	EEQ (ng/l)	Remoción (%)
BPA	Inicial	7.4	98.7
	Final	0.09	
4NP	Inicial	14.4	79.3
	Final	2.98	
TCS	Inicial	3.99	97.0
	Final	0.12	

Deborde et al. (2008) mencionan que el ozono ha demostrado remover eficientemente el BPA y su actividad hormonal. Sun et al. (2008) indican que, aunque los subproductos de ozonación homólogos de 4-nonilcatecol presentan mayor actividad estrogénica que el 4NP, ésta podría finalmente ser eliminada con dosis adecuadas.

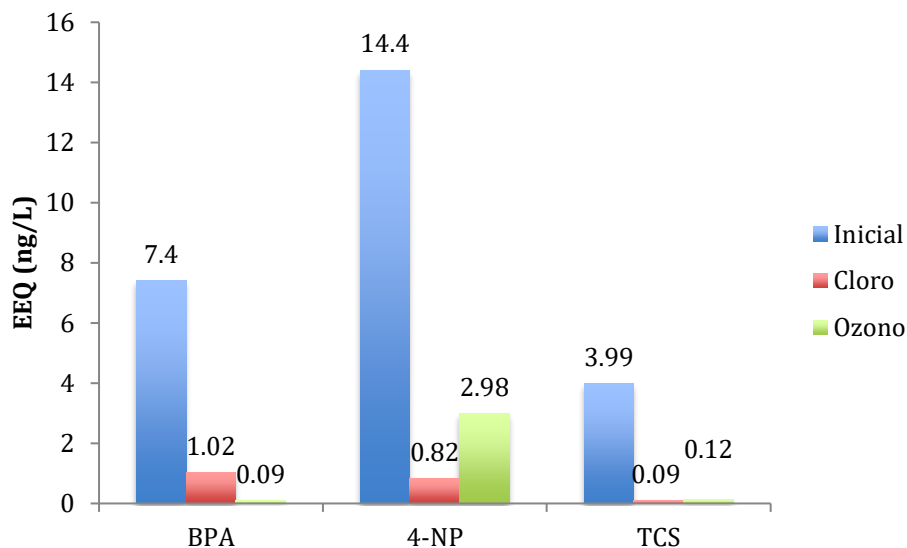


Figura 5.13 Actividad estrogénica de las muestras de agua antes y después de la cloración y la ozonación

Por lo tanto, se encontró que el cloro y el ozono son oxidantes eficientes para la remoción de BPA, 4NP y TCS y también para la disminución de la estrogénicidad del agua causada por la contaminación con dichos compuestos. Algunos estudios mencionan que el cloro no es eficiente para remover la estrogénicidad que causan los contaminantes emergentes (Deborde et al., 2008) y que la actividad estrogénica aumentaría cuando el agua que contiene dichos compuestos es clorada (Hu et al., 2002). Sin embargo, Yamamoto y Yasuhara (2002) mencionan que se podría asumir que la halogenación de contaminantes emergentes como el BPA debilita un poco sus propiedades estrogénicas; Vieira et al. (2015) reportan que la cloración es efectiva para remover la actividad estrogénica del agua, lo cual es consistente con los resultados encontrados en el desarrollo de esta tesis. En cuanto al ozono, varias investigaciones coinciden en que es efectivo para reducir o remover la estrogénicidad del agua (Huber et al., 2004; Guedes et al., 2008; Sun et al., 2008; Vieira et al., 2015). A continuación, en el capítulo final, se realiza la evaluación de riesgos para la salud humana causados por un eventual consumo de agua que contenga los contaminantes emergentes estudiados con concentraciones correspondientes a antes y después de los procesos de oxidación.

5.5 Evaluación de riesgos para la salud humana

El riesgo para la salud humana se evaluó considerando individualmente los tres contaminantes estudiados antes y después de los procesos de oxidación, así como también considerando un posible escenario donde estuvieran presentes las tres sustancias simultáneamente. La concentración de cada contaminante en el agua se comparó con el nivel correspondiente de la Guía de agua potable (DWGL, por sus siglas en inglés), la cual es una concentración teórica por

debajo de la cual la probabilidad de efectos adversos como resultado de la exposición a largo plazo es insignificante (Riva et al., 2018). La DWGL para cada contaminante se calcula según la Ecuación 5.2.

$$DWGL[\mu g/kg.día] = \frac{ADI \times BW \times P \times 10^3}{V} \quad (Ec. 5.2)$$

Donde ADI es la ingesta diaria admisible, es decir, la dosis que puede ingerirse diariamente durante toda la vida con un riesgo insignificante de efectos adversos; BW es el peso corporal (70 kg); P es la fracción de la sustancia ingerida a través del consumo de agua (1 para medicamentos terapéuticos, 0.1 para sustancias comercializadas o sustancias para uso industrial y 0.2 para sustancias no comercializadas tales como drogas ilícitas); V es el volumen diario de agua consumida (2 L).

Las DWGL se han reportado en directrices de instituciones como la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Asociación Americana de Investigación del Agua (AwwaRF), la Guía Australiana para el Reciclaje del Agua, la Agencia de Protección Ambiental (EPA), entre otras. Para el caso del BPA la DWGL reportada es de 200 $\mu g/l$, para el 4NP es de 500 $\mu g/l$ y para el TCS es de 0.35 $\mu g/l$.

La evaluación del riesgo para cada contaminante individual se calculó como el cociente de peligrosidad (HQ, por sus siglas en inglés) de acuerdo con la Ecuación 5.3.

$$HQ = \frac{C_i}{DWGL_i} \quad (Ec. 5.3)$$

Donde C_i es la concentración medida de cada contaminante y $DWGL_i$ es el nivel teórico correspondiente. Cuando el cociente de peligrosidad es menor que 1 se puede excluir el riesgo para la salud humana (Aneck-Hahn et al., 2018; Riva et al., 2018).

Para evaluar el riesgo acumulativo derivado de la coexposición a los tres contaminantes estudiados, se siguió el enfoque del índice de peligrosidad (HI, por sus siglas en inglés), el cual es un método derivado del concepto de adición de concentración, informado por la EPA y por el Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE. UU. El HI se calcula sumando los HQs individuales de todas las sustancias medidas (Ec. 5.4), y si el resultado es menor a 1, el riesgo para la salud humana resultante de la coexposición a los contaminantes en los niveles medidos se considera insignificante (Riva et al., 2018).

$$HI = \sum_{i=1}^n HQ_i = \sum_{i=1}^n \frac{C_i}{DWGL_i} \quad (Ec. 5.4)$$

Los cocientes HQ y el índice de peligrosidad HI de los contaminantes estudiados se muestran en la Tabla 5.11.

Tabla 5.11 Cálculos de riesgo para la salud humana a partir de la exposición a contaminantes emergentes en el agua

Compuesto	HQ			HI		
	Inicial	Cloro	Ozono	Inicial	Cloro	Ozono
BPA	4.5×10^{-3}	5.9×10^{-4}	6.3×10^{-4}	3.0	6.9×10^{-2}	1.2×10^{-1}
4NP	1.9×10^{-3}	6.8×10^{-5}	6.1×10^{-5}			
TCS	3.0	6.8×10^{-2}	1.2×10^{-1}			

El cociente de riesgo estuvo por debajo de 1 para BPA y 4NP antes de los procesos de oxidación y para todos los contaminantes después de la cloración y la ozonación, lo que indica que es poco probable que en estos casos los productos químicos representen un riesgo para la salud humana al consumir 2 litros de agua diarios con las concentraciones de contaminantes estudiadas. Sin embargo, para el TCS antes de las oxidaciones, el cociente de riesgo estuvo por encima de 1. El índice de peligrosidad inicial también sobrepasa de 1, pero después de la cloración u ozonación es menor a este valor, por lo que el consumo de agua que contenga TCS o los tres compuestos simultáneos a las concentraciones de fortificación representaría un probable riesgo para la salud del consumidor si no se lleva a cabo alguno de los procesos de oxidación.

Cabe mencionar que el cociente de riesgo y el índice de peligrosidad iniciales para TCS estuvieron por encima de 1 dada la baja DWGL para este compuesto ($0.35 \mu\text{g/l}$) en comparación a los otros contaminantes ($200 \mu\text{g/l}$ para BPA y $500 \mu\text{g/l}$ para 4NP). La guía para determinar, monitorear y lograr concentraciones seguras de productos químicos en agua reciclada (Middleton et al., 2008) menciona que este valor bajo de DWGL recomendado se asigna ya que el TCS es un producto que se comercializa actualmente. También es importante tener en cuenta que HQ y HI superiores a 1 no corresponden a un riesgo inmediato para el consumidor, sino que requieren mayor investigación y una evaluación de riesgos más detallada para refinar el índice (Riva et al., 2018). Finalmente, y dado que cada año se introducen cientos de nuevos compuestos químicos en el mercado, se necesitan más investigaciones sobre su ocurrencia, comportamiento, destino y riesgos potenciales en el agua potable y en sus fuentes, a fin de establecer, si es necesario, valores guía para fines regulatorios e incluir los más riesgosos en la legislación futura.

Por otra parte, Adeel et al. (2017) reportan la ingesta diaria de estrógenos en alimentos aceptable para humanos y las denominadas "concentraciones previstas sin efecto" en la vida silvestre acuática. La Tabla 5.12 muestra la ingesta diaria admisible en equivalentes de 17β -estradiol para humanos a través de alimentos y la concentración prevista sin efecto para la vida acuática.

Tabla 5.12 Ingesta diaria de estrógenos admisible para humanos y concentración prevista sin efecto para la vida acuática

Población blanco	EEQ ($\mu\text{g}/\text{día}$)
Adultos (60kg)	3.0
Niños (10kg)	0.5
Adultos	0.0041*
Infantes	0.0016*
Vida acuática	2 (largo plazo) 5 (corto plazo)

* Vía ingesta de agua (2L/día)

Teniendo en cuenta los valores admisibles sin efecto vía ingesta de agua, significa que diariamente se admite un EEQ de 2.05 ng/l y 0.8 ng/l para adultos e infantes, respectivamente. Por lo tanto, las muestras de agua fortificadas con contaminantes emergentes a una concentración de 1000 ng/l sobrepasan dichos valores. Al clorar las muestras, los EEQ ya están dentro de los límites aceptables, con excepción del BPA que supera el valor admisible para infantes. Al ozonar el agua sólo el 4NP sobrepasa la ingesta diaria. Esto significa que, si un agua tuviera los niveles de concentración de contaminantes estudiados, es necesario llevar a cabo un proceso de tratamiento como cloración u ozonación para reducir su estrogenicidad y que la ingesta de 2 litros diarios sea segura.

Finalmente es importante resaltar que no detectar los contaminantes estudiados ni actividad estrogénica en el agua del pozo de la Facultad de Química son una indicación de su buena calidad. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que en este estudio se evaluaron tres contaminantes emergentes, por lo tanto, otros productos químicos no analizados podrían estar presentes en el agua y contribuir a un riesgo potencial para la salud. También deben tenerse en cuenta otros criterios al elegir el mejor proceso de oxidación para el agua. Por ejemplo, es importante considerar los subproductos de la reacción entre el oxidante empleado y la materia orgánica del agua, ya que está ampliamente documentado en la literatura que en el caso del cloro, los trihalometanos producto de la cloración del agua presentan riesgos para la salud.

6. CONCLUSIÓN

La presente tesis aporta a comprobar que los subproductos generados a partir de los procesos de oxidación con cloro y ozono aplicados en la remoción de contaminantes emergentes como el BPA, 4NP y TCS en agua de pozo fortificada, no aportan algún incremento en la actividad estrogénica. Por lo que los procesos estudiados son eficaces para la remoción de estos compuestos emergentes y contribuyen a disminuir la actividad estrogénica de los mismos en agua de abastecimiento, sin que ello represente algún riesgo para la salud. Los porcentajes de remoción de la actividad estrogénica expresada como ng/l EEQ de 17β -estradiol de BPA, 4NP y TCS en el agua de pozo fortificada aplicando cloro, fueron calculados en 86.2%, 94.3% y 97.8% respectivamente, sin que se encontrara un incremento de dicha actividad provocado por subproductos después del proceso. Para el caso del ozono se establecieron porcentajes de remoción de la actividad estrogénica del 98.7% para BPA, 79.3% para 4NP y 97.0% para el TCS; se determinó que los subproductos generados no contribuyeron a algún incremento en la estrogenicidad. Los cálculos de riesgo indican que bajo las condiciones de trabajo empleadas, es decir, agua de pozo fortificada individualmente con 1000 ng/l de cada compuesto, el consumo de agua que contenga BPA o 4NP a este nivel de fortificación no representa riesgo, mientras que el agua con TCS o con los tres compuestos simultáneos a esta concentración, representaría un probable riesgo para la salud. Los procesos de oxidación con cloro y ozono contribuyeron a eliminar los posibles riesgos en todos los casos.

RECOMENDACIÓN

Aunque los subproductos determinados no generaron algún incremento en la actividad estrogénica para los tres compuestos estudiados, se recomienda investigar los procesos de cloro y ozono combinados y determinar mayor eficacia con la posible reducción de dosis y tiempos de contacto aplicados, así como la potencial formación de otros subproductos al combinar estos procesos.

7. REFERENCIAS

- Adeel, M., Song, X., Wang, Y., Francis, D. & Yang, Y. (2017). Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: A critical review. *Environment International*, 99, 107–119.
- Aneck-Hahn, N.H., Van Zijl, M.C., Swart, P., Truebody, B., Genthe, B., Charmier, J. & De Jager, C. (2018). Estrogenic activity, selected plasticizers and potential health risks associated with bottled water in South Africa. *Journal of Water and Health*, 16(2), 253-262.
- APHA-AWWA-WPCF (1992). Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. (17ed). España: Ediciones Díaz de Santos S.A.
- Aranzazu, D.A., Rodríguez, B de J. & Duque, B.A. (2012). Disrupción endócrina en peces. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 25, 312-323.
- Arsenault, J.C. (2012). Beginner's Guide to Solid-Phase Extraction SPE. (1ed). USA: Waters Corporation.
- Baker, V.A. (2001). Endocrine disrupters-testing strategies to assess human hazard. *Toxicology in Vitro*, 15, 413–419.
- Bergamasco, A.M., Eldridge, M., Sanseverino, J., Fabriz, F., Montagner, C.C., Cardoso, I., Figueiredo, W. & Aragao, G. (2011). Bioluminescent yeast estrogen assay (BLYES) as a sensitive tool to monitor surface and drinking water for estrogenicity. *Journal of Environmental Monitoring*, 13, 3288-3293.
- Buth, J., Ross, M., McNeill, K. & Arnold, W. (2011). Removal and formation of chlorinated triclosan derivatives in wastewater treatment plants using chlorine and UV disinfection. *Chemosphere*, 85(2), 284-289.
- Canosa, P., Morales, S., Rodríguez, I., Rubí, E., Cela, R. & Gómez, M. (2005). Aquatic degradation of triclosan and formation of toxic chlorophenols in presence of low concentrations of free chlorine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 383, 1119-1126.
- Canosa, M.P. (2008). Desarrollo de metodología analítica para la determinación de triclosán y parabenes. Aplicación al estudio de su distribución y transformación en muestras ambientales. Tesis de doctorado. Universidad de Santiago de Compostela.
- Chamas, A., Minh Pham, H.T., Baronian, K. & Kunze, G. (2017). Chapter 12 Biosensors Based on Yeast/Fungal Cells. In: *Biotechnology of Yeasts and Filamentous Fungi* (351-372). Switzerland: Springer.
- Chávez, A., Maya, C., Gibson, R. & Jiménez, B. (2011). The removal of microorganisms and organic micropollutants from wastewater during infiltration to aquifers after irrigation of farmland in the Tula Valley, Mexico. *Environmental Pollution*, 159, 1354-1362.
- Chen, X., Richard, J., Liu, Y., Dopp, E., Tuerk, J. & Bester, K. (2012). Ozonation products of triclosan in advanced wastewater treatment. *Water Research*, 46, 2247-2256.
- Choi, K.J., Kim, S.G., Kim, C.W. & Park, J.K. (2006). Removal efficiencies of endocrine disrupting chemicals by coagulation/flocculation, ozonation, powdered/granular activated carbon adsorption, and chlorination. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 23(3), 399-408.
- Clement, R.E. & Taguchi, V.Y. (1991). Techniques for the gas chromatography - mass spectrometry identification of organic compounds in effluents. Canada: Queen's Printer for Ontario.
- CONAGUA, 2007. Manual de agua potable, alcantarillado y saneamiento. Desinfección para sistemas de agua potable y saneamiento. México.
- Cortés, K.M. (2012). Mecanismos de muerte celular inducida por cationes lipofílicos derivados del ácido gálico. Tesis de licenciatura. Universidad de Chile.
- Deborde, M., Rabouan, S., Mazellier, P., Duguet, J.P. & Legube, B. (2008). Oxidation of bisphenol A by ozone in aqueous solution. *Water Research*, 42, 4299–4308.

- Del Ángel Sánchez, M.T., García-Alamilla, P., Lagunes-Gálvez, L.M., García-Alamilla, R. & Cabrer, E.G. (2015). Aplicación de metodología de superficie de respuesta para la degradación de naranja de metilo con TiO₂ sol-gel sulfatado. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 31(1), 99-106.
- Dimogerontas, G. & Liapi, C. (2014). Chapter 1 Endocrine Disruptors (Xenoestrogens): An Overview. In: *Plastics in Dentistry and Estrogenicity* (3-48). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Domenech, J. (2004). Ozono frente a cloro. Desinfección y desinfectantes del agua para consumo humano. *Offarm farmacia y sociedad*, 23(5), 120-126.
- Durán Álvarez, J.C. (2013). Destino ambiental de contaminantes emergentes presentes en el agua residual usada para riego en el Valle de Tula. Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Eldridge, M., França, D., Montagner, C., Quinágua, G., Saylor, G., Jardim, W. & Umbuzeiro, G. (2015). Comparison of two yeast bioluminescent assays applied to water monitoring of estrogenic activity. *Applied Research in Toxicology*, 1(1), 1-8.
- EPA. (1999). United States Environmental Protection Agency. Alternative Disinfectants and Oxidants – Guidance Manual.
- Estrada-Arriaga, E.B., Mijaylova-Necheva, P., Moeller-Chavez, G. & Mantilla-Morales, G. (2013). Presencia y tratamiento de compuestos disruptores endócrinos en aguas residuales de la Ciudad de México empleando un biorreactor con membranas sumergidas. *Ingeniería Investigación y Tecnología*, 14(2), 275-284.
- Fan, Z., Hu, J., An, W. & Yang, M. (2013). Detection and Occurrence of Chlorinated Byproducts of Bisphenol A, Nonylphenol, and Estrogens in Drinking Water of China: Comparison to the Parent Compounds. *Environmental Science & Technology*, 47, 10841-10850.
- Fang, H., Tong, W., Perkins, R., Soto, A.M., Prechtel, N.V. & Sheehan, D.M. (2000). Quantitative Comparisons of In Vitro Assays for Estrogenic Activities. *Environmental Health Perspectives*, 108(8), 723-729.
- Félix-Cañedo, T., Durán-Álvarez, J. & Jiménez-Cisneros, B. (2013). The occurrence and distribution of a group of organic micropollutants in Mexico City's water sources. *Science of the Total Environment*, 454-455, 109-118.
- Fiss, E.M., Rule, K.L. & Vikesland, P.J. (2007). Formation of Chloroform and Other Chlorinated Byproducts by Chlorination of Triclosan-Containing Antibacterial Products. *Environmental Science & Technology*, 41, 2387-2394.
- Folmar, L.C., Hemmer, M.J., Denslow, N.D., Kroll, K., Chen, J., Cheek, A., Richman, H., Meredith, H. & Grau, E.G. (2002). A comparison of the estrogenic potencies of estradiol, ethynylestradiol, diethylstilbestrol, nonylphenol and methoxychlor in vivo and in vitro. *Aquatic Toxicology*, 60, 101-110.
- Gallard, H., Leclercq, A. & Croué, J.P. (2004). Chlorination of bisphenol A: kinetics and by-products formation. *Chemosphere*, 56, 465-473.
- García-Gómez, C., Gortáres-Moroyoqui, P. & Drogui, P. (2011). Contaminantes emergentes: efectos y tratamientos de remoción. *Química Viva*, 2, 96-105.
- Garoma, T., Matsumoto, S.A., Wu, Y. & Klinger, R. (2010). Removal of Bisphenol A and its Reaction-Intermediates from Aqueous Solution by Ozonation. *Ozone: Science & Engineering*, 32, 338-343.
- Gibson, R., Becerril-Bravo, E., Silva-Castro, V. & Jiménez, B. (2007). Determination of acidic pharmaceuticals and potential endocrine disrupting compounds in wastewaters and spring waters by selective elution and analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1169, 31-39.
- Glaze, W. (1986). Reaction products of Ozone: A Review. *Environmental Health Perspectives*, 69, 151-157.
- Gramcko Mogollón, M. (2010). Evaluación del rendimiento de inyectores para el tratamiento de agua con ozono. Informe de pasantía para licenciatura. Universidad Simón Bolívar.

- Guedes Maniero, M., Bila, D. & Dezzoti, M. (2008). Degradation and estrogenic activity removal of 17 β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol by ozonation and O₃/H₂O₂. *Science of the total environment*, 407, 105-115.
- Gutiérrez Fernández, G.A. (2015). Cuantificación de 4-Nonilfenol, Bisfenol-A, Naproxeno, Ibuprofeno y Diclofenaco en cultivos regados con agua residual. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Guzmán Martínez M.C. & Ramírez Romero P. (2012). Disfunción endócrina debida a contaminantes ambientales. *Elementos*, 87, 19-25.
- Hernández, A., Cortacans, J., Del Castillo, I., Hernández, A. (2006). Eficacia de los tratamientos avanzados en la eliminación de sustancias estrogénicas. III Congreso de Ingeniería Civil, Territorio y Medio Ambiente, Zaragoza, España.
- Houtman, C.J., Legler, J. & Thomas, K. (2011). Effect - Directed Analysis of Endocrine Disruptors in Aquatic Ecosystems. In: Effect-Directed Analysis of Complex Environmental Contamination. The Handbook of Environmental Chemistry (237-265). Berlin Heidelberg: Springer Verlag.
- Hu, J.Y., Aizawa, T. & Ookubo, S. (2002). Products of Aqueous Chlorination of Bisphenol A and Their Estrogenic Activity. *Environmental Science & Technology*, 36, 1980-1987.
- Hu, J.Y., Xie, G.H. & Aizawa, T. (2002b). Products of aqueous chlorination of 4-nonylphenol and their estrogenic activity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(10), 2034-2039.
- Huber, M., Ternes, T. & Gunten, U. (2004). Removal of Estrogenic Activity and Formation of Oxidation Products during Ozonation of 17 α -Ethinylestradiol. *Environmental Science & Technology*, 38, 5177-5186.
- Huber, M., Gobel, A., Joss, A., Hermann, N., Loffler, D., Mcardell, A., Siegrist, H., Ternes, T. & Gunten, U. (2005). Oxidation of pharmaceuticals during ozonation of municipal wastewater effluents: A pilot study. *Environmental Science & Technology*, 39, 4290-4299.
- Johnson, A.C., Belfroid, B. & Di-Corcica, A. (2000). Estimation of Steroid Estrogens Inputs Into Activated Sludge Treatment Works and Observations on their Removal From de Effluent. *Science Total Environmental*, 256, 163-173.
- Kanetoshi, A., Ogawa, H., Katsura, E. & Kaneshima, H. (1987). Chlorination of Irgasan DP300 and formation of dioxins from its chlorinated derivatives. *Journal of Chromatography*, 389, 139-153.
- Karasek, F.W. & Clement, R.E. (2003). Basic gas chromatography – mass spectrometry, principles and techniques. (1ed). Netherlands: Elsevier Science.
- Katori, Y., Ksu, Y. & Utsumi, H. (2002). Estrogens-Like Effect and Cytotoxicity of Chemical Compounds. *Water Science and Technology*, 46, 363-366.
- Körner, W., Bolz, U., Sussmuth, W., Hiller, G., Schuller, W., Hanf, V. & Hagenmaier, H. (2000). Input/Output Balance of Estrogenic Active Compounds in Major Municipal Sewage Plant in Germany. *Chemosphere*, 40, 1131-1142.
- Krasner, S.W., McGuire, M.J., Jacangelo, J.G., Patania, N.L., Reagan, K.M. & Aieta E.M. (1989). The Occurrence of Disinfection By-products in US Drinking Water. *American Water Works Association*, 81(8), 41-53.
- Kuruto-Niwa, R., Nozawa, R., Miyakoshi, T., Shiozawa, T. & Terao, Y. (2005). Estrogenic activity of alkylphenols, bisphenol S, and their chlorinated derivatives using a GFP expression system. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 19, 121-130.
- Kuster, M., López de Alda, M.J., Hernando, M.D., Petrovic, M., Martín-Alonso, J. & Barceló, D. (2008). Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin (Barcelona, Spain). *Journal of Hydrology*, 358, 112-23.

- Kusvuran, E. & Yildirim, D. (2013). Degradation of bisphenol A by ozonation and determination of degradation intermediates by gas chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–mass spectrometry. *Chemical Engineering Journal*, 220, 6-14.
- Langlais, B., Reckhow, D. & Brink, D. (1991). *Ozone in Water Treatment, Application and Engineering*. (1ed). USA: Lewis publishers.
- Li, N., Jiang, W., Ma, M., Wang, D. & Wang, Z. (2016). Chlorination by-products of bisphenol A enhanced retinoid X receptor disrupting effects. *Journal of Hazardous Materials*, 320, 289-295.
- Magnusson, B. & Ornamark, U. (2014). *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. (2ed.) ISBN 978-91-87461-59-0. Available from www.eurachem.org
- Martínez, M.P. (2014). Métodos analíticos para la determinación de compuestos disruptores endócrinos. Tesis de doctorado. Universidad de la Rioja.
- Martínez de Paz, P.J. (2014). Evaluación de la actividad citotóxica y genotóxica del nonilfenol, triclosán y bisfenol A en *Chironomus riparius*: identificación y caracterización de biomarcadores moleculares de ecotoxicidad. Tesis de doctorado. Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED).
- Middleton, H., Moore, M.R., Chapman, H., Leusch, F., Tan, B., Drew, R., Frangos, J., Khan, S., Leslie, G. & Shaw, G. (2008). *Recycled Water Quality, a guide to determining, monitoring and achieving safe concentrations of chemicals in recycled water*. Review prepared for environment protection and heritage council (EPHC), the national water commission and the Queensland government.
- Monje R., I. (2010). *Práctica de oxidación con ozono. Procesos avanzados de oxidación química*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Muñoz, J.D., Camargo, D.A. & Gallego, D. (2009). Aplicación de la metodología de superficie de respuesta en un proceso de absorción del CO₂ de un biogás en una solución alcalina. *DYNA*, 76(159), 135-144.
- Muñoz, J.E. (2012). Contaminantes emergentes: aspectos químicos, microbiológicos y de salud. En Ramírez-Sánchez, I. M., Martínez-Austria, P., Quiroz-Alfaro, M. A., Bandala, E. R. (2015). Efectos de los estrógenos como contaminantes emergentes en la salud y el ambiente. *Tecnología y ciencias del agua*, 6(5), 31-42.
- Ning, B., Graham, N. & Zhang, Y. (2007). Degradation of octylphenol and nonylphenol by ozone – Part I: Direct reaction. *Chemosphere*, 68, 1163-1172.
- Ning, B., Graham, N. & Zhang, Y. (2007b). Degradation of octylphenol and nonylphenol by ozone – Part II: Indirect reaction. *Chemosphere*, 68, 1173-1179.
- Olea, N., Fernández, M.F. & Martín, P. (2001). Disruptores endocrinos. El caso particular de los xenobióticos estrogénicos. II estrógenos sintéticos. *Salud ambiental*, 1(2), 64-72.
- OMS, 2010. *Human Health Risk Assessment Toolkit: Chemical Hazards*. World Health Organization. Geneva, Switzerland.
- Onodera, S., Ogawa, M. & Suzuhi, S. (1987). Chemical changes of organic compounds in chlorinated water. *Journal of Chromatography*, 392, 267-275.
- Peña-Álvarez, A. & Castillo-Alanís, A. (2015). Identificación y cuantificación de contaminantes emergentes en aguas residuales por MicroExtracción en Fase Sólida-Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (MEFS-CG-EM). *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 18(1), 29-42.
- Petrovic, M., Radjenovic, J., Postigo, C., Kuster, M., Farre, M., López de Alda, M.J. & Barceló, D. (2008). Emerging Contaminants in Wastewaters: Sources and Occurrence. In *The Handbook of Environmental Chemistry* (1-35). Berlin: Springer.
- PUMAGUA, 2008. Informe final. México.

- Ramírez-Sánchez, I.M., Martínez-Austria, P., Quiroz-Alfaro, M.A. & Bandala, E.R. (2015). Efectos de los estrógenos como contaminantes emergentes en la salud y el ambiente. *Tecnología y ciencias del agua*, 6(5), 31-42.
- Raut, S. & Angus, R. (2010). Triclosan has endocrine-disrupting effects in male western mosquitofish, *gambusia affinis*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(6), 1287-1291.
- Riva, F., Castiglioni, S., Fattore, E., Manenti, A. & Davoli, E. (2018). Monitoring emerging contaminants in the drinking water of Milan and assessment of the human risk. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 221, 451-457.
- Rodas, L.C. (2015). Identificación de compuestos orgánicos volátiles en aire respirado mediante Microextracción en Fase Sólida y Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas. Tesis de maestría. Universidad de Oviedo.
- Rodriguez, F. (2003). Procesos de potabilización del agua e influencia del tratamiento de ozonización. (1ed). Madrid, España: Editorial Díaz de Santos.
- Routledge, E.J. & Sumpter, J.P. (1996). Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15(3), 241-248.
- Ruan, T., Liang, D., Song, S., Song, M., Wang, H. & Jiang, G. (2015). Evaluation of the in vitro estrogenicity of emerging bisphenol analogs and their respective estrogenic contributions in municipal sewage sludge in China. *Chemosphere*, 124, 150-155.
- Ruíz, M., Sabater, C., Ibáñez, M.J., Alonso, J.L. & Castillo, M.A. (2013). Medida de la actividad estrogénica de aguas residuales mediante ensayo RYA. 9º Congreso Ibérico y 6º Iberoamericano de Contaminación y Toxicología Ambiental. Valencia, España.
- Rule, K., Ebbett, V. & Vikesland, P. (2005). Formation of Chloroform and Chlorinated Organics by Free-Chlorine-Mediated Oxidation of Triclosan. *Environmental Science & Technology*, 39, 3176-3185.
- Sanseverino, J., Gupta, R., Layton, A., Patterson, S., Ripp, S., Saidak, L., Simpson, M., Schultz, T. & Sayler, G. (2005). Use of *Saccharomyces cerevisiae* BLYES expressing bacterial bioluminescence for rapid, sensitive detection of estrogenic compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(8), 4455-4460.
- Sanseverino, J., Eldridge, M., Layton, A., Easter, J., Yarbrough, J., Schultz, T. & Sayler, G. (2009). Screening of Potentially Hormonally Active Chemicals Using Bioluminescent Yeast Bioreporters. *Toxicological Sciences*, 107(1), 122-134.
- Sawyer, C., McCarty, P., Parkin, G. (1994). Chemistry for environmental engineering. (4ed). New York: McGraw-Hill.
- Sharma, V., Anquandah, G., Yngard, R., Kim, H., Fekete, J., Bouzek, K., Ray, A. & Golovko, D. (2009). Nonylphenol, octylphenol, and bisphenol-A in the aquatic environment: A review on occurrence, fate, and treatment. *Journal of Environmental Science and Health Part A*, 44, 423-442.
- Sodre, F.F., Pescara, I.C., Montagner, C.C. & Jardim, W.F. (2010). Assessing selected estrogens and xenoestrogens in Brazilian surface waters by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Microchemical Journal*, 96, 92-98.
- Suarez, S., Dodd, M., Omil, F. & Gunten, U. (2007). Kinetics of triclosan oxidation by aqueous ozone and consequent loss of antibacterial activity: Relevance to municipal wastewater ozonation. *Water Research*, 41, 2481-2490.
- Sun, Q., Deng, S., Huang, J. & Yu, G. (2008). Relationship between Oxidation Products and Estrogenic Activity during Ozonation of 4-Nonylphenol. *Ozone: Science and Engineering*, 30, 120-126.
- Sychrová, E., Štěpánková, T., Nováková, K., Bláha, L., Giesy, J.P. & Hilscherová, K. (2012). Estrogenic activity in extracts and exudates of cyanobacteria and green algae. *Environment International*, 39, 134-140.

- Takemura, H., Ma, J., Sayama, K., Terao, Y., Zhu, B.T. & Shimoi, K. (2005). In vitro and in vivo estrogenic activity of chlorinated derivatives of bisphenol A. *Toxicology*, 215-221.
- Tan, B. (2006). Chemical and Biological Analyses of Selected Endocrine Disruptors in Wastewater Treatment Plants in South East Queensland, Australia. PhD Doctorate Thesis. Griffith University.
- Thurman, E.M. (2006). Accurate-mass identification of chlorinated and brominated products of 4-nonylphenol, nonylphenol dimers, and other endocrine disruptors. *Mass Spectrometry*, 41(10), 1287-1297.
- Torres-Duarte, C., Viana, M.T., Vazquez-Duhalt, R. (2012). Laccase-Mediated Transformations of Endocrine Disrupting Chemicals Abolish Binding Affinities to Estrogen Receptors and Their Estrogenic Activity in Zebrafish. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 168(4), 864-876.
- Umar, M., Roddick, F., Fan, L. & Aziz, H. (2013). Application of ozone for the removal of bisphenol A from water and wastewater – A review. *Chemosphere*, 90, 2197-2207.
- United States Environmental Protection Agency, 1997. Special Report on Environmental Endocrine Disruptions: An effects Assessments and Analysis.
- USEPA, 2011. Exposure Factors Handbook: 2011 Edition. EPA/600/R-09/052F. National Centre for Environmental Assessment. Washington, DC, USA.
- Vega-López, A., Ramón-Gallegos, E., Galar-Martínez, M., Jiménez-Orozco, F., García-Latorre, E. & Domínguez-López, M. (2007). Estrogenic, anti-estrogenic and cytotoxic effects elicited by water from the type localities of the endangered goodeid fish *Girardinichthys viviparus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part C, 145, 394-403.
- Vieira, A., Wegenast, F., Bila, D., Sant`Anna, G. & Dezotti, M. (2015). Analysis of estrogenic activity in environmental waters in Rio de Janeiro state (Brazil) using the yeast estrogen screen. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 120, 41-47.
- Wang, L., Ying, G., Zhao, J., Liu, S., Yang, B., Zhou, L., Tao, R. & Su, H. (2011). Assessing estrogenic activity in surface water and sediment of the Liao River system in northeast China using combined chemical and biological tools. *Environmental Pollution*, 159, 148-156.
- Wang, C.F. & Tian, Y. (2015). Reproductive endocrine-disrupting effects of triclosan: Population exposure, present evidence and potential mechanisms. *Environmental Pollution*, 206, 195-201.
- Westerhoff, P., Yoon, Y., Snyder, S. & Wert, E. (2005). Fate of endocrine-disrupter, pharmaceuticals and personal care product chemicals during simulated drinking water treatment process. *Environmental Science & Technology*, 39, 6649-6663.
- Williams, E.S. & Brooks, B.W. (2012). Human Health Risk Assessment for Pharmaceuticals in the Environment: Existing Practice, Uncertainty, and Future Directions. In *Human Pharmaceuticals in the Environment: Current and Future Perspectives*. Emerging Topics in Ecotoxicology. New York: Springer.
- Xia, C. (2009). Removal of endocrine disrupting compounds in municipal wastewater by membrane bioreactor systems. PhD Doctorate Thesis. National University of Singapore.
- Xu, B., Gao, N., Rui, M., Wang, H. & Wu, H. (2007). Degradation of endocrine disruptor bisphenol A in drinking water by ozone oxidation. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 1(3), 350-356.
- Yamamoto, T. & Yasuhara, A. (2002). Chlorination of bisphenol A in aqueous media: formation of chlorinated bisphenol A congeners and degradation to chlorinated phenolic compounds. *Chemosphere*, 46, 1215-1223.
- Zafra, A., del Olmo, M., Suárez, B., Hontoria, E., Navalón, A. & Vílchez, J.L. (2003). Gas chromatographic–mass spectrometric method for the determination of bisphenol A and its chlorinated derivatives in urban wastewater. *Water Research*, 37, 735–742.
- Zhang, J., Sun, B. & Guan, X. (2013). Oxidative removal of bisphenol A by permanganate: Kinetics, pathways and influences of co-existing chemicals. *Separation and Purification Technology*, 107, 48-53.

ANEXOS

Anexo 1: Balance de masa en las pruebas de ozonación

Compuesto	Cge (mg/l)	Tiempo (min)	DOA (mg/l)	DOT (mg/l)	DOC (mg/l)	ET (%)
BPA	0.96	1	0.48	0.24	0.212	50.0
			0.48	0.24	0.212	50.0
		5	2.40	1.44	1.412	60.0
			2.40	1.44	1.403	60.0
		10	4.80	3.36	3.294	70.0
			4.80	3.12	3.083	65.0
	1.92	1	0.96	0.72	0.701	75.0
			0.96	0.48	0.461	50.0
		5	4.80	3.36	3.351	70.0
			4.80	2.40	2.381	50.0
		10	9.60	5.04	5.021	52.5
			9.60	5.04	5.021	52.5
	2.88	1	1.44	0.96	0.941	66.7
			1.44	0.96	0.941	66.7
		5	7.20	4.32	4.311	60.0
			7.20	4.32	4.301	60.0
		10	14.40	7.68	7.671	53.3
			14.40	8.16	8.151	56.7
4NP	1.08	1	0.54	0.30	0.286	55.6
			0.54	0.30	0.286	55.6
		5	2.70	1.50	1.491	55.6
			2.70	1.50	1.495	55.6
		10	5.40	3.24	3.235	60.0
			5.40	3.00	2.995	55.6
	2.04	1	1.02	0.78	0.771	76.5
			1.02	0.78	0.775	76.5
		5	5.10	4.14	4.131	81.2
			5.10	4.38	4.366	85.9
		10	10.20	7.56	7.541	74.1
			10.20	7.56	7.546	74.1
	3.06	1	1.53	1.05	1.031	68.6
			1.53	1.05	1.036	68.6
		5	7.65	4.53	4.516	59.2
			7.65	4.53	4.516	59.2

		10	15.30	8.58	8.561	56.1
			15.30	8.82	8.801	57.6
TCS	0.96	1	0.48	0.24	0.226	50.0
			0.48	0.24	0.226	50.0
		5	2.40	1.92	1.911	80.0
			2.40	1.44	1.435	60.0
		10	4.80	2.88	2.875	60.0
			4.80	2.88	2.875	60.0
	2.04	1	1.02	0.78	0.771	76.5
			1.02	0.78	0.775	76.5
		5	5.10	2.94	2.931	57.6
			5.10	2.94	2.926	57.6
		10	10.20	4.92	4.901	48.2
			10.20	5.64	5.626	55.3
	2.88	1	1.44	0.96	0.941	66.7
			1.44	0.96	0.946	66.7
		5	7.20	4.08	4.066	56.7
			7.20	4.32	4.306	60.0
		10	14.40	7.44	7.421	51.7
			14.40	7.92	7.901	55.0

DOA: Dosis de ozono aplicada DOT: Dosis de ozono transferida DOC: Dosis de ozono consumida
ET: Eficiencia de transferencia

Anexo 2: Preparación del medio de cultivo BLYES

El medio Yeast Minimal está compuesto por 6 soluciones: medio Yeast Base, glucosa, vitaminas, ácido aspártico, treonina y sulfato de cobre. En primer lugar se realiza el medio base y se esteriliza. Posteriormente se le adicionan las 5 soluciones restantes a través de filtros de membrana.

Medio Yeast Base:

13.61 g	KH ₂ PO ₄	
1.98 g	(NH ₄) ₂ SO ₄	
4.2 g	KOH Pellets	
0.2 g	MgSO ₄	
1 ml	FeSO ₄ solution (40mg/50ml water)	
50 mg	L-histidine	5 ml @ 1g/100ml
50 mg	adenine	5 ml @ 1g/100ml
20 mg	L-arginine-HCl	2 ml @ 1g/100ml
20 mg	L-methionine	2 ml @ 1g/100ml
30 mg	L-tyrosine	3 ml @ 1g/100ml
30 mg	L-isoleucine	3 ml @ 1g/100ml
30 mg	L-lysine-HCl	3 ml @ 1g/100ml
25 mg	L-phenylalanine	2.5 ml @ 1g/100ml
100 mg	L-glutamic acid	1 ml @ 10g/100ml
150 mg	L-valine	5 ml @ 3g/100ml
375 mg	L-serine	10 ml @ 3.75g/100ml

Completar a 1 litro con agua destilada y autoclavar.

Solución de Vitaminas:

en 500 ml adicionar:

8 mg	tiamina	20 mg
8 mg	piridoxina	20 mg
8 mg	ácido pantoténico	20 mg
40 mg	inositol	100 mg
20 ml	solución biotina (2mg/100ml)	50 ml

Solución de Glucosa:

Preparar una solución al 20% w/v en agua.

Solución de ácido aspártico:

Preparar una solución stock de 4 mg/ml en agua.

Solución de Treonina:

Preparar una solución de 24 mg/ml en agua.

Solución de Sulfato de Cobre:

Preparar una solución 20 mM en agua ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} = 0.3745\text{g}/50\text{ml}$).

Para preparar el medio final Yeast Minimal:

Para 1L adicionar:

Medio base	854.5 ml
Solución de vitaminas	10 ml
Solución de glucosa	100 ml
Solución de ácido aspártico	25 ml
Solución de treonina	8 ml
Solución de sulfato de cobre	2.5 ml

Anexo 3: Curvas de calibración

