



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

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESTROGÉNICA DE DISRUPTORES ENDOCRINOS
PRESENTES EN AGUA Y SU REMOCIÓN MEDIANTE OZONO, UTILIZANDO LA
METODOLOGÍA DE BLYES

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

PRESENTA:
EDUARDO DANIEL TECUAPA FLORES

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

COMITÉ TUTOR
DRA. PETIA MIJAYLOVA NACHEVA, INSTITUTO MEXICANO DE TECNOLOGÍA
DEL AGUA
DRA. ALMA CONCEPCIÓN CHÁVEZ MEJIA, INSTITUTO DE INGENIERÍA
DR. ROEB GARCÍA ARRAZOLA, FACULTAD DE QUÍMICA

CDMX. DICIEMBRE 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

Presidente: DRA. MIJAYLOVA NACHEVA PETIA

Secretario: DRA. CHÁVEZ MEJÍA ALMA CONCEPCIÓN

Vocal: DR. GARCÍA ARRAZOLA ROEB

1^{er}. Suplente: DRA. ORTA LEDESMA MARÍA TERESA

2^{do}. Suplente: M. EN C. YAÑEZ NOGUEZ ISAURA

Lugar donde se realizó la tesis:

LABORATORIO DE INGENIERÍA AMBIENTAL, EDIFICIO 5, INSTITUTO DE INGENIERÍA, UNAM

DIRECTOR DE TESIS:

M. EN C. YAÑEZ NOGUEZ ISAURA

FIRMA



El trabajo experimental fue realizado en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental del Instituto de Ingeniería que cuenta con certificación de la calidad ISO 9001:2008 otorgada por el Instituto Mexicano de Normalización y Certificación, A.C. (IMNC) con registro RSGC 960 de fecha 11 de enero de 2016 vigente al 11 de enero de 2019.

DICATORIA

Esta tesis se la quiero dedicar a Dios por permitirme seguir vivo y ser mi guía a lo largo de este camino.

Con especial dedicación a mi familia, pero sobre todo a mi madre Ma. Isabel Flores Barragán por todo su apoyo y consejos a lo largo de mi vida, por impulsarme a superarme, por hacerme una mejor persona porque sin ti esto no hubiera sido posible.

A ti Amancio Encarnación Gómez por guiarme por el buen camino.

A mis hermanos Arturo y Diego, por su cariño y apoyo, por estar siempre conmigo incondicionalmente.

A mi hermano adoptivo Rafael por dar alegría a nuestras vidas.

AGRADECIMIENTOS

A la coordinación de Estudios de Posgrado (CEP) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo brindado para el desarrollo de este proyecto de investigación.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM <<PAPIIT IN112416>> <<"Evaluación de la actividad estrogénica de micro-contaminantes presentes en agua residual y en agua para abastecimiento">> y a la DGAPA-UNAM por la beca recibida.

A la M. en C. Isaura Yañez Noguez, directora de esta tesis, por haberme dado la oportunidad de desarrollar este proyecto, por el apoyo incondicional brindado durante este tiempo, por su supervisión, paciencia y sobre todo por la confianza depositada en mí.

A la Dra. María Teresa Orta Ledesma por el apoyo incondicional brindado en el desarrollo de la presente investigación.

A la Dra. Alma Concepción Chávez Mejía y Dra. Petia Majaylova Nacheva por sus conocimientos brindados y por la dedicación en el asesoramiento para la realización de este proyecto. Así como al Dr. Roeb García Arrazola por el asesoramiento y observaciones realizadas en el desarrollo del presente escrito.

A Griselda Rocha y Elizabeth Arias por su valiosa amistad y apoyo en el desarrollo de este proyecto.

A mis compañeros de departamento Raúl Campos y Noé Contreras por su amistad y los buenos momentos vividos durante estos dos años.

A mis amigos de generación Alondra, Cony, Ernesto, Gabo y Sandra por haberme adoptado en su cubículo y hacerme parte de él, gracias.

A Isaac Nava mi gran amigo y compañero de gym por su apoyo y consejos durante este tiempo.

A mis compañeros del cubículo 410 Axa, Andrea, Anahí, Eric, Enrique, Fatima, Jessica, Rebeca, Regina, Vero y Tere por hacer agradables los momentos dentro y fuera del laboratorio.

Resumen

El acoplamiento de dos metodologías analíticas: Bioluminescent Yeast Estrogen Screen (BLYES) y Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS) fue estudiado para evaluar tanto la actividad estrogénica, como la presencia y concentración de compuestos disruptores endócrinos (Endocrine Disrupting Chemicals, EDC por sus siglas en inglés) en agua para abastecimiento. Cinco EDC fueron evaluados para demostrar la aplicabilidad de BLYES-GC/MS. El acoplamiento consistió en que a partir de un único extracto de la muestra es posible determinar la actividad estrogénica, además de detectar y cuantificar EDC tales como Nonilfenol, 4-nonilfenol, Triclosan, Bisfenol-A y Estrona en agua para abastecimiento. Muestras fortificadas de agua de pozo con 1000 ng/L de cada compuesto fueron evaluadas, estableciéndose un Límite de Detección (LDM) de 0.5 ng/L obtenido mediante GC/MS. La determinación de la actividad estrogénica por BLYES se realizó usando una curva de calibración, la cual se presenta en ng/L de equivalentes de 17 β -estradiol (EEQ). Se determinó la concentración mínima inhibitoria que causa efecto al 50% de las muestras fortificadas (CI₅₀). Se corroboró que la actividad estrogénica máxima observada fue entre 5.56 y 11.16 ng/L EEQ. Así mismo se evaluó un tratamiento de oxidación con ozono para la remoción y evaluación de la actividad estrogénica de los cinco EDC presentes en muestras de agua abastecimiento, esto a partir de un diseño experimental en el que se estudiaron como variables la concentración de ozono en fase gas (C_{ge}) y el tiempo de contacto. Se obtuvieron remociones mayores al 90% para los cinco EDC estudiados y se determinó la actividad estrogénica en un rango 5.8 a 7.4 ng/L EEQ obteniendo una reducción mayor al 93% después del tratamiento con ozono, mostrándose el ozono como una alternativa eficaz en la reducción de la actividad estrogénica de EDC presentes en agua. Se demostró que el acoplamiento de BLYES-GC/MS es aplicable para calcular la actividad estrogénica, detectar y además cuantificar EDC en agua de abastecimiento sin la necesidad de realizar la extracción de los analitos por separado. Las ventajas del acoplamiento son el ahorro de tiempo del análisis, menor volumen de muestra y de disolventes orgánicos, así como la optimización de los materiales para el tratamiento de la muestra, esto contribuye a eficientar ambas metodologías y reducir el impacto al ambiente.

Abstract

The coupling of two analytical methodologies: Bioluminescent Yeast Estrogen Screen (BLYES) and Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS) was studied to evaluate both estrogenic activity, as well as the presence and concentration of endocrine disrupting compounds (EDCs) in water supply. Five EDCs were evaluated to demonstrate the applicability of BLYES-GC/MS. The coupling consisted in that, from a single extract of the sample, it is possible to determine the estrogenic activity, in addition to detecting and quantifying EDCs such as Nonylphenol, 4-nonylphenol, Triclosan, Bisphenol-A and Estrone in water supply. Fortified samples of well water with 1000 ng/L of each compound were evaluated, establishing a Limit of Detection (LOD) of 0.5 ng/L obtained by GC/MS. The determination of estrogenic activity by BLYES is performed using a calibration curve, which is presented in ng/L of 17 β -estradiol equivalents (EEQ). The minimum inhibitory concentration causing effect (CE₅₀) was determined in 50% of the fortified samples. It was corroborated that the maximum estrogenic activity observed was between 5.56 and 11.16 ng/L EEQ. The ozone treatment was evaluated for the removal and evaluation of the estrogenic activity of the five EDCs present in samples of water supply, this is based on an experimental design in which concentration in the gas phase (C_g) and contact time were studied as variables. Removals greater than 90% were obtained for the five EDCs studied and estrogen activity was determined in a range 5.8 to 7.4 ng/L EEQ obtaining a reduction greater than 93% after ozone treatment. Showing ozone as an effective alternative in reducing the estrogenic activity of EDCs present in water. The advantages of the coupling are the saving of analysis time, reduced sample volume, and organic solvents, as well as the optimization of the materials for the treatment of the sample, this contributes to efficient both methodologies and to reduce the impact on the environment.

Índice

1. INTRODUCCIÓN	14
2. OBJETIVOS	15
Objetivo general	15
Objetivos específicos	15
Hipótesis.....	16
Alcances.....	16
3 FUNDAMENTOS TEÓRICOS DEL TEMA	17
3.1 Contaminantes emergentes	17
3.2 Disruptores endocrinos	18
3.3 Disruptores endocrinos específicos	21
3.3.1 Nonilfenol	21
3.3.2 Bisfenol A.....	23
3.3.3 Triclosán.....	25
3.3.4 Estrona.....	27
3.4 Evaluación de la actividad estrogénica	31
3.4.1 BLYES.....	32
3.5 Extracción, detección y cuantificación de EDC en agua	33
3.6 Procesos de oxidación avanzada (POAs)	34
3.6.1. Ozono.....	35
4. ANTECEDENTES	37
4.1. Uso del agua en México	37
4.2. Reúso del agua en México	37
4.3. Sistema de abastecimiento de agua de la Ciudad de México	38
4.4 Sistema de abastecimiento de agua en la UNAM	40
4.5 Contaminación de fuentes de abastecimiento por EDC	40
4.6 Determinación de actividad estrogénica en agua de abastecimiento	42
4.7 Remoción de EDC por procesos de oxidación avanzados	43
5 METODOLOGÍA	45
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESTROGÉNICA MEDIANTE BLYES	45
5.1. Implementación de técnica de BLYES	45
5.1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BLYES y condiciones de cultivo	45

5.1.2.	Extracción de los EDC	46
5.1.3.	Dilución de las muestras.....	47
5.1.4.	Lectura de las muestras (placas serológicas)	48
5.2.	Cromatografía De Gases Espectrometría De Masas (GC/MS)	50
	TRATAMIENTO DE DISRUPTORES ENDOCRINOS	52
5.3.	Tratamiento con ozono	52
5.3.1	Balance de masa del ozono en el reactor.....	53
5.4.	Diseño experimental	54
5.5.	Parámetros de calidad del agua	55
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
6.1.	Implementación y aplicación de las técnicas BLYES y BLYES-GC/MS para evaluar la presencia de EDC en agua, así como su actividad estrogénica	57
6.2.	Aplicación de la técnica BLYES-GC/MS en agua de pozo	60
6.3.	Aplicación de la técnica BLYES-GC/MS para determinar la actividad estrogénica durante el tratamiento oxidación con ozono del agua de pozo fortificada con EDC....	61
6.4.	Determinación de la remoción de EDC obtenida en el proceso de ozonación... 63	
6.4.1.	Remoción de nonilfenol	64
6.4.2.	Efectos de las interacciones entre variables que afectan la remoción de nonilfenol por ozonación.....	65
6.4.3.	Pruebas de ozonación para la remoción de 4-nonilfenol	67
6.4.4.	Efectos de las interacciones entre variables que afectan la remoción de nonilfenol por ozonación.....	68
6.4.5.	Pruebas de ozonación para la remoción de triclosan	70
6.4.6.	Efectos de las interacciones entre variables que afectan la remoción de triclosan por ozonación.	71
6.4.7.	Pruebas de ozonación para la remoción de Bisfenol-A.....	74
6.4.8.	Efectos de las interacciones entre variables que afectan la remoción de bisfenol-A por ozonación.....	75
6.4.9.	Pruebas de ozonación para la remoción de estrona	77
6.4.10.	Efectos de las interacciones entre variables que afectan la remoción de estrona por ozonación.....	78
6.5	Balance masa del proceso de ozonación	80
7.	CONCLUSIONES	82
8.	REFERENCIAS.....	84
9.	Lista de memorias de congreso	93

10. ANEXOS	94
10.1. Anexo A: Curvas de calibración de EDC en estudio	94
10.2. Anexo B: Parámetros de calidad del agua	97
10.3. Anexo C: Comparación de los cromatogramas obtenidos antes y después del proceso de ozonación.	99
10.4. Anexo D: Balance de masa	100

Índice de tablas

Tabla 3.1. Principales disruptores endocrinos presentes en el ambiente	19
Tabla 3.2. Propiedades de los nonilfenoles	22
Tabla 3.3. Propiedades del bisfenol A	24
Tabla 3.4. Propiedades del triclosán	26
Tabla 3.5. Propiedades de la estrona	28
Tabla 3.6. EDC encontrados en aguas de México	29
Tabla 3.7. Concentraciones de EDC encontradas en aguas de abastecimiento del Valle de Tula, Hidalgo	31
Tabla 4.2. Sistema de abastecimiento de agua en la CDMX.	39
Tabla 5.1. Diluciones del extracto concentrando para la prueba BLYES	47
Tabla 5.2. Diluciones de 17β- estradiol para la curva de calibración BLYES	48
Tabla 5.3. Condiciones óptimas de análisis para la detección, identificación y cuantificación de EDC en agua para abastecimiento mediante GC/MS	50
Tabla 5.4. Tiempos de retención e iones característicos de los disruptores endócrinos. 51	
Tabla 5.5. Concentración de los EDC fortificados en las muestras de agua de pozo para probar el método analítico.	52
Tabla 5.6. Características del agua de abastecimiento	52
Tabla 5.7. Variables consideradas en el diseño experimental	54
Tabla 5.8. Diseño experimental factorial 3² para las pruebas oxidación con ozono	54
Tabla 5.9. Parámetros de calidad del agua considerados durante el proceso	55
Tabla 6.1. Concentración Y Actividad estrogénica evaluada en agua de abastecimiento fortificada con EDC aplicando la metodología de BLYES-CG/MS.	60
Tabla 6.2. Evaluación de agua de pozo de abastecimiento de Química mediante la técnica BLYES-GC/MS.	61
Tabla 6.3. Resultados de la actividad estrogénica evaluada con BLYES de las muestras fortificadas con la mezcla de los cinco EDC antes y después del tratamiento con ozono. 62	
Tabla 6.4. Resultados obtenidos de las pruebas de ozonación para la remoción de nonilfenol.	64
Tabla 6.5. Análisis de la Varianza para la remoción de nonilfenol.	64
Tabla 6.6. Mejores valores de los factores evaluados para lograr la mayor remoción de nonilfenol por ozonación.	67

Tabla 6.7. Resultados obtenidos de las pruebas de ozonación para la remoción de 4-nonilfenol. 67

Tabla 6.8. Análisis de la Varianza para la remoción de 4-nonilfenol.	68
Tabla 6.9. Mejores valores de los factores evaluados para lograr la mayor remoción de 4-nonilfenol por ozonación.	70
Tabla 6.10. Resultados obtenidos de las pruebas de ozonación para la remoción de triclosan.	70
Tabla 6.11. Análisis de la Varianza para la remoción de triclosan	71
Tabla 6.12. Mejores valores de los factores evaluados para lograr la mayor remoción de triclosán por ozonación.	73
Tabla 6.13. Resultados obtenidos de las pruebas de ozonación para la remoción de Bisfenol-A.	74
Tabla 6.14. Análisis de la Varianza para la remoción de Bisfenol-A.	74
Tabla 6.15. Mejores valores de los factores evaluados para lograr la mayor remoción de bisfenol-A por ozonación.	76
Tabla 6.16. Resultados obtenidos de las pruebas de ozonación para la remoción de estrona.	77
Tabla 6.17. Análisis de la Varianza para la remoción de estrona.	77
Tabla 6.18. Mejores valores de los factores evaluados para lograr la mayor remoción de estrona por ozonación.	79
Tabla 6.19. Condiciones óptimas para la remoción de EDC.	80
Tabla 6.20. Balance de masa del proceso de ozonación para la remoción de EDC.	81

Índice de Figuras

Figura 3.1. Estructura química de los nonilfenoles (uno de sus isómeros) (TOXNET, 2017)	22
Figura 3.2. Estructura química del bisfenol A (TOXNET, 2017).	24
Figura 3.3. Estructura química del triclosán (TOXNET, 2017).	25
Figura 3.4. Estructura química de la estrona (TOXNET, 2017).	28
Figura 5.1 Cultivo Saccharomyces cerevisiae BLYES	46
Figura 5.2. Extracción en fase sólida (SPE) de EDC	47
Figura 5.3. Evaporación de metanol con nitrógeno gas	47
Figura 5.4. Esquema para el llenado de las placas serológicas, recomendable para el control adecuado en el manejo de las muestras BLYES.	48
Figura 5.5. Diagrama general de la metodología para determinar actividad estrogénica en muestras de agua.	49
Figura 5.6. Cromatograma de los estándares de referencia de EDC: Nonilfenol, 4-nonilfenol, Triclosan, Bisfenol-A y Estrona usados para la fortificación de la muestra.	51
Figura 5.7. Esquema del sistema de tratamiento con ozono	53
Figura 6.1. Actividad estrogénica (EEQ 17β-estradiol ng/L) de Nonilfenol, 4-nonilfenol, Triclosán, Bisfenol-A y Estrona analizados como mezcla en una muestra fortificada de agua para abastecimiento.	58
Figura 6.2. Actividad estrogénica (EEQ 17β-estradiol ng/L) de Nonilfenol, 4-nonilfenol, Triclosan, Bisfenol-A y Estrona analizados individualmente en una muestra fortificada de agua para abastecimiento.	58

Figura 6.3. Reducción de la actividad estrogénica de muestras de agua fortificada con cinco EDC mediante el tratamiento con ozono.	62
Figura 6.4. Resultados del tratamiento con ozono para la remoción de cinco EDC presentes en agua de pozo fortificada.....	63
Figura 6.5. Diagrama de Pareto estandarizado para la remoción de nonilfenol.....	66
Figura 6.6. Gráfica de efectos principales para la remoción de nonilfenol.	66
Figura 6.7. Superficie de respuesta estimada para los factores significativos en la remoción de nonilfenol	67
Figura 6.8. Diagrama de Pareto estandarizado para la remoción de 4-nonilfenol	69
Figura 6.9. Gráfica de efectos principales para la remoción del 4-nonilfenol.....	69
Figura 6.10. Superficie de respuesta estimada para los factores significativos en la remoción de 4-nonilfenol-	70
Figura 6.11. Diagrama de Pareto estandarizado para la remoción de triclosan.....	72
Figura 6.12. Gráfica de efectos principales para la remoción del triclosan.....	72
Figura 6.13. Superficie de respuesta estimada de los factores significativos en la remoción de triclosán.	73
Figura 6.14. Diagrama de Pareto estandarizado para la remoción de Bisfenol-A.	75
Figura 6.15. Gráfica de efectos principales para la remoción del bisfenol-A.	76
Figura 6.16. Superficie de respuesta estimada de los factores significativos en la remoción de bisfenol-A.	76
Figura 6.17. Diagrama de Pareto estandarizado para la remoción de estrona.....	78
Figura 6.18. Gráfica de efectos principales para la remoción del estrona.	79
Figura 6.19. Superficie de respuesta estimada de los factores significativos en la remoción de estrona.....	79
Figura 6.20. Balance de masa de las pruebas de ozono.	81

1. INTRODUCCIÓN

La presente investigación está enfocada a proponer soluciones a una problemática que afecta a la sociedad actual: la contaminación del agua por contaminantes de tipo químico, específicamente aquellos llamados “emergentes”. Uno de los efectos de mayor preocupación y repercusión, tanto en la salud humana como en la de otros organismos, es la disrupción endócrina (alteración del sistema endócrino) por parte de algunos de los mencionados contaminantes emergentes. La agencia americana para la protección del medio ambiente de Estados Unidos (USEPA, Environmental Protection Agency, por sus siglas en inglés) define a los disruptores endócrinos (por sus siglas en inglés EDCs; endocrine disrupting chemicals) como xenobióticos que interfieren en la síntesis, secreción, transporte, unión, acción o eliminación de las hormonas naturales en el cuerpo, las cuales son responsables del mantenimiento de homeostasis, reproducción, desarrollo y/o comportamiento de los organismos (Selma, 2014). Los productos farmacéuticos, los EDCs y los productos para el cuidado personal (por sus siglas en inglés PCPs; personal care products); son clasificados como contaminantes emergentes, los cuales pueden tener efectos adversos significativos tanto en el ambiente como en la salud humana (Jiang, 2013). La relevancia de esta investigación tiene que ver con la presencia de dichos compuestos en el agua subterránea por efecto de la contaminación proveniente de las aguas residuales tanto urbanas como industriales por infiltración a los acuíferos debido a que en México el 96% del agua tratada es reutilizada para riego (IMTA, 2012). Esto fundamentado en el hecho de que en México, estudios previos han detectado la presencia de dichos contaminantes provenientes del agua residual y residual tratada para reúso (Durán, 2009; Díaz, 2013; Estrada, 2013; Peña, 2015). Ante ésta problemática es preciso extender las investigaciones respecto a los EDC en nuestro país visualizando además diferentes vertientes, tales como la presencia de dichos contaminantes en agua, determinar su actividad estrogénica para discernir el potencial riesgo que ello implica, así como investigar procesos de oxidación avanzada tales como el ozono como opción factible para la remoción de los EDC y por ende la disminución de la actividad estrogénica en las fuentes de agua contaminadas.

A la fecha, los procesos de tratamiento del agua para consumo humano en México se han enfocado en la desinfección propiamente del agua y en la detección de compuestos químicos en general, sin embargo, se ha dejado a un lado la detección y el tratamiento de los compuestos emergentes con la consecuente limitante de evaluar su actividad estrogénica en concentraciones de nanogramos. Determinar el potencial de la actividad estrogénica que dichos compuestos presentan en el agua, es transcendental, ya que entre más actividad estrogénica se determine en una muestra, mayor efecto puede darse en la modificación de las funciones endócrinas naturales de los organismos, las cuales son directamente afectadas al consumir agua contaminada con dichos compuestos.

En la presente tesis se propone una metodología innovadora en México para medir dicha actividad estrogénica mediante la metodología BLYES (por sus siglas en inglés, Bioluminescent Yeast Estrogen Screen) y su acoplamiento con técnicas analíticas precisas como la Cromatografía de Gases- Espectrometría de Masas GC/MS (por sus siglas en inglés Gas Chromatography-Mass Spectrometry) para cuantificar EDC que pudieran estar presentes en fuentes de agua para suministro. Así también estudiar la remoción de los mismos con la consecuente disminución de actividad estrogénica aplicando ozono.

2. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la actividad estrogénica y la concentración de disruptores endocrinos presentes en agua para abastecimiento, utilizando la técnica BLYES-GC/MS; así como su remoción mediante un proceso de oxidación con ozono.

Objetivos específicos

1. Implementar la metodología de BLYES para evaluar la actividad estrogénica de EDC a partir de una muestra de agua de pozo fortificada con triclosán, 4-nonilfenol, nonilfenol, bisfenol-A y estrona.
2. Comprobar la presencia de los EDC: triclosán, 4-nonilfenol, nonilfenol, bisfenol-A y estrona en la muestra problema fortificada, mediante la detección y cuantificación por cromatografía de gases acoplada espectrometría de masa (GC/MS).
3. Acoplar las metodologías BLYES-GC/MS para que a partir de un mismo extracto sea posible detectar, identificar y cuantificar los EDC, además de determinar su actividad estrogénica.
4. Determinar las condiciones (dosis y tiempo de contacto) del tratamiento de oxidación con ozono para lograr la remoción y la disminución de la actividad estrogénica de los EDC a partir de la muestra problema fortificada.
5. Probar la técnica BLYES-GC/MS para detectar, identificar y cuantificar los EDC así como determinar su actividad estrogénica en muestras de agua subterránea: agua de un pozo de abastecimiento de Ciudad Universitaria-UNAM.

Hipótesis

El agua de abastecimiento de Ciudad Universitaria contaminada con disruptores endocrinos presenta actividad estrogénica que se disminuirá mediante un tratamiento de oxidación con ozono el cual permitirá la remoción de dichos compuestos.

Alcances

- Mediante el acoplamiento de la técnica BLYES-GC/MS se logró identificar, detectar y cuantificar cinco disruptores endocrinos en agua de abastecimiento así como evaluar su actividad estrogénica.
- Para el desarrollo de la técnica BLYES-GC/MS se utilizó agua de abastecimiento fortificada con disruptores endocrinos como muestra modelo con el fin de probar la aplicabilidad de la técnica en un agua real.
- El uso de un tratamiento de oxidación con ozono es factible para la remoción de cinco disruptores endocrinos presentes en muestras de agua de abastecimiento así como para disminuir el potencial estrogénico de estos compuestos.

3 FUNDAMENTOS TEÓRICOS DEL TEMA

3.1 Contaminantes emergentes

Para satisfacer el creciente aumento de la población mundial, miles de productos se elaboran diariamente, ocasionando un aumento descontrolado en las emisiones de contaminantes químicos al ambiente, siendo así una potencial amenaza para todo organismo con que se encuentren en contacto; entre estos contaminantes se encuentran los llamados “emergentes” que son compuestos de distinto origen y naturaleza química, cuya presencia en el ambiente no se considera significativa en términos de distribución y/o concentración, por lo que pasan inadvertidos; no obstante, están siendo ampliamente detectados y tienen el potencial de tener un impacto ecológico negativo, así como efectos adversos sobre la salud (Barceló y López, 2007; Stuart *et al.*, 2012). La característica de estos grupos de contaminantes es que no necesitan estar constantemente en el ambiente para causar efectos negativos, puesto que sus altas tasas de transformación/remoción se pueden compensar por su introducción continua en el ambiente (Barceló y López, 2007).

Actualmente cuando se habla de contaminantes emergentes se refiere a los surfactantes, productos farmacéuticos, productos para el cuidado personal, aditivos de las gasolineras, retardantes de fuego, antisépticos, aditivos industriales, esteroides y hormonas y subproductos de la desinfección del agua (Becerril, 2009).

Generalmente estos compuestos se encuentran en bajas concentraciones que van de partes por millón hasta partes por trillón; y no se encuentran regulados o reglamentados en la mayoría de los países (Kuster *et al.*, 2008). Una de las principales fuentes de contaminantes emergentes son las aguas residuales que no reciben ningún tratamiento y los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales, las cuales no están diseñadas para tratar este tipo de sustancias. Por lo que una alta proporción de estos compuestos y sus metabolitos no sufren ningún cambio y entran con una gran toxicidad al medio acuático, como acuíferos y sistemas marinos entre otros (Dougherty *et al.*, 2010).

Los contaminantes emergentes son de gran interés científico, ya que sus emisiones en el ambiente pueden aumentar la presencia de bacterias resistentes (Daughton *et al.*, 1999), además debido a sus propiedades fisicoquímicas (alta solubilidad en agua y poco biodegradable) son capaces de llegar a cualquier medio natural y representar un grave riesgo para el agua de consumo humano (Knepper *et al.*, 1999).

La mayoría de estos contaminantes emergentes también han sido reconocidos como disruptores endocrinos u hormonales, los cuales son un grupo de compuestos químicos clasificados por la EPA como posibles agentes cancerígenos (USEPA, 2014).

Estos productos corresponden en la mayoría de los casos a contaminantes que pueden ser candidatos a regulación, sin embargo se requiere de una amplia investigación sobre sus efectos potenciales en la salud (USEPA, 2014).

3.2 Disruptores endocrinos

Entre los contaminantes emergentes encontramos algunos que pueden presentar alteraciones endocrinas, entre los que se incluyen pesticidas, productos químicos industriales, productos farmacéuticos y fitoquímicos. Estos productos químicos se distribuyen extensamente en el ambiente, y pueden presentar efectos miméticos o antagónicos en las funciones biológicas de las hormonas naturales (Bacerril, 2009).

Los disruptores endocrinos (EDC) son sustancias químicas con el potencial para provocar efectos negativos sobre el sistema endocrino de los seres humanos y la vida silvestre (Liu *et al.*, 2009). La Agencia de Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos (EPA) los define como agentes exógenos que interfieren en la síntesis, secreción, transporte, acción o eliminación de hormonas naturales en el cuerpo, que son responsables para el mantenimiento de la homeostasis, reproducción, desarrollo y/o comportamiento (EPA, 1997).

Varios compuestos químicos naturales y sintéticos han sido identificados que inducen respuestas similares al estrógeno; incluidos los productos farmacéuticos, pesticidas, productos químicos industriales y metales pesados (Giesy *et al.*, 2002).

Los efectos asociados con la presencia de EDC en el ambiente son:

1. Reducción de la rotura de los huevos de aves, peces y tortugas.
2. Feminización de peces machos.
3. Algunos problemas en el sistema reproductivo de los peces, reptiles, aves y mamíferos.
4. Los cambios en el sistema inmunológico de los mamíferos marinos.
5. En algunos casos, estos efectos pueden conducir a la disminución de las poblaciones.

Los EDC son conocidos principalmente por alterar el sistema hormonal y homeostático de los seres vivos. Estos sistemas son de primordial importancia ya que están involucrados en la regulación de varios procesos importantes como el metabolismo, el desarrollo sexual, la producción y utilización de insulina, del crecimiento, de respuesta al estrés, la conducta de género, reproducción e incluso del desarrollo fetal (Rahnman *et al.*, 2015).

Teniendo en cuenta las características estructurales de los EDC, es muy difícil establecer una relación entre ellos. Esto debido a los diversos mecanismos de acción de los EDC en los organismos. Además, a veces, el metabolito de estos compuestos es más peligroso que el compuesto original. Aunque, hay algunas características estructurales que son indicativas de alteración endocrina, generalmente no es posible determinar si un compuesto es un EDC con base en su estructura, sin embargo se ha observado que se requiere un anillo fenólico sin halógenos, grupos funcionales sulfona, cloro y bromo junto al grupo $\cdot\text{OH}$ en el anillo fenólico para que se lleve a cabo la actividad de los EDC (Rahnman *et al.*, 2015)

La consecuencia más preocupante del amplio uso y difusión ambiental de los países de Europa central es el aumento de las posibles vías de exposición para los seres humanos,

como la ingestión de plantas de alimentos cultivados en suelos contaminados o regados con agua tratada, la ingestión de carne o demás productos de origen animal, y el consumo de agua del grifo, de agua subterránea contaminada o agua superficial.

En la Tabla 3.1, se muestra una clasificación de los EDC más utilizados a nivel mundial, así como el origen o uso de cada uno de ellos.

Tabla 3.1. Principales disruptores endocrinos presentes en el ambiente

Clase EDC	Compuesto detectado	Uso / origen
Los ftalatos	Butilbencilftalato, di- (2-etilhexil) ftalato y di- n –butilftalatos	Se encuentran en los detergentes, resinas, algunas adictivas y monómeros utilizados en la producción de plásticos
Pesticidas	DDT, DDE, deltametrina, carbofurano, atrazina, el lindano, vinclozolina, carbendazim y tributilestaño	Utilizado ampliamente en la agricultura. Los insecticidas, herbicidas y fungicidas se incluyen en esta clase
Compuestos orgánicos de estaño	Tributilestaño y trifenilestaño	Los compuestos utilizados en pinturas antiincrustantes en los buques
Alquilfenoles (tensioactivos)	Nonilfenol, etoxilato nonilfenol, octilfenol, octilfenol etoxilato.	Se utilizan durante la producción de resinas de fenol, como aditivos de plástico, emulsionantes, en aplicaciones agrícolas e industriales
Las dioxinas y furanos	Dibenzo p dioxina, 2, 3, 7, 8-tetraclorodibenzo-p-dioxina y 2, 3, 7, 8-tetraclorodibenzofurano	Ellos pueden ser producidos durante la incineración de compuestos aromáticos clorados, papel y en la producción de plástico PVC
Bisfenoles	El bisfenol A	El bisfenol A se utiliza en la fabricación de polímeros (policarbonatos y resinas epoxi), retardantes de llama y productos químicos de caucho
Los parabenos	Metilo, etilo, propilo y butilparabeno	Los compuestos utilizados como conservantes en la mayoría de cosméticos, productos de cuidado personal
Los bifenilos policlorados (PCB)	2, 2', 4, 4'-tetrabrominado difenil éter, 2, 5-dicloro-4, hidroxibifenil	Los PCB se han utilizado como refrigerantes y lubricantes en transformadores, condensadores y otros equipos eléctricos. A pesar de que ya no se utilizan, están presentes de algunas instalaciones antiguas

Continua Tabla 3.1

Clase EDC	Compuesto detectado	Uso / origen
Hidrocarburos aromáticos policíclicos	Fluoreno, el fenantreno, antraceno, antraceno, pireno, y naftaleno	Los compuestos generados durante los procesos de combustión incompleta del carbón, el petróleo y la madera
Retardantes de llama bromados	Hexabromociclododecano, éteres de difenilo poli-bromado y tetrabromobisfenol A	Los compuestos utilizados en muchos productos, incluyendo muebles, textiles, equipos electrónicos
Farmacéuticos (esteroides sintéticos)	Dietilestilbestrol y 17 α -etinilestradiol	Farmacéuticos se compone principalmente de los anticonceptivos orales, así como los esteroides utilizados para la terapia de sustitución durante la menopausia
Los fitoestrógenos	Daidzen y genisteína, matairesol, enterodiol y enterolactona	Las sustancias naturales que se encuentran en muchas plantas de alimentos, como granos, cereales, verduras, frutas y otras
Las hormonas naturales	La estrona, 17 β -estradiol	Los estrógenos de forma natural y cotidiana excretados en la orina humana y los animales
Metales pesados	Cadmio, mercurio y plomo	La minería industrial y la metalurgia

(Fuente: Esplugas et al., 2007)

En la actualidad se conocen 45 compuestos con propiedades disruptoras confirmadas, y unos 600 considerados potenciales disruptores endocrinos, los cuales han sido introducidos en los circuitos ambientales y están presentes en la vida cotidiana (Argemi *et al.*, 2005). Entre los EDC naturales más importantes se pueden mencionar las feromonas y los fitoestrógenos. Entre los EDC artificiales se encuentran: Insecticidas y sus metabolitos, funguicidas, moluscocidas y herbicidas, sustancias de uso cotidiano en el hogar o la industria como bifenilos policlorados (BPCs), ftalatos, bisfenol-A, alquilfenoles, alquilfenoles polietoxilados (APES) y en particular el producto de degradación mayoritario de éstos el 4-n-nonilfenol (4-NP), estrógenos artificiales como el dietilestilbestrol (DES), componentes de los filtros UV en cremas (3-benzofenona), contaminantes ambientales como las dioxinas, los furanos y ciertos hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), farmacéuticos y productos de cuidado personal tanto para humanos como animales, incluyendo no tan sólo

medicamentos si no también fragancias, bloqueadores solares entre muchos otros más (Argemi *et al.*, 2005).

Esto conlleva a extender las investigaciones respecto a los EDC en nuestro país visualizando además diferentes vertientes:

1. La presencia de dichos contaminantes en agua residual cruda y residual tratada con fines de reúso, y la posible contaminación (por infiltración) de agua subterránea.
2. Además de la presencia de dichos compuestos, determinar su actividad estrogénica para discernir el potencial riesgo que ello implica.
3. Investigar procesos de oxidación avanzada como opción factible para la remoción de los EDC.

3.3 Disruptores endocrinos específicos

En la presente tesis se trabajaron los compuestos: nonilfenol, 4-nonilfenol, bisfenol-A, triclosán y estrona, los cuales se encuentran entre los EDC más comunes en el mundo, esto debido al uso comercial y a la presencia de estos compuestos en aguas superficiales, subterráneas en la Ciudad de México (Félix *et al.*, 2013). A continuación se describen las características principales de cada los EDC en estudio, como lo es su uso, propiedades fisicoquímicas, rutas de entrada al ambiente, concentraciones en el ambiente y los efectos ocasionados por exposición a estos compuestos.

3.3.1 Nonilfenol

El nonilfenol (NP) es un disruptor endocrino que se encuentra dentro del grupo de compuestos isómeros ($C_{15}H_{24}O$). Su estructura química consta de un anillo aromático central de benceno con un grupo alcohol al que se une una cadena lateral de nueve átomos de carbono (Figura 3.1), lo que lo hace un compuesto hidrofóbico con una alta tendencia a adsorberse en diferentes materiales (Ahel *et al.*, 1993).

El NP se utiliza en muchas actividades industriales tales como formación de resinas epoxy y la industria del cuero, también se emplea como materia prima en la producción de nonilfenoles etoxilados, como un coformulante en plaguicidas y como aditivo de aceite lubricante.

La producción a nivel mundial de estos compuestos se estima en más de 200.000 toneladas al año (USEPA, 2010), siendo el 4-nonilfenol (4-NP) el más común, en el que la cadena lateral se une al anillo en el lado opuesto al carbono con el grupo hidroxilo (Cox, 1996). La principal aplicación del 4-NP es la producción de etoxilados empleados en la fabricación de detergentes de uso doméstico e industrial. Además se encuentra presente en pinturas, adhesivos, pesticidas y endurecedores de resinas epoxy y se emplea en la producción de papel y de productos cosméticos, así como en la industria textil. Por otro lado también se usa en diferentes productos de laboratorio, en los agentes de curtido, como antioxidante

en plásticos, como aditivo en los aceites lubricantes y en productos de limpieza de las ubres de vacas lecheras.

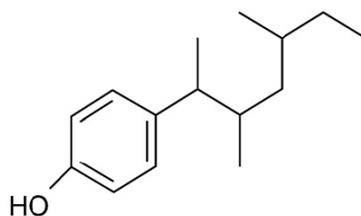


Figura 3.1. Estructura química de los nonilfenoles (uno de sus isómeros) (TOXNET, 2017)

En la Tabla 3.2 se muestran algunas propiedades de estos compuestos.

Tabla 3.2. Propiedades de los nonilfenoles

Fórmula molecular	C ₁₅ H ₂₄ O
Peso Molecular	220.34 g/mol
Densidad a 25 °C	0.952 g/cm ³
Solubilidad en agua a 25 °C	4.9 mg/L
Coeficiente de partición (log K _{wo})	4.48
Presión de vapor a 25 °C	2.07 x 10 ⁻² Pa

(Fuente: TOXNET, 2017)

Investigaciones recientes han corroborado que la presencia de NP en el ambiente se debe a actividades antropogénicas, siendo la descarga de los efluentes de las plantas de tratamiento cercanas a las zonas urbanas e industriales, las principales causantes de la contaminación por NP en ríos, estuarios, océanos y sedimentos (Soares *et al.*, 2008).

En México, diversos estudios demuestran la presencia de NP en medios acuáticos, las investigaciones desarrolladas se han enfocado principalmente en influentes y efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales. Elizalde en 2003 detectó la presencia de nonilfenoles en el Distrito de Riego 03 Valle de Mezquital; Gibson en 2007 también reportó la presencia de estos compuestos en aguas residuales provenientes del Emisor Central, en el Valle de México. Molina en 2008 analizó la presencia nonilfenoles en siete plantas de tratamiento de aguas residuales distribuidas en el Distrito Federal y Querétaro. Silva en 2009, analizó la presencia de EDC en el Emisor Central, así como en fuentes de abastecimiento del Valle de Tula, reportando la presencia de nonilfenoles en dichas fuentes,

por otra parte Ramírez en 2010, corroboró la presencia de estos compuestos en la PTAR de Cerro de la Estrella, ubicada en Iztapalapa. Las concentraciones reportadas se muestran en la Tabla 3.6.

Tanto el NP como sus derivados etoxilados están incluidos en la lista de sustancias peligrosas prioritarias de la Directiva Marco del Agua (Directiva 2000/60/CE), actualizada por la Directiva 2013/39/UE, y su uso está actualmente regulado en la Unión Europea (Directiva 2003/53/CE), en la que se establece una concentración máxima permisible de 2 µg/L para aguas superficiales.

El NP es considerado disruptor endocrino, principalmente porque es capaz de imitar al estrógeno, que es la hormona ligada a las características sexuales secundarias; interacciona uniéndose como un estrógeno por sus similitudes estructurales en el anillo fenólico. Un ejemplo de estas similitudes se da con el 17-β-estradiol, estrógeno sintetizado de forma natural y que actúa sobre el desarrollo, mantenimiento y funciones de los órganos reproductores femeninos, los ciclos de actividad sexual y las características sexuales secundarias femeninas. Asimismo, actúa sobre el sistema cardiovascular y sobre el mecanismo de coagulación de la sangre, favoreciendo una disminución en el tiempo de coagulación y un aumento del número de plaquetas (Nuñez, 2010).

Además se ha relacionado la infertilidad en los hombres con la exposición a NP (Ponzo y Silvia, 2013). Por otro lado se ha demostrado su actividad estrogénica al inducir y sobreexpresar el receptor de la progesterona en células tumorales de mama (Soto et al., 1991), su unión al ER humano (Takayanagi *et al.*, 2006) y su actividad antiandrogénica mediada por el receptor de andrógenos (Xu *et al.*, 2005). Además, se ha estudiado el efecto del NP 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 a la fertilidad en machos (Lavado *et al.*, 2004).

3.3.2 Bisfenol A

El bisfenol A (BPA) (2,2-bis (4-hidroxifenil) propano) fue catalogado como disruptor endocrino según el ministerio del medio ambiente en Japón (Watanabe, 2002); también se encuentra clasificado en la lista europea como uno de los 564 potenciales disruptores endocrinos con el máximo nivel de riesgo (nivel III) y más recientemente se ha incluido en la lista prioritaria de los 66 compuestos de mayor riesgo (Martínez, 2014); es un compuesto orgánico compuesto de dos moléculas de fenol unidos por un puente de metilo y dos grupos metilo (Figura 3.2).

El BPA constituye el monómero del que se compone el plástico policarbonato, empleado en una gran variedad de productos industriales y de bienes de consumo de uso diario. Además se encuentra presente en las resinas epoxi, que recubren el interior de multitud de recipientes y de envases destinados a estar en contacto con alimentos y bebidas con el fin

de prevenir en ellos efectos de oxidación y corrosión, y en las resinas de poliéster, también se utiliza como aditivo retardante, líquidos para frenos, y papeles térmicos; es uno de los productos químicos más empleados en el mundo y con mayor volumen de producción, alcanzando 3.8 millones de toneladas al año (Michałowicz, 2014).

Alrededor del 95% de BPA producido en la industria se utiliza para la fabricación de plásticos, en particular las resinas de policarbonato (71%) y resinas epoxi (29%) (Rikz, 2001; Huang *et al.* 2012). Debido a la creciente demanda de policarbonatos y resinas epoxi, la producción de BPA ha crecido constantemente en los últimos años: la demanda global fue de 3.2, 3.9, y 5.0 millones de toneladas en 2003, 2006 y 2010, respectivamente (Flint *et al.* 2012, Huang *et al.* 2012). En la Tabla 3.3 se muestran las propiedades de este compuesto.

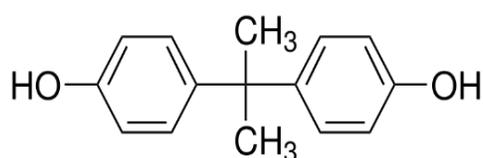


Figura 3.2. Estructura química del bisfenol A (TOXNET, 2017).

Tabla 3.3. Propiedades del bisfenol A

Fórmula molecular	C ₁₅ H ₁₆ O ₂
Peso Molecular	228.29 g/mol
Densidad a 25 °C	1.20 g/cm ³
Solubilidad en agua a 25 °C	120 mg/L
Coefficiente de partición (log K _{wo})	3.32
Presión de vapor a 25 °C	5.3×10 ⁻⁹ kPa

(Fuente: TOXNET, 2017)

El BPA puede ser liberado al ambiente principalmente, a través de la descarga de efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales municipales, la lixiviación de los vertederos y de los lodos generados en plantas de tratamiento que son utilizados en la agricultura (Huang *et al.* 2012), la combustión de los residuos domésticos, así como la descomposición natural de los plásticos en el ambiente.

En México, al igual que los NP, el BPA ha sido detectado en diferentes ambientes acuáticos, aunque en este caso los estudios realizados sobre la presencia de estos compuestos son menos. Silva en 2009, reportó la presencia de BPA en el Emisor Central y en fuentes de

abastecimiento del Valle de Tula, Cruz (2013), realizó la evaluación y cuantificación de EDC en aguas superficiales de la ciudad de Tapachula en Chiapas, en las que se detectó la presencia de BPA; así también en 2015, Peña y Castillo, realizaron una evaluación de la presencia de EDC en tres plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) de la Zona Metropolitana del Valle de México: Ciudad Universitaria (CU), Coyoacán y Cerro de la Estrella, en las cuales se detectó la presencia de BPA. Las concentraciones reportadas de BPA se muestran en la Tabla 3.6.

Los efectos de la exposición al BPA pueden ser particularmente perjudicial para el feto, los bebés y los niños pequeños, debido a la falta de retroalimentación que regula la actividad, síntesis y la eliminación de las hormonas; 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 (PPAR), los cuales están implicados en la regulación del sistema endocrino y de otros sistemas del organismo (Ziv-Gal *et al.*, 2013). Por otro lado, se ha demostrado que el BPA presenta actividad disruptora endocrina en numerosas especies de vertebrados (Crain *et al.*, 2007), en las que provoca alteraciones en la reproducción y el desarrollo, en el sistema inmune y el sistema nervioso (O'connor y Chapin, 2003).

3.3.3 Triclosán

El triclosán (TCS) es un compuesto aromático clorado, con potencial para actuar como un disruptor endocrino debido a que su estructura química se asemeja a estrógenos no esteroideos (Figura 3.3), es utilizado como un agente antibacteriano en una amplia gama de productos de cuidado personal, como son jabones, dentífricos, enjuagues bucales y desodorantes, así también se encuentra presente en alfombras, bolsas de basura, juguetes para bebés y vajillas desechables. En la Tabla 3.4 se muestran algunas propiedades de este compuesto.

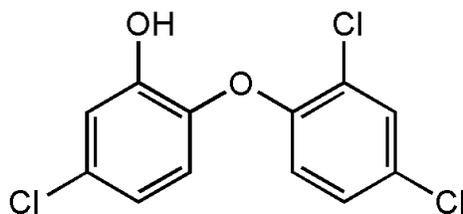


Figura 3.3. Estructura química del triclosán (TOXNET, 2017).

Tabla 3.4. Propiedades del triclosán

Fórmula molecular	C ₁₂ H ₇ Cl ₃ O ₂
Peso Molecular	289.54 g/mol
Densidad a 25 °C	1.49 g/cm ³
Solubilidad en agua a 20 °C	10 mg/L
Coefficiente de partición (log K _{wo})	4.76
Presión de vapor a 20 °C	4.6 x 10 ⁻⁶ mmHg

(Fuente: TOXNET, 2017)

Los productos de cuidado personal que contienen TCS son frecuentemente eliminados en los drenajes, llegando a las plantas de tratamiento de aguas residuales, en donde no son eliminados por los tratamientos utilizados (biológicos principalmente), así también aproximadamente el 30 % del TCS es adsorbido por los lodos (Bester, 2003), esto debido a sus propiedades fisicoquímicas (Tabla 3.4). Por lo tanto, las vías más importantes de contaminación por TCS son a través de las descargas de efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales, así como por uso de lodos contaminados con TCS en la agricultura. Se estima que el TCS presenta una vida media en aguas superficiales de once años (Bester, 2005). Como consecuencia de su amplio uso como agente antimicrobiano, el TCS ha llegado a ser un compuesto de distribución ubicua en los ecosistemas, además de haberse detectado en orina, plasma y leche materna (Calafat *et al.*, 2008). En el ambiente, el triclosán puede ser degradado por microorganismos o reaccionar con la luz del sol, lo que da lugar a compuestos como los clorofenoles y las dioxinas.

En México, estudios realizados en plantas de tratamiento de aguas residuales y fuentes de abastecimiento han demostrado la presencia de TCS en estas matrices; Silva en 2009, reportó TCS en aguas residuales provenientes del Emisor Central, en el Valle de México y en fuentes de abastecimiento del Valle de Tula. Cruz, (2013) reportaron la presencia de TCS en aguas superficiales de la ciudad de Tapachula en Chiapas; también se ha encontrado en algunas PTAR de la Ciudad de México (Peña y Castillo, 2015). Las concentraciones reportadas de TCS se muestran en la Tabla 3.6.

La estructura química del TCS es similar a las hormonas tiroideas y a los bifenilos policlorados (PCBs), esta similitud permite que se adhiera a los receptores de las hormonas. Veldhoen (2006) realizó un estudio de la exposición de ranas al TCS mediados por las hormonas tiroideas, concluyó que la exposición a bajos niveles de TCS altera la expresión del gen asociada con la hormona tiroidea y puede alterar la tasa de desarrollo de la hormona

tiroidea mediada en anuros en estado embrionario. Dicha hormona es casi idéntica a la de los humanos y son esenciales para el desarrollo normal del cerebro, especialmente para el desarrollo del feto durante el embarazo, lo que implica un riesgo potencial hacia la salud de las personas. Gee (2008) realizó un estudio de células humanas de cáncer de seno y encontró que el TCS puede imitar al estrógeno y la testosterona, lo que implica un riesgo para la salud humana ya que este compuesto podría aumentar el riesgo de manifestar este tipo de cáncer; otros estudios sugieren que el TCS y sus metabolitos pueden interferir con la función normal de las hormonas masculinas y femeninas, lo que altera las vías androgénicas y estrogénicas (Gee, 2008). Como se mencionó anteriormente el TCS cuando se expone a la luz solar, puede convertirse en químicos aún más tóxicos tales como las dioxinas (WHO, 2007). Una exposición a corto plazo a altos niveles de Dioxinas puede resultar en lesiones de la piel y función hepática alterada. Una exposición a largo plazo está asociada a problemas en el sistema inmune, en el desarrollo del sistema nervioso, del sistema endócrino, y daño reproductivo. Exposiciones crónicas a dioxinas en animales ha resultado en diferentes tipos de cáncer (Sánchez, 2006); esto aumenta la preocupación por la potencial contaminación de agua potable, así como por la toxicidad para la vida acuática.

3.3.4 Estrona

Existen tres tipos principales de hormonas del sexo: las progestinas, andrógenos y estrógenos, estos últimos son hormonas esteroideas segregadas principalmente en los ovarios femeninos del ser humano y otros animales. Estos compuestos son importantes para los procesos de reproducción y para el normal desarrollo de las hembras, estimulando el desarrollo de sus órganos reproductores y sus características sexuales. Las hembras producen de forma natural tres estrógenos: el estradiol (E2) que es el más abundante y potente, la estrona (E1) y el estriol (E3); también están presentes en los varones, pero en concentraciones menores.

El estradiol tiene un potencial 12 veces mayor que el de la estrona y 80 veces mayor que el estriol. La estrona es el estrógeno dominante en mujeres una vez iniciada la menopausia y una vez que los ovarios dejan de producir estradiol. El estriol es un subproducto del metabolismo de la estrona en mujeres no embarazadas y es sin embargo la placenta de las mujeres embarazadas la principal fuente de estriol; las estronas son el estrógeno predominante en las mujeres posmenopáusicas.

La estrona tiene un grupo cetona en el carbono 17 y el hidroxilo común en el carbono 3 (Figura 3.4). Como es conocido, los estrógenos se encargan en el organismo de controlar el desarrollo y función fisiológica de los órganos reproductores femeninos, así como del desarrollo de caracteres sexuales secundarios. Se forman en el ovario bajo el estímulo de hormonas gonadotrópicas procedentes del lóbulo anterior de la hipófisis y durante el

embarazo se excretan en la orina cantidades significativas de éstos. En la Tabla 3.5 se muestran algunas propiedades de este compuesto.

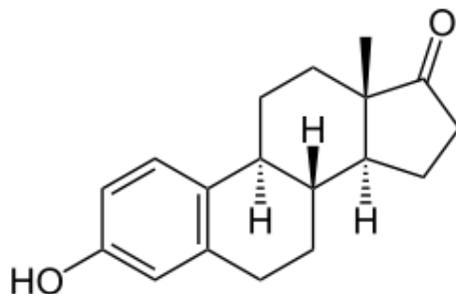


Figura 3.4. Estructura química de la estrona (TOXNET, 2017).

Tabla 3.5. Propiedades de la estrona

Fórmula molecular	C ₁₈ H ₂₂ O ₂
Peso Molecular	270.37 g/mol
Densidad a 25 °C	1.24 g/cm ³
Solubilidad en agua a 20 °C	30 mg/L
Coefficiente de partición (log K _{wo})	3.13
Presión de vapor a 20 °C	2.49 x 10 ⁻¹⁰ mmHg

(TOXNET, 2017)

Las fuentes potenciales de la estrona en el ambiente acuático son las descargas de plantas de tratamiento de aguas residuales, debido a que este contaminante es de origen antropogénico y las descargas de las aguas residuales son la causa principal de su presencia en ríos, arroyos y todo tipo de aguas superficiales. Existen pocos trabajos relacionados con el comportamiento, transporte y rutas de degradación de estos estrógenos en las plantas de tratamiento de aguas residuales, los pocos trabajos que existen hacen mención a que la estrona tiene rangos de eliminación variable, ya que su contenido puede aumentar después de su paso por un tratamiento al ser un producto de degradación del estradiol. Por lo tanto la estrona es el estrógeno natural que se encuentra en mayor concentración en el agua residual aunque su potencial estrogénico es mucho menor que el del estradiol.

En México se ha detectado la presencia de E1 en las aguas residuales municipales, Silva (2009), reportó concentraciones trazas de estos contaminantes el canal Emisor central en la Ciudad de México y en fuentes de abastecimiento del Valle de Tula. Estrada (2012) también reportó la presencia de estos estrógenos en el canal del Emisor Central y en el Gran

canal. González (2013) reportó la presencia de estrona en el influente de la planta de tratamiento Cerro de la Estrella, también en la ciudad de México. Las concentraciones encontradas se muestran en la Tabla 3.6.

Un estudio sobre la identificación y evaluación de sustancias estrógenas en efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales, fue diseñado con el fin de tratar de identificar las sustancias responsables de la actividad estrogénica en las aguas residuales. Fue desarrollado por la Agencia Medioambiental del Reino Unido después de que se descubriera que los peces macho que vivían cerca de los puntos de vertido de aguas residuales, comenzaban a presentar características propias de los peces hembra, incluyendo su capacidad para producir una proteína de la yema de huevo -la vitelogenina- que normalmente se encuentra solamente en las hembras. Encontraron que los efluentes de aguas residuales contenían tres hormonas activas. Dos de ellas eran estrógenos naturales femeninos (la estrona y el 17 β -estradiol), y la otra era un estrógeno sintético que se encuentra en los anticonceptivos (el etinilestradiol) (Leatherlan, 1992).

En la Tabla 3.6 se presenta un resumen de la revisión bibliográfica realizada, en la cual se muestran los EDC encontrados en aguas de México, así como las concentraciones de los mismos.

Tabla 3.6. EDC encontrados en aguas de México

Fuente	Compuesto	Concentración ($\mu\text{g/L}$)	Autor
Distrito de Riego 03 Valle de Mezquital	Nonilfenoles	31	Elizalde,2003
Aguas residuales provenientes del Emisor Central, en el Valle de México	Nonilfenoles	11000 - 22400	Gibson <i>et al.</i> , 2007
Influente de PTAR Chapultepec, Cerro de la Estrella, San Juan de Aragón y Santa Rosa Jáuregui	4-n-nonilfenol	0.05 - 3.1	Molina, 2008
	Nonilfenoles	3.3 - 1134	
Efluente de PTAR Chapultepec, Cerro de la Estrella, San Juan de Aragón y Santa Rosa Jáuregui	4-n-nonilfenol	0.01 - 0.47	Molina, 2008
	Nonilfenoles	0.16 - 725.4	
Influente de PTAR San Andrés Mixquic	Nonilfenoles	62 - 1467	Molina, 2008
Efluente de PTAR San Andrés Mixquic	Nonilfenoles	16 - 360	Molina, 2008
Influente de PTAR Juriquilla	Nonilfenoles	326	Molina, 2008

Continua Tabla 3.6

Fuente	Compuesto	Concentración (µg/L)	Autor
Efluente de PTAR Juriquilla	Nonilfenoles	4 - 3.7	Molina, 2008
Muestra puntual PTAR Ciudad Universitaria	Nonilfenoles	14586	Molina, 2008
Emisor Central	4-n-nonilfenol	23.85	Silva, 2009
	Bisfenol A	3.17	
	Triclosán	1.86	
Fuentes de abastecimiento del Valle de Tula	4-n-nonilfenol	0.0018	Silva, 2009
	Bisfenol A	0.001	
	Triclosán	0.0003	
	Estrona	0.00021	
PTAR Cerro de la Estrella	Nonilfenoles	105	Ramírez, 2010
Influente de PTAR Cerro de la Estrella	Bisfenol A	0.21 - 2.46	Peña y Castillo, 2015
	Triclosán	0.87 - 10.09	
Efluente de PTAR Cerro de la Estrella	Bisfenol A	0.03 - 0.41	
	Triclosán	0.08 - 7.33	
Influente PTAR Coyoacán	Bisfenol A	0.81 - 4.27	Peña y Castillo, 2015
	Triclosán	2.51 - 9.34	
Efluente PTAR Coyoacán	Bisfenol A	0.02 - 0.07	
	Triclosán	0.32 - 2.63	
Muestra puntual PTAR Ciudad Universitaria	Bisfenol A	0.29 - 0.81	
	Triclosán	0.91 - 1.59	
Agua superficial de la Ciudad de Tapachula, Chiapas	Bisfenol A	0.0047 – 0.019	Cruz, 2013
	Nonilfenoles	0.0018 – 0.003	

En la Tabla 3.7 se muestran las concentraciones de los EDC en estudio, que se han encontrado en pozos de abastecimiento en el Valle de Tula, Hidalgo reportados por Silva (2008).

Tabla 3.7. Concentraciones de EDC encontradas en aguas de abastecimiento del Valle de Tula, Hidalgo

Fuente	Bisfenol-A (ng/L)	Nonilfenol (ng/L)	Triclosán (ng/L)
Pozo El Rosario	2.86	0.81	0.62
Mexe	0.35	8.34	0.26
Teofani	0.02	0.81	0.01
Caxuxi	0.08	2.52	0.77
San Salvador	0.15	3.01	0.81
Buthibají	1.55	5.02	0.42
San Isidro	0.99	4.07	0.38
Pozo Grande	1.34	3.86	0.15

(Silva, 2008)

3.4 Evaluación de la actividad estrogénica

La presencia de compuestos estrogénicos en el agua y sus efectos sobre los organismos acuáticos se ha convertido en un indicador importante de la contaminación de origen humano e industrial (Noguerol *et al.*, 2006).

Se hace necesario encontrar herramientas de monitorización ambientales con una relación de costo-efectividad eficiente, además de servir como un método de evaluación de las nuevas tecnologías de descontaminación. Se ha encontrado que la toxicidad aguda del efluente crece durante el tratamiento debido a la formación de intermediarios tóxicos (Melato *et al.*, 2009). Es importante tener en mente que diferentes procesos darán diferentes productos intermedios (Oller *et al.*, 2011). De esta forma los bioensayos son la clave para estudiar la eficacia de los diferentes tratamientos (Marugán *et al.*, 2012).

Debido a la gran variedad de productos químicos con actividad similar al estrógeno, el análisis instrumental clásico no es lo más adecuado para evaluar la potencia estrogénica de mezclas complejas. Esto es debido a que las concentraciones a las que se encuentran son inferiores a los límites de detección de los métodos analíticos convencionales (Nguyen *et al.*, 2011).

En los últimos años se han desarrollado una serie de ensayos, tanto *in vitro* como *in vivo*, para identificar y evaluar sustancias con presunta actividad estrogénica o, en su caso, el potencial que presentan (Céspedes *et al.*, 2004; Noguerol *et al.*, 2006; Brix *et al.*, 2010; Nguyen *et al.*, 2011).

Los ensayos *in vivo* son altamente valiosos para evaluar el efecto biológico global de un compuesto (Nguyen *et al.*, 2011). Algunos ejemplos de ensayos *in vivo* son: el ensayo uterotrófico de ratón (Tinwell *et al.*, 2000) que detecta la capacidad de un químico para estimular o inhibir la respuesta estrogénica del útero. El ensayo de Hershberger (Li *et al.*, 2011) que detecta la capacidad de un químico de estimular o inhibir la respuesta androgénica en los testículos y órganos sexuales secundarios. Y el ensayo de reproducción

de peces (Schwartz *et al.*, 2010) que examina las anomalías asociadas con la supervivencia, comportamiento reproductivo, características sexuales secundarias, fecundación, número de huevos, fertilidad y desarrollo de la progenie.

En los ensayos *in vitro*, tales como los ensayos competitivos de unión a ligando, la proliferación celular, los ensayos de transcripción del receptor de estrógeno (Céspedes *et al.*, 2004) y los ensayos con levaduras recombinantes, son más adecuados. Cada ensayo mide diferentes aspectos de la cadena de efectos que resultan de los compuestos estrogénicos (Murk *et al.*, 2002).

Uno de los ensayos de transcripción del receptor de estrógeno utilizado para la detección de compuestos estrogénicos es YES (por sus siglas en inglés, Yeast Estrogen Screen) (Routledge y Sumpter, 1996), el cual utiliza una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* que contiene al receptor del estrógeno humano (HER- α) y un elemento de base plasmídica con respuesta a estrógenos (ERE)- lacZ reportero de fusión.

Cuando un compuesto similar al estrógeno se une a la proteína del receptor de estrógeno, que a su vez se une a la ERE, la inducción de la transcripción de lac Z. β -galactosidasa transforma el sustrato cromogénico en rojo de clorofenol- β -D-galactopyranoside (CPRG) para dar un producto de color rojo medido por absorbancia a 540 nm.

Este ensayo se ha utilizado ampliamente para medir las respuestas estrogénicas a los policlorobifenilos y los derivados hidroxilados, los hidrocarburos aromáticos polinucleares, y otros compuestos, así como la detección de los estrógenos en los sistemas de tratamiento de aguas residuales y estiércol de productos lácteos (Sanseverino *et al.*, 2005).

Aunque se ha demostrado su eficacia para la determinación *in vitro* de la actividad estrogénica, el tiempo de incubación del ensayo YES es de 3 a 5 días (Schultz *et al.*, 2000) y no es práctico cuando se considera que hay una gran cantidad de EDC presentes en el ambiente que deben ser evaluados.

Ante esta situación se han desarrollado técnicas de detección de actividad estrogénica, que son más eficientes en cuanto al tiempo de detección y al tratamiento de las muestras, una de ellas es la técnica de BLYES (por sus siglas en inglés, Bioluminescent Yeast Estrogen Screen), la cual en comparación con YES ha mostrado un mejor tiempo de respuesta (<6 h). Además, el ensayo BLYES tiene la misma o mejor sensibilidad a los EDC (Sanseverino *et al.*, 2005).

3.4.1 BLYES

El ensayo BLYES es una técnica *in vitro* que fue desarrollada por Sanseverino en 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. Existen pocos estudios publicados sobre la aplicación de dicha técnica para la detección y cuantificación de compuestos emergentes, no obstante los artículos encontrados (Bonasea, 2010; Peña y

Castillo, 2015) reportan que obtuvieron buenos resultados para muestra ambientales. La técnica de BLYES recientemente fue aplicada en China para evaluar el riesgo potencial para el medio ambiente a partir de compuestos estrogénicos persistentes en los lodos provenientes de una planta de tratamiento (Ruan, 2015). El objetivo principal de dicha técnica es el de cuantificar la actividad estrogénica (efecto potencial de los EDC) en muestras de agua ya sean subterránea, superficial, residual cruda, residual tratada y post-tratada.

La técnica BLYES utiliza una bacteria “reportera” desarrollada en una cepa recombinante de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la bacteria funciona como un sensor químico. 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).

Todo el ensayo se lleva a cabo en placa multipocillo de polipropileno lo que permite realizar diluciones seriadas de la muestra así como medidas repetidas. El incremento de bioluminiscencia se registra durante 15-20 minutos (una medición cada 40s); los valores de actividad de β -galactosidasa se calculan a partir de la pendiente de la recta de regresión como incremento de la luminiscencia con respecto al tiempo. Las curvas dosis-respuesta se obtienen siguiendo un modelo matemático. La concentración de sustancias con actividad estrogénica se presentan en ng/L de equivalentes de 17β -estradiol (EEQ) (control positivo) (Ruiz, 2013; Sanseverino *et al.*, 2005).

3.5 Extracción, detección y cuantificación de EDC en agua

Uno de los pasos más críticos implicados en la determinación de EDC en el agua es el pre-tratamiento de las muestras, que debe incluir procedimientos para la extracción, aislamiento y concentración de los analitos. El método mayormente usado para tal fin es el de Extracción en Fase Sólida (por sus siglas en inglés, Solid Phase Extraction, SPE), que es una técnica que concentra y purifica los analitos mediante retención en una fase sólida. Los analitos son retenidos selectivamente en el sorbente, y posteriormente eluidos con un volumen pequeño de disolvente (Arsenault, 2012). SPE junto con cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC/MS) es aceptada comúnmente como una de las técnicas más poderosas para la separación, identificación y cuantificación de EDC, incluso en el intervalo de nanogramos (ng) (Alder *et al.*, 2006). Esto debido a que la GC/MS es una técnica analítica dedicada a la separación, identificación y cuantificación de mezclas de sustancias volátiles y semivolátiles, en la que la separación de dichas sustancias depende de la diferente distribución de las sustancias estudiadas entre la fase móvil y estacionaria

que conformen el sistema, así mismo mediante esta técnica es posible obtener registros tridimensionales, es decir, para cada tiempo de retención, se obtiene un espectro de masas de las especies que emergen de la columna cromatográfica (Carnosa, 2008).

Por lo tanto la relevancia de este trabajo, tiene que ver con el acoplamiento de BLYES-GC-MS y demostrar su aplicabilidad para calcular la actividad estrogénica, detectar, identificar y además cuantificar EDC en agua de abastecimiento sin la necesidad de realizar la extracción de los analitos por separado. Lo cual resulta innovador ya que ambas metodologías son utilizadas por separado, adicional a que la metodología BLYES no se ha aplicado en México y por ende tampoco el acoplamiento BLYES-GC-MS. De esta manera también se busca aplicar la metodología desarrollada para evaluar un tratamiento de oxidación con ozono que permita demostrar la factibilidad de este proceso en la remoción de este tipo de contaminantes.

3.6 Procesos de oxidación avanzada (POAs)

Dado que los tratamientos convencionales (biológicos) eliminan sólo parcialmente fármacos, hormonas, plaguicidas y otros compuestos orgánicos de uso industrial. Las tecnologías de oxidación avanzada representan una alternativa de tratamiento, los POAs son métodos oxidativos basados en la generación de radicales intermedios, los radicales hidroxilo (OH^\bullet), que son extremadamente reactivos y menos selectivos que otros oxidantes. Su potencial de oxidación estándar ($E^0 = 2.8 \text{ V}$) es mayor que los oxidantes convencionales, haciéndolos extremadamente eficaz en la oxidación de una gran variedad de compuestos orgánicos (Hernandez et al, 2002). Estos radicales se producen a partir de agentes oxidantes como ozono, peróxido de hidrógeno, frecuentemente combinado con catalizadores metálicos o semiconductores y/o radiación UV.

Las tecnologías de oxidación avanzada se han consolidado como una alternativa eficiente en la destrucción de sustancias tóxicas, incluyendo las orgánicas, inorgánicas, metales o patógenos. En general en el tratamiento de aguas las tecnologías de oxidación avanzada se utilizan cuando los efluentes contaminados tienen una alta estabilidad química y/o una baja biodegradabilidad. Este tipo de reacciones se caracterizan por su no-selectividad y por las altas velocidades de reacción, entre 10^7 y $10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (Sanz et al., 2013). En estos procesos, se espera que los compuestos orgánicos se oxiden a especies intermedias menos refractarias (menos tóxicas y más biodegradables) o incluso mineralizadas a CO_2 y H_2O . Ejemplos de POAs incluyen ozonación, Fenton, foto-Fenton, fotólisis, fotocatalisis de semiconductores y procesos electroquímicos. Siendo la ozonación el método de oxidación más utilizado en la eliminación de EDC, aproximadamente el 90% de tratamientos de oxidación reportados en la literatura corresponden a la ozonación.

3.6.1. Ozono

A lo largo de los distintos tratamientos de las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) se produce una notable disminución del contenido de diversos contaminante en el agua residual. Sin embargo, no todos son removidos y muchos de ellos no sufren ningún cambio, tal es el caso de los EDC, por lo tanto suele ser necesario complementar el tratamiento con una desinfección si se pretende reutilizar el efluente para usos industriales o comerciales, ante esta situación el ozono surge como una alternativa para remover este tipo de compuestos.

El ozono, es parte de los procesos de oxidación avanzada, es el segundo oxidante más poderoso, superado en su potencial de oxidación (2.8 V) solamente por el flúor (3.06 V). La química de la ozonización es compleja y se caracteriza por la actuación a través de dos mecanismos: reacción directa, con ozono molecular disuelto y reacción indirecta, con especies radicales formadas cuando el ozono se descompone en el agua en condiciones alcalinas.

El mecanismo directo, que ocurre a pH ácido, implica la reacción de degradación por moléculas de ozono que actúan como dipolos, como agentes electrófilos y como agentes nucleófilos (Gunten, 2003). Bajo esta condición, las reacciones de ozono molecular se limitan a compuestos aromáticos (tales como los EDC) y alifáticos insaturados, así como a grupos funcionales específicos.

Las reacciones de degradación por el mecanismo indirecto del ozono ocurren en condiciones básicas y son influenciadas por la presencia de las especies químicas. Las reacciones directas como las indirectas tienen lugar simultáneamente, pero cuando un proceso de oxidación es específicamente diseñado para aumentar la concentración de radicales hidroxilo en una solución, se denomina proceso de oxidación avanzada (Alvares *et al.*, 2001).

La eficacia de la ozonización depende del compuesto a eliminar, así como de las condiciones de funcionamiento: entornos básicos aumentan los rendimientos de degradación mediante la promoción de la producción de radicales hidroxilo, como la ozonación de productos farmacéuticos

La combinación de estos dos mecanismos en la remoción de las sustancias, también depende de la naturaleza del agua, del pH del medio y de la dosis aplicada de ozono (Beltrán *et al.*, 1997).

El ozono tiene una serie de características que lo hacen atractivo para el tratamiento de agua:

1. Es un oxidante fuerte que reacciona rápidamente con la mayoría de los compuestos orgánicos y microorganismos presentes en las aguas naturales y residuales;
2. No imparte gustos y olores a las aguas; y,

3. Se produce a partir de oxígeno atmosférico por medio de energía eléctrica, lo cual dentro de la tecnología moderna constituye un proceso altamente atractivo considerando la disponibilidad del aire.

Las desventajas se refieren principalmente a los costes y rendimientos del equipo generador de ozono, y a la calidad de los métodos de inyección de gas. Estos factores pueden mejorarse por medio de refinamientos tecnológicos y nuevas técnicas. Además, las plantas convencionales de tratamiento (sistemas de flujo) no están diseñadas para aplicación inmediata de la ozonización, puesto que el gas debe inyectarse con una ligera presión con el fin de evitar pérdidas de la mezcla ozono/aire u ozono/oxígeno que es costosa, tóxica y corrosiva (Walter, 1979).

En general, el ozono se aplica en el tratamiento de agua para (Rice, 2002):

- Eliminar color
- Desinfectar
- Eliminar olor y sabor
- Eliminar hierro y manganeso
- Oxidar el fenol
- Oxidar el cianuro

4. ANTECEDENTES

4.1. Uso del agua en México

En México el agua es empleada de diversas formas en todas las actividades humanas, ya sea para subsistir o producir e intercambiar bienes y servicios, en el Registro Público de Derechos de Agua (REPDa), se agrupan y se registran los volúmenes concesionados o asignados a los usuarios de aguas nacionales, de las cuales el 61.6% del agua utilizada para uso consuntivo proviene de fuentes superficiales (ríos, arroyos y lagos), mientras que el 38.4% restante corresponde a fuentes subterráneas (acuíferos) (CONAGUA, 2013).

En la Tabla 4.1 se muestra la categorización que REPDa le da al agua que es usada en México, así como también distingue si el uso es consuntivo o no.

Tabla 4.1. Agrupación de usos de la clasificación del REPDa

Uso agrupado	Consuntivo / no consuntivo	Rubros de clasificación del REPDa
Agrícola	Consuntivo	Agrícola, acuacultura, pecuario, usos múltiples, otros usos.
Abastecimiento público	Consuntivo	Doméstico, público urbano.
Industria autoabastecimiento	Consuntivo	Agroindustrial, servicio industrial, comercio
Energía eléctrica excluyendo hidroelectricidad	Consuntivo	Industrial
Hidroeléctrico	No consuntivo	Hidroeléctricas

(Fuente: CONAGUA, 2013)

De acuerdo con datos de CONAGUA (2013) para la Ciudad de México se tiene una cantidad de 1122.7 millones de m³ de agua concesionada, de las cuales el 0.1 % son para uso agrícola, el 2.85 % para abastecimiento industrial y el 97.05 % para el abastecimiento público, lo cual indica que el agua para abastecimiento tiene una alta vulnerabilidad de ser contaminada, siendo que esta se extrae principalmente de aguas superficiales.

4.2. Reúso del agua en México

De acuerdo a datos del Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA) 2012, se estima que la cantidad de agua reutilizada fue de 14118000 m³ provenientes de efluentes de plantas de tratamiento, de las cuales el 95.7% fue para uso agrícola (riego), el 1.7 % para

uso industrial (principalmente torres de enfriamiento) (Jiménez, 2008) y el 0.56 % para uso municipal (irrigación de parques, jardines y lavado de autos).

A través de diversos Programas Federales de Saneamiento se está promoviendo el reúso de las aguas residuales tratadas en actividades distintas de la agricultura y al respecto se han publicado dos normas oficiales mexicanas vinculadas con la infiltración de agua a los acuíferos (NOM-014-CONAGUA-2003 y NOM-015-CONAGUA-2007), a fin de contribuir con la recarga artificial de aquellos que se encuentra sobreexplotados en el país (De la Peña *et al.*, 2013).

La distribución del agua está a cargo de la CONAGUA, quien otorga los volúmenes solicitados a través de planes de riego elaborados por asociaciones de usuarios. En la Ciudad de México las aguas residuales de la Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM) que son desalojadas hacia el norte se dan por el Gran Canal del Desagüe, el Interceptor Poniente y el Emisor Central. Las dos primeras cruzan el parteaguas entre las cuencas de México y Mezquital a través de los túneles de Tequisquiác y el Tajo de Nochistongo respectivamente, para incorporarse a los ríos Salado y El Salto. El río Salado cruza el Valle del Mezquital y confluye con el río Tula, El río El Salto descarga en la Presa Requena, que forma el río Tula el cual circula hacia el norte (IMTA, 2007).

El agua residual es mezclada con la escorrentía urbana y agua natural superficial antes de ser descargada a las zonas de riego. Cerca del 40% del agua aplicada se infiltra al acuífero. El agua es recuperada mediante un sistema independiente de pozos y manantiales. En total existen 258 pozos, 93 manantiales y 109 norias en operación (CONAGUA, 2015). El agua recuperada es empleada previa cloración para consumo humano, riego, fines industriales y usos varios (recreativos, natación y lavado de ropa) (Carmona y Muñiz, 2014).

De acuerdo con los últimos estudios sobre disponibilidad (Lesser 2013), el Valle del Mezquital es considerado una nueva fuente de agua para la ZMVM, con la posibilidad de aprovechar el agua subterránea de los acuíferos Mezquital, Ixmiquilpan y Actopan. Los acuíferos de Mezquital y Actopan son los más idóneos para la extracción futura del agua a través de 12 baterías de pozos (Carmona y Muñiz, 2014).

4.3. Sistema de abastecimiento de agua de la Ciudad de México

El sistema de suministro de agua para la ciudad de México está integrado por fuentes internas y externas y por componentes de la infraestructura hidráulica que permiten obtener, conducir, regular y distribuir el caudal que requieren los diversos usuarios.

En la Tabla 4.2 se muestra cómo se encuentran distribuidas las fuentes de abastecimiento de la Ciudad de México (CDMX), así como los municipios que se abastecen y el caudal promedio que se tiene registrado, con base en lo reportado por el Gobierno de la CDMX en 2008.

Tabla 4.1. Sistema de abastecimiento de agua en la CDMX.

Fuente de abastecimiento	Municipios de los que se traen los caudales	Caudal promedio de abastecimiento en 2008 (m ³ /s)
Fuentes externas		
<i>Fuentes operadas por la Gerencia de Aguas del Valle de México</i>		
Sistema Cutzamala	Ixtapan del Oro, Valle de Bravo, Donato Guerra, Villa de Allende, Villa Victoria, Almoloya de Juárez, Toluca, Estado de México.	9575
Sistemas Barrientos y Risco	Tultitlan, Cuautitlán, Tlalnepantla, Estado de México	2239
Sistema de Aguas del Sur	Milpa Alta, Tláhuac, Valle de Chalco y L Paz Estado de México	0.382
SUBTOTAL		12196
<i>Fuentes Operadas por el Sistema de Aguas de la Ciudad de México</i>		
Sistema Lerma	Lerma, Ocoyoacac, Otzolotepec, San Lorenzo Oyamel, Temoaya, Xonacatlan, Almoloya de Juárez, Almoloya del Río, Calpuhuac, Ixtlahuaca, Jiquipilco, Joquicingo, San Pedro Techuchulco, Santa Cruz Atizapán y Santiago Tianguistenco, Estado de México	3832
Sistema Chiconautla	Ecatepec, Tecámac, Acolman, Estado de México	1402
SUBTOTAL		5234
Fuentes ubicadas dentro		
<i>Fuentes operadas por el Sistema de Aguas de la Ciudad de México</i>		
Pozos a la Red Norte	Azcapotzalco, Gustavo A. Madero	1037
Pozos a la Red Centro	Benito Juárez, Cuauhtémoc, Coyoacán, Distrito Federal	2.037
Pozos a la Red Sur	Milpa Alta, Tláhuac, Xochimilco	7.853
Pozos a la Red Oriente	Iztacalco, Iztapalapa, Venustiano Carranza	2.773

Continua Tabla 4.2

Fuente de abastecimiento	Municipios de los que se traen los caudales	Caudal promedio de abastecimiento en 2008 (m ³ /s)
Pozos a la Red Poniente	Álvaro Obregón, Cuajimalpa, Magdalena Contreras, Miguel Hidalgo, Tlalpan, Distrito Federal.	0.213
Río Magdalena	Magdalena Contreras, Distrito Federal.	0.203
Manantiales	Álvaro Obregón, Cuajimalpa, Magdalena Contreras, Tlalpan, Distrito Federal	0.792
SUBTOTAL		14908
TOTAL AL D. F.		32338

(Sistema de Aguas de la Ciudad de México, 2008)

4.4 Sistema de abastecimiento de agua en la UNAM

El sistema de agua potable en Ciudad Universitaria se divide principalmente en suministro, almacenamiento y distribución. El Campus Principal de la UNAM se abastece mediante tres pozos: Química, Multifamiliar y Vivero Alto; los cuales son de uso exclusivos para el consumo de Ciudad Universitaria. En total, de los tres pozos se extraen como máximo 170 L/s, siendo los pozos Multifamiliar y Vivero Alto los que funcionan diariamente, y el pozo de Química se mantiene como reserva (PUMAGUA, 2008).

El sistema de distribución de agua potable consta de tres tanques de almacenamiento: Tanque Bajo, Tanque Alto y Tanque Vivero Alto. En total el sistema tiene una capacidad de almacenamiento de 12000 m³, estos tanques son abastecidos por los pozos Química, Multifamiliar y Vivero Alto respectivamente. La red de distribución de agua potable de Ciudad Universitaria tiene una longitud aproximada de 54 km y consta de tuberías compuestas por diversos materiales: acero, asbesto, fierro fundido, PVC y PEAD, las tuberías de acero tienen más de 50 años de antigüedad (PUMAGUA, 2008).

La zona de estudio de la presente tesis se enfocó en el agua de abastecimiento de Ciudad Universitaria específicamente el agua de pozo de Química, con el fin de evaluar la presencia EDC, así como su actividad estrogénica esto debido a una posible contaminación ocasionada por la filtración de agua tratada usada para el riego de áreas verdes del campus.

4.5 Contaminación de fuentes de abastecimiento por EDC

Debido a que las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) no están diseñadas para remover todos los contaminantes presentes en el agua, entre ellos los EDC, el agua tratada

proveniente de dichas plantas es una fuente probable de contaminación de compuestos orgánicos, ya que los efluentes posiblemente contaminados desembocan a otros cuerpos de agua o son reinyectados en los mantos acuíferos (Rocha y Lee, 2012). Debido a la ausencia de una regulación estricta dirigida específicamente al control de los contaminantes emergentes, su presencia en las aguas tratadas se ha convertido en una problemática a resolver dada la eventual contaminación de las fuentes de abastecimiento de agua potable. Ante dicha problemática es necesario tener el control y prevención de contaminación de las fuentes de abastecimiento por las emisiones y descargas de sustancias tóxicas asociadas a las actividades industriales y a las descargas domésticas particularmente provocada por el uso indiscriminado principalmente de detergentes, productos para el cuidado personal, fármacos, hormonas y antibióticos que en la actualidad emergen como contaminantes que impactan a la salud pública, la vida silvestre y al ambiente en general (Carmona y Muñiz, 2014).

En México el efluente de la mayoría de las plantas de tratamiento es descargado a los distritos de riego, permitiendo que estos EDC puedan ingresar a los acuíferos en concentraciones trazas. Así también, cabe hacer mención que en México, los estudios referentes a la presencia de contaminantes emergentes se han concentrado mayormente en el acuífero del Valle del Mezquital, acuífero que aporta agua para suministro en el Valle de México, además de ser el sitio más grande y antiguo que recibe recarga proveniente del reúso del agua cruda para riego agrícola (Chávez, 2014).

La potencial contaminación de fuentes de abastecimiento de agua potable en México por EDC se fundamenta en el hecho de que el agua tratada en México está dirigida hacia diferentes tipos de reúsos:

- El reúso en el riego agrícola, ya que cerca de 350 000 hectáreas de cultivos son regadas con agua residual sin tratamiento, las cuales se distribuyen en 30 Distritos de Riego a lo largo del territorio nacional (Durán, 2013).
- El suministro de agua tratada proveniente de la planta de tratamiento de “Cerro de la estrella a la zona de humedales en Xochimilco (Díaz, 2013),
- El agua residual que llega al Valle del Mezquital se descarga a los distritos de riego 003 Tula y 100 Alfajayucan por medio de una importante red de canales (Carmona y Muñiz, 2014),
- Y un caso muy particular hacia el cual está dirigido el presente estudio, es el reúso en el riego de áreas verdes en el campus ciudad universitaria del agua residual tratada proveniente de la planta de tratamiento de “Cerro del agua”, la cual puede llegar al acuífero con gran facilidad debido a tipo de suelo (PUMAGUA, 2009).

Ante esta amenaza inminente de contaminación por compuestos emergentes en los sistemas de abastecimiento de agua potable, surge como necesidad el realizar investigaciones que den un panorama más amplio sobre esta problemática; y así mismo,

generar alternativas para contrarrestarla. A sabiendas de esto, lo que se realizó en esta tesis es contribuir en la generación de información que ayude a visualizar la presencia de este tipo de compuestos en fuentes de suministro de agua debido a la recarga indirecta de los acuíferos, por efectos de la infiltración en el suelo. Mostrando así los posibles efectos que poseen estos contaminantes, utilizando una metodología de detección de actividad estrógena que no se ha utilizado en México, la técnica de BLYES, así mismo evaluar la remoción de estos compuestos mediante un tratamiento terciario como la oxidación con ozono.

4.6 Determinación de actividad estrogénica en agua de abastecimiento

En diversos artículos se ha publicado acerca de la presencia de compuestos emergentes con disrupción endocrina en fuentes de abastecimiento (Silva, 2009; Di Dea *et al.*, 2011; Vieira *et al.*, 2015), así mismo se ha demostrado que algunos de estos disruptores presentan actividad estrogénica (Sanseverino, *et al.*, 2005; Guedes *et al.*; 2008; Vieira *et al.*, 2015). La cual se ha determinado mediante diferentes métodos *in vitro* e *in vivo*, siendo los primeros los que presentan mayor factibilidad debido a que la respuesta emitida en este tipo de ensayos es más rápida en comparación con los métodos *in vivo*. Evaluar la actividad estrogénica de EDC se vuelve un factor determinante al momento de aplicar tratamientos caros para su remoción, debido a que la aplicación de dichos tratamientos suelen ser poco necesarios cuando el potencial estrogénico que presentan los EDC es bajo, además de que en ocasiones la interacción entre estos compuestos pueden disminuir su potencial estrogénico debido a efectos inhibitorios (Guedes *et al.*, 2008).

Algunos biosensores utilizados para evaluar la actividad estrogénica de los EDC son las células de levadura. Las cuales se pueden utilizar como biosensores para la detección de analitos diana (analitos específicos). Esto se debe principalmente a que las últimas técnicas de biología molecular permitieron la modificación del genoma de las levaduras para dar a las células propiedades metabólicas útiles (Sibirny, 2017). Una de las técnicas aplicadas para evaluar la actividad estrogénica en aguas residuales, potables y de abastecimiento es BLYES, la cual ha mostrado resultados positivos para este tipo de análisis (Di Dea *et al.* 2011; Montagner *et al.* 2014).

Di Dea *et al.* 2011 evaluó la actividad estrogénica de aguas residuales hospitalarias y potables de Brasil, utilizando la técnica BLYES así mismo detectaron EDC mediante cromatografía líquida espectrometría de masas en tándem, obteniendo resultados favorables para BLYES demostrando que es una herramienta factible para la evaluación de la calidad del agua, debido a que es fácil de realizar, relativamente barata y adecuada para análisis de alto rendimiento.

Por otra parte Montagner *et al.* (2014) evaluaron la actividad estrogénica de 96 muestras de aguas superficiales de Brasil utilizando la técnica de BLYES, en las que se cuantificaron 16 compuestos emergentes mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-

MS/MS). Obtuvieron una respuesta positiva a BLYES para todas las muestras analizadas, siendo la cafeína el compuesto de referencia debido a que se encontró en todas las muestras de agua analizadas, mostrando una correlación entre la concentración de cafeína y la actividad estrogénica en agua superficial analizada mediante esta técnica.

4.7 Remoción de EDC por procesos de oxidación avanzados

Dado que los procesos biológicos que generalmente son aplicados en las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) no remueven los EDC que se encuentran presentes en el agua, estos compuestos son liberados en los cuerpos de aguas superficial o subterránea debido a las descargas del agua tratada a estos cuerpos; para mitigar este problema diversas investigaciones se han enfocado en aplicar tratamientos por medio de procesos de oxidación avanzada entre ellos la ozonación que ha resultado eficiente en el tratamiento de aguas contaminadas con EDC (Alum *et al.*, 2004; Huber *et al.*, 2004; Irnak *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2008), así mismo la reducción de la actividad estrogénica se ha visto favorecida (Guedes *et al.*; 2008; Vieira *et al.*, 2015), ya que estos procesos pueden llegar hasta la mineralización de los contaminantes (Sanz *et al.*, 2013).

Diversas investigaciones han demostrado que el ozono es una buena alternativa en la remoción de estos compuestos. Alum *et al.* (2004) evaluaron la eficiencia de la ozonación en la remoción de estrógenos (17β -estradiol y 17α - etinilestradiol) y BPA, en el que obtuvieron una remoción del 100% para los tres compuestos, bajo una concentración de ozono de 1.5 mg/L en un tiempo de contacto de 10 minutos, así mismo se tuvo reducción de la actividad estrogénica. Deborde *et al.*, (2004), reportaron la eficiencia del ozono en la disminución de la actividad estrogénica en un 98.5%, de estrona, estriol y estradiol, BP y NP, con concentraciones entre 0.5 y 20 mg/L de ozono y con pHs entre 5 y 10. Huber *et al.* (2004) evaluaron el tratamiento de ozonación de un efluente de una PTAR con contenido de estrógenos (E1, E2 y EE2), en el que reportaron remociones mayores al 90% con una dosis de ozono de 20 mg/L. Irnak *et al.*, (2005), evaluaron la eficiencia del ozono en la remoción de 17β -estradiol y bisfenol A, en el que a una dosis de 0.4 mg/L de ozono, se obtuvieron remociones mayores al 90% de los EDC, en el que también concluyeron que la reacción entre el BPA y el ozono es más lenta que entre el 17β -estradiol y el ozono. Así también, Zhang *et al.* (2008) trataron un efluente primario de una PTAR, con contenido de E2, E3, BPA y NP, en el que obtuvieron remociones mayores al 90% para E2, E3 y BPA, en el caso de NP la remoción fue menor debido a que la concentración en la que encontraba era más elevada con respecto a los otros contaminantes.

Ben *et al.* (2017) evaluaron la remoción de E1, E2 y EE2 con ozono en una concentración inicial de 1 mg/L de los EDC obteniendo remociones mayores al 98% para todos los compuestos estudiados en una relación molar ozono/EDC dos veces el valor estequiométrico, con estas condiciones también fue posible la eliminación de más del 90% de los subproductos generados en el proceso. Por su parte Sun *et al.* (2016) probaron cinco

procesos avanzados (sedimentación, coagulación, adsorción de resina, adsorción en carbón activado, ozonación y electroadsorción) para evaluar la disrupción endocrina del efluente secundario de una PTAR en China antes y después de cada tratamiento, reportando la eficiencia del proceso de ozonación en la disminución de los efectos estrogénicos así como la remoción de EDC, entre los cuales se encontraban E1, BPA y NP, en comparación con los otros procesos estudiados.

5 METODOLOGÍA

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESTROGÉNICA MEDIANTE BLYES

5.1. Implementación de técnica de BLYES

Para el desarrollo experimental de la presente investigación, se implementó la técnica de BLYES a la cual se acopló una metodología de cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS) con el fin de determinar la actividad estrogénica y cuantificar los EDC presentes en agua. A continuación se hace una descripción de la metodología utilizada. Para la determinar la actividad estrogénica fue necesaria la utilización de una cepa recombinante de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* BLYES genéticamente modificada, que detecta la presencia de compuestos con potencial estrogénico.

5.1.1. *Saccharomyces cerevisiae* BLYES y condiciones de cultivo

Saccharomyces cerevisiae BLYES es una cepa certificada que fue adquirida directamente con el proveedor autorizado 490biotech Inc. La cepa se cultivó en medio Yeast Minimal Media complementado (YMM leu-, ura- comp), el cultivo se realizó en placas adicionadas con 1.3% de agar noble a 30°C por 3 días (Figura 5.1). A partir de los cultivos en placa, se prepararon cultivos stock sembrando la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* BLYES en YMM leu-, ura-comp, los cultivos fueron incubados por 18-24 horas a 30°C en agitación constante a 150 rpm, condiciones generalmente idóneas para obtener una Densidad Óptica a 600nm (DO₆₀₀) de 1.0 (Sanseverino *et al.* 2005). Los cultivos stock se conservaron en 40% glicerol (preparado previamente con agua milliQ). Para ello se utilizaron viales para criogénesis, en los cuales se adicionó 1 mL del cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* BLYES y un 1 mL de glicerol al 40%, los cuales fueron almacenados a -70°C. Los cultivos stock se mantienen en ultracongelación y se usan para llevar a cabo las pruebas conforme a lo requerido. Para realizar la prueba de BLYES, el cultivo stock contenido en un vial de criogénesis (previamente descongelado) se inoculó en 30 mL de YMM leu -ura- comp usando frascos ámbar previamente esterilizados, el cultivo inoculado se incubó por 18-24 horas a 30°C en agitación constante (150 rpm) una vez que se tiene una DO₆₀₀ de 1 se tomaron las alícuotas necesarias para llevar a cabo la prueba de BLYES.

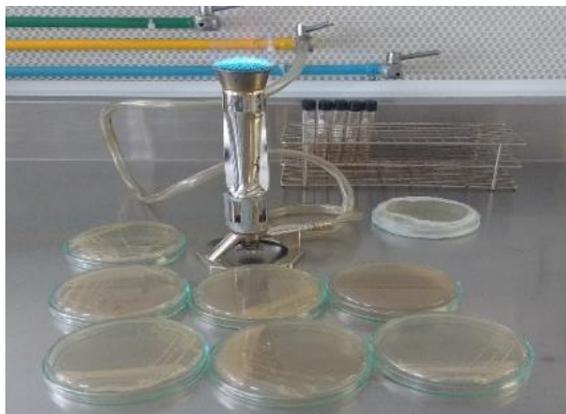


Figura 5.1 Cultivo *Saccharomyces cerevisiae* BLYES

Para el desarrollo de la técnica BLYES, el primer paso a seguir es el de la extracción de los analitos contenidos en el agua, siendo uno de los aspectos principales para la implementación de la técnica; con base en esto, se utilizó como muestra modelo agua tipo MilliQ fortificada con los cinco EDC en estudio, en concentraciones de 0.5 a 1000 ng/L con el fin de realizar las extracciones de los analitos de interés para su posterior análisis.

5.1.2. Extracción de los EDC

Los EDC contenidos en las muestras de agua MilliQ previamente fortificada, fueron extraídos mediante extracción en fase sólida (por sus siglas en inglés, Solid Phase Extraction, SPE) que es una técnica que concentra y purifica los analitos mediante su retención en una fase sólida.

La metodología a seguida fue la reportada por Soldre *et al.* (2013), en la cual los analitos fueron extraídos a partir de las muestra modelo mediante su elución con metanol utilizando cartuchos C-18 con 500 mg de fase sólida (Figura 5.2). Inicialmente, se llevó a cabo el acondicionamiento del cartucho, adicionando 6 mL de metanol con un tiempo de permanencia de 15 minutos, posteriormente fue eluido aplicando vacío. Un volumen de 1000 mL de muestra se filtró a través de una membrana de 0.45 μm , el permeado fue nuevamente filtrado a través del cartucho a flujo lento (aproximadamente 10 mL/min) a velocidad constante (20 Hg de vacío). La extracción de los analitos retenidos en la fase sólida del cartucho se realizó mediante la adición de 6 mL de metanol, posteriormente a flujo lento y velocidad constante aplicando vacío. El extracto se concentró con nitrógeno gas hasta obtener un volumen de 1000 μL (Figura 5.3).

El extracto obtenido se utilizó para la detección, identificación y cuantificación de los EDC usando la metodología GC-MS y para evaluar la actividad estrogénica mediante BLYES.

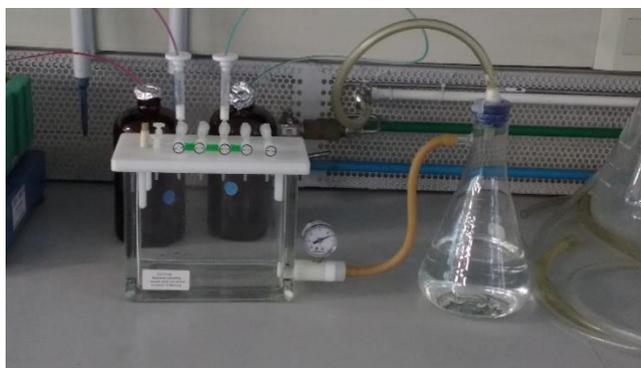


Figura 5.2. Extracción en fase sólida (SPE) de EDC

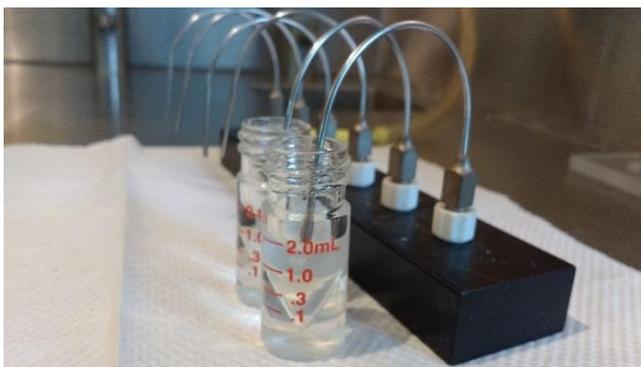


Figura 5.3. Evaporación de metanol con nitrógeno gas

5.1.3. Dilución de las muestras

El extracto concentrado obtenido de 1000 mL de muestra corresponde a una concentración inicial 1000x. A partir de ésta concentración, se llevó a cabo la dilución para obtener una concentración 200x. La concentración 200x sirvió de base para llevar a cabo diluciones en dos direcciones, esto con la finalidad de obtener mayor cantidad de puntos intermedios entre cada dilución, de tal manera que se logre una gráfica más representativa (Tabla 5.1).

Tabla 5.1. Diluciones del extracto concentrando para la prueba BLYES

Diluciones de las muestras para ensayo BLYES		
200x	20x	2x
100x	10x	1x
50x	5x	0.5x

Se utiliza 17 β - estradiol como control positivo de la prueba BLYES, con el cual se prepararan diferentes diluciones (Tabla 5.2) para realizar una curva de calibración que sirvieron como base para la determinación del potencial estrogénico de las muestras de agua analizadas.

Tabla 5.2. Diluciones de 17β- estradiol para la curva de calibración BLYES

Concentraciones Molares de 17β- estradiol					
1×10^{-6}	1×10^{-7}	1×10^{-8}	1×10^{-9}	1×10^{-10}	1×10^{-11}
2.5×10^{-7}	2.5×10^{-8}	2.5×10^{-9}	2.5×10^{-10}	2.5×10^{-11}	2.5×10^{-12}
5×10^{-7}	5×10^{-8}	5×10^{-9}	5×10^{-10}	5×10^{-11}	5×10^{-12}

Una vez preparadas todas las disoluciones y el medio inoculado tenía una DO_{600} de 1.0 aproximadamente, se procedió a realizar el ensayo BLYES, para el cual se utilizó una placa serológica blanca de 96 pozos.

Se adicionan 20 μL de cada una de las diluciones preparadas anteriormente, así como para el blanco (metanol HPLC), el control positivo (17β- estradiol) y control negativo (agua MilliQ) en cada uno de los pozos de la placa. El llenado de las placas se realizó como se muestra en la Figura 5.4. Una vez adicionadas todas las soluciones de la prueba se realizó la evaporación de las mismas y posteriormente se adicionaron 200 μL del cultivo celular de *S. cerevisiae* BLYES DO_{600} 1.0 a todos los pozos, llena la placa, se selló con una membrana de sellado transpirable para su posterior lectura en un luminómetro en el que se determinó la actividad estrogénica de las muestras analizadas.

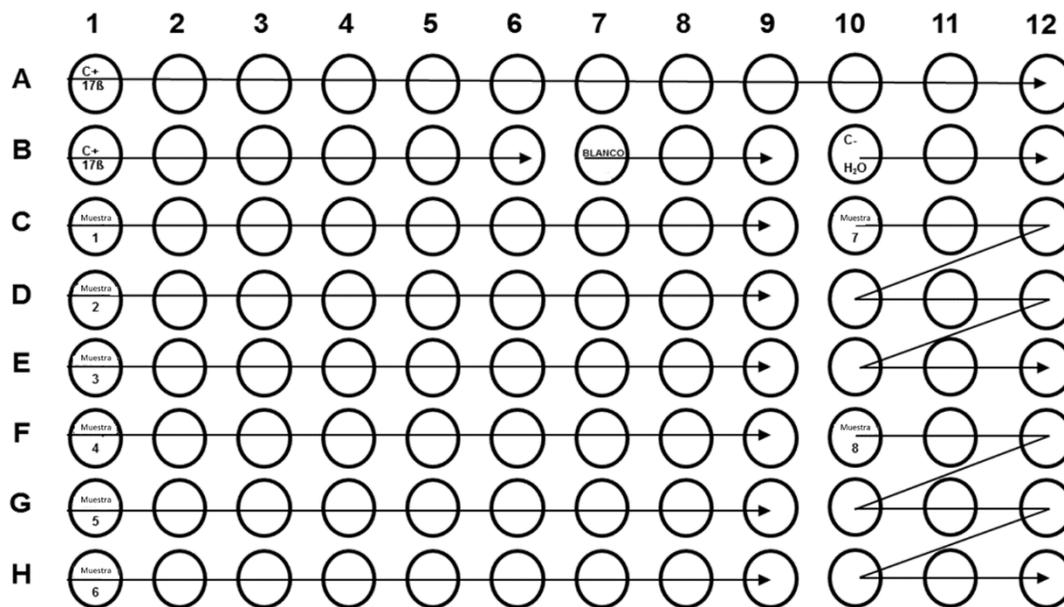


Figura 5.4. Esquema para el llenado de las placas serológicas, recomendable para el control adecuado en el manejo de las muestras BLYES.

5.1.4. Lectura de las muestras (placas serológicas)

La lectura de las placas se llevó a cabo en un luminómetro BioTek FLX800, 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 (Gen5 Microplate Reader and Imager Software), el cual proporciona la lectura de luminiscencia que se refiere a la concentración en moles de 17β -estradiol. El equipo hace la lectura de bioluminiscencia (una cuenta por segundo) versus la concentración de EDC en moles (M), tarda aproximadamente 2 minutos en emitir el resultado. Las lecturas se realizan cada 60 minutos durante 12 horas.

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 de la muestra o control positivo que causa 50% de efecto (50% da producción máxima de luz) (CI_{50}). Posteriormente, la concentración en moles se convierte a nanogramos por litro (ng/L) considerando las diluciones realizadas. En la Figura 5.5 se presenta el diagrama general del procedimiento para determinar la actividad estrogénica en muestras de agua.

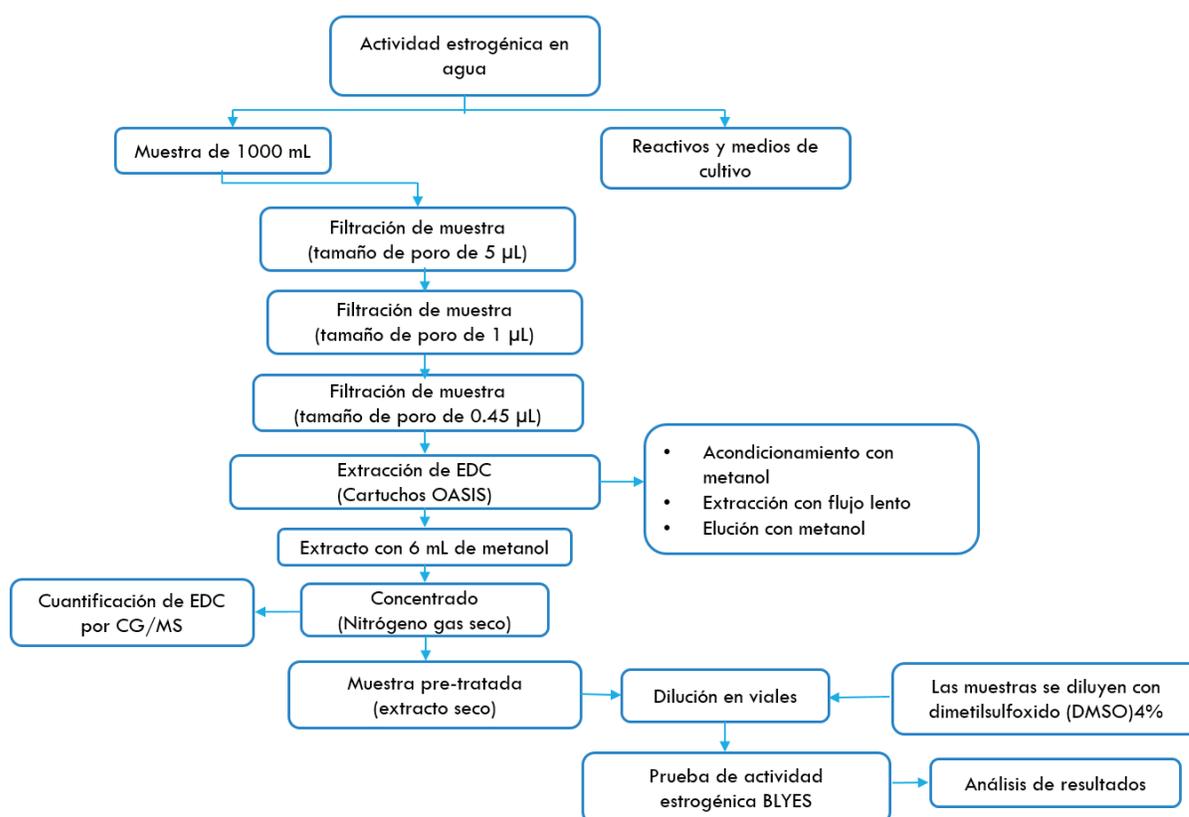


Figura 5.5. Diagrama general de la metodología para determinar actividad estrogénica en muestras de agua.

5.2. Cromatografía De Gases Espectrometría De Masas (GC/MS)

Con la finalidad de contar con una metodología que fuera capaz de evaluar la actividad estrogénica y además determinar la concentración de 4-nonilfenol, nonilfenol, bisfenol-A, triclosán y estrona en agua, se acoplo un método analítico de GC/MS que permitió la detección y cuantificación de los EDC en estudio a partir del extracto obtenido en la prueba BLYES. A continuación se hace una descripción de la metodología desarrollada.

La extracción de los EDC se realizó como se describe en el punto 5.1.2, en el cual se obtuvo un extracto concentrado de 1000 µL, del que se tomó una alícuota de 1 µL y se inyectó al cromatógrafo de gases.

El instrumento analítico utilizado fue un cromatógrafo de gases, que cuenta con las características mostradas en la Tabla 5.3, en esta misma se especifican las condiciones necesarias para llevar a cabo la cuantificación de los EDC en estudio.

El detector de masas se operó en modo "SCAN" en un rango de 50 a 500 m/z con la finalidad de conocer los tiempos de retención y los iones característicos de los EDC de interés (Tabla 5.4). Una vez obtenidos estos valores el detector fue programado en modo "SIM" (modo de ion seleccionado), para trazar las curvas de calibración (0.5 – 1000 ng/L) de cada uno de los compuestos en estudio. Una vez trazadas las curvas de calibración, se determinó la ecuación de las mismas, con las cuales se determinó la concentración de cada uno de los compuestos durante el resto de la experimentación (evaluación de pozo de abastecimiento y tratamiento de oxidación con ozono). Cabe mencionar que el límite de detección establecido para los cinco EDC en estudio fue de 0.5 ng/L. En la Figura 5.6 se muestra el cromatograma emitido por el equipo en donde se pueden observar definidos los picos de los cinco EDC en estudio.

Tabla 5.3. Condiciones óptimas de análisis para la detección, identificación y cuantificación de EDC en agua para abastecimiento mediante GC/MS

Condiciones del análisis por GC/MS
Cromatógrafo de gases: marca Agilent, modelo GC6890
Temperatura de inyección: 250°C
Columna: DB5-MS (30m long X 0.25mm i.d. X 0.25 µm film)
Gas acarreador: Helio
Rampas de temperatura en el horno: 100°C por 1 min incrementándose 20°C/min hasta llegar a 280°C permaneciendo 10°C/min.
Detector: Espectrómetro de masas marca Agilent, modelo MS5973
Modo de operación del detector: modo SIM

Tabla 5.4. Tiempos de retención e iones característicos de los disruptores endócrinos

Disruptor endocrino	Tiempo de retención (min)	Iones característicos (m/z)
Nonilfenol	7.472	135, 107, 136, <u>164</u>
4-nonilfenol	8.346	107, <u>220</u> , 108, 221
Triclosan	9.634	<u>288</u> , 290, 218, 146
Bisfenol-A	9.917	213, <u>228</u> , 119, 214
Estrona	12.671	<u>270</u> , 146, 271, 185

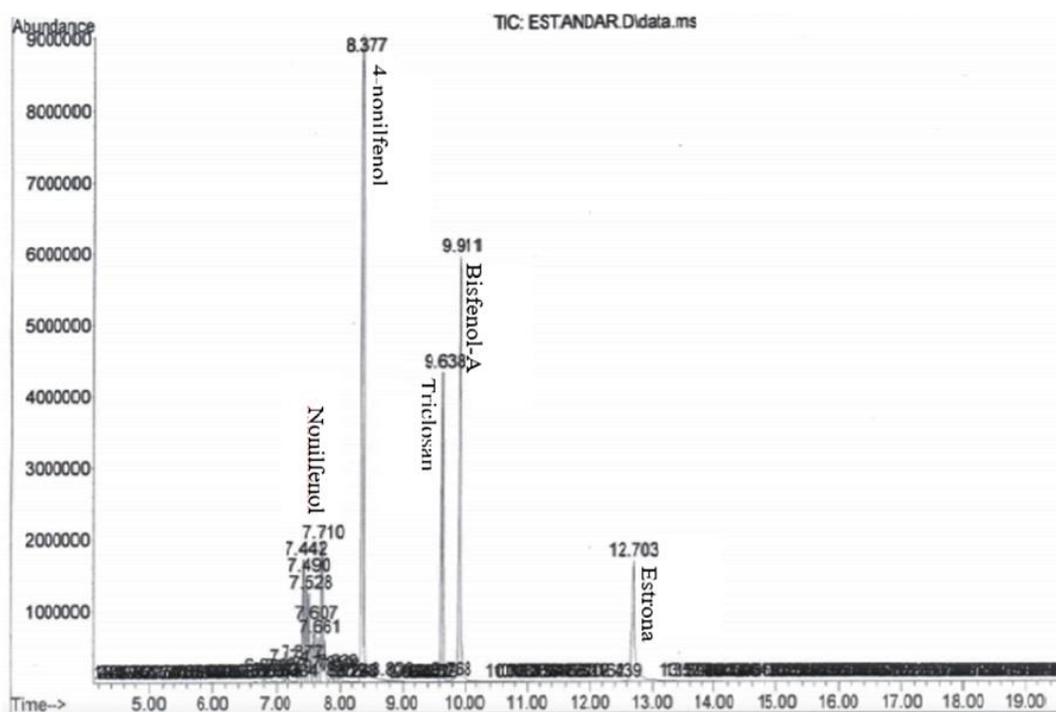


Figura 5.6. Cromatograma de los estándares de referencia de EDC: Nonilfenol, 4-nonilfenol, Triclosan, Bisfenol-A y Estrona usados para la fortificación de la muestra.

Para probar que el método analítico desarrollado era aplicable a muestras de agua real, se realizó el muestreo del pozo de abastecimiento de agua potable de Química, el cual se encuentra ubicado en la Facultad de Química de CU-UNAM, en el cual se analizó la presencia de los cinco EDC estudio así como el de la actividad estrogénica mediante la técnica BLYES. Debido a que la muestra no mostró la presencia de los EDC en estudio ni de actividad estrogénica, se realizó la fortificación de las muestras de agua con los estándares de los

analitos de interés en la concentración que se muestra en la Tabla 5.5, esto con el fin de probar la metodología desarrollada y ver su aplicabilidad en agua de abastecimiento. Dichas muestras también fueron utilizadas para evaluar un tratamiento de oxidación con ozono. Cabe mencionar que las muestras fueron tomadas previo a su cloración. El método de muestreo utilizado fue el 525.2 de la EPA. En la Tabla 5.6 se muestra la caracterización realizada al agua de pozo, la cual presenta una buena calidad, cumpliendo con lo establecido en la normatividad mexicana (NOM-127-SSA1-1994).

Tabla 5.5 Concentración de los EDC fortificados en las muestras de agua de pozo para probar el método analítico.

Disruptor endocrino	Concentraciones de fortificación (ng/L)
Nonilfenol	1000
4-nonilfenol	
Bisfenol-A	
Triclosán	
Estrona	

Tabla 5.6. Características del agua de abastecimiento

Agua de pozo Química	
pH	7.16
N-NH ₄ (mg/L)	N.D.
Alcalinidad (mg/L CaCO ₃)	118.5
Fosfatos (mg/L)	3.33
Nitratos (mg/L)	0.5

TRATAMIENTO DE DISRUPTORES ENDOCRINOS

5.3. Tratamiento con ozono

Con la finalidad de evaluar tanto la remoción, como la posible disminución de la actividad estrogénica en agua de pozo, un tratamiento de oxidación con ozono fue aplicado. Se utilizó agua de pozo fortificada con 4-nonilfenol, nonilfenol, bisfenol-A, triclosán y estrona en una concentración de 1000 ng/L. El tratamiento de ozonación se llevó a cabo 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) con capacidad de producción de 1.9 g de O₃/h. Como unidad de contacto gas-líquido se utiliza una columna de burbujeo de vidrio de 1 L de capacidad, al final del tratamiento la corriente gaseosa es enviada a una unidad de destrucción catalítica de ozono para su liberación segura al ambiente (Figura 5.7). La

concentración de ozono en fase gas fue medida por el método yodométrico y en fase líquida con el método colorimétrico de Índigo (Bader H, Hoigné J, 1981).

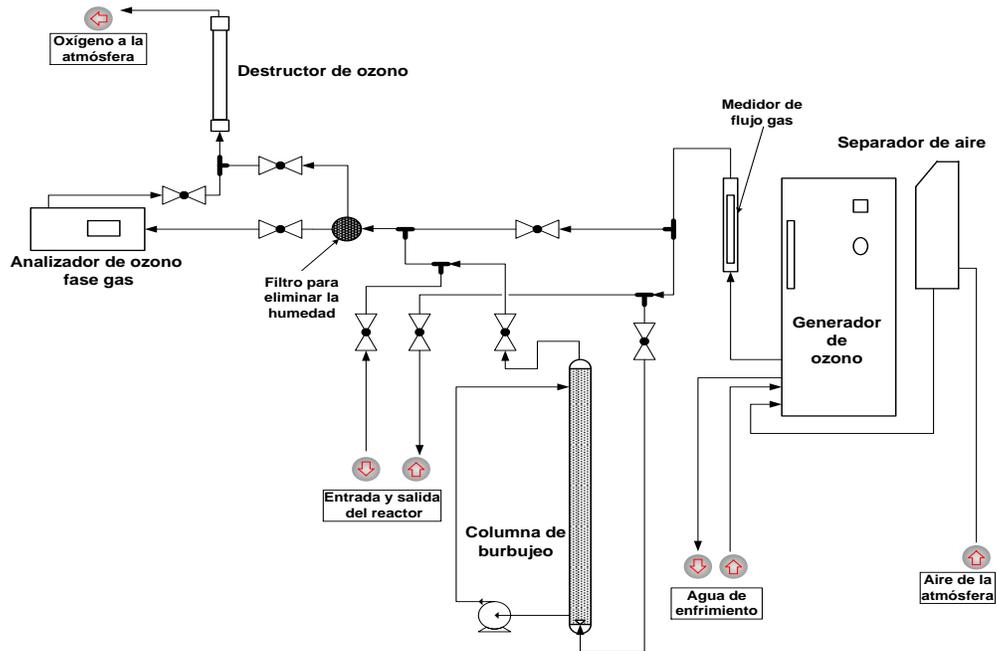


Figura 5.7. Esquema del sistema de tratamiento con ozono

5.3.1 Balance de masa del ozono en el reactor

Para conocer la dosis aplicada (DOA), dosis transferida (DOT), consumo de ozono (DOC) así como el porcentaje de eficiencia de transferencia (ET) del ozono durante las pruebas de oxidación es necesario realizar un balance de masa en el reactor, el cual se realizó a partir de las condiciones de operación del proceso: concentración de ozono en el gas de entrada (C_{ge}) y salida (C_{gs}) del reactor, concentración de ozono residual en fase acuosa (C_r), volumen de reactor (V_r), flujo de gas (Q_g) y tiempo de ozonación (t).

A partir de dicha información fue posible calcular las siguientes variables del proceso:

$$DOA = \frac{C_{ge} \times Q_g \times t}{V_r}$$

$$DOT = \frac{(C_{ge} - C_{gs}) \times Q_g \times t}{V_r}$$

$$DOC = \frac{(C_{ge} - C_{gs}) \times Q_g \times t}{V_r} - C_r$$

$$ET = \frac{C_{ge} - C_{gs}}{C_{ge}} \times 100$$

- 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 de reactor (L)
- t: Tiempo de ozonación (min)

5.4. Diseño experimental

Las pruebas de oxidación con ozono se realizaron con base en un diseño factorial 3² (Tabla 5.7) en el que se consideraron dos factores (tiempo de contacto y concentración de ozono en fase gas) bajo tres niveles de experimentación (Tabla 5.8). Para el desarrollo del diseño experimental se empleó la metodología de superficie de respuesta, la cual consiste en un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas útiles para modelar y analizar problemas en los cuales una respuesta de interés es influida por varios factores, el objetivo es optimizar dicha respuesta. El diseño se realizó a través del software Statgraphics Centurion XV.II. Cabe mencionar que los factores a analizar en el diseño, se tomaron con base en valores reportados en la literatura para la remoción de bisfenol-A, ya que este suele ser más difícil de degradar en comparación con el triclosán, 4-nonilfeno, nonilfenol y estrona (Umar *et al.* 2013). La actividad estrogénica, así como la cuantificación y remoción de los EDC fueron evaluadas en el influente y efluente del proceso de oxidación con ozono aplicando la metodología BLYES-GC/MS implementada.

Tabla 5.7. Variables consideradas en el diseño experimental

Factores	Nivel bajo	Nivel medio	Nivel alto
Tiempo (min)	1	5.5	10
C _{ge} (mg O ₃ /L)	1	5.5	10

C_{ge} = Concentración en fase gas

Tabla 5.8. Diseño experimental factorial 3² para las pruebas oxidación con ozono

C _{ge} (mg O ₃ /L)	Tiempo (min)
10	1
10	5.5
10	10
1	1
1	5.5
1	10
5.5	1
5.5	5.5
5.5	10

C_{ge} = Concentración en fase gas

5.5. Parámetros de calidad del agua

Todo tratamiento aplicado al agua depende de las características de la misma, es por ello que se determinaron algunos parámetros de calidad del agua en la muestra del pozo de abastecimiento. En la Tabla 5.9 se muestran los parámetros a analizar en las diferentes etapas de la metodología así como los métodos utilizados para la determinación de los mismos.

Tabla 5.9. Parámetros de calidad del agua considerados durante el proceso

Parámetro	Punto de análisis		Método
	Pozos	Oxidación con ozono	
Nitrógeno amoniacal	S	I, E	Predestilación-Nessler
Nitratos	S	I, E	Colorimétrico
Alcalinidad	S	I, E	Titulación

S: Suministro (Agua de origen); I: Influyente (Entrada a la unidad de oxidación);
E: Efluente (salida de la unidad de oxidación)

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se muestran los resultados obtenidos en el presente trabajo, el cual comenzó con la implementación de la técnica BLYES y el acoplamiento de la técnica BLYES-GC/MS para evaluar el agua de abastecimiento del pozo de Química de CU-UNAM, así como un tratamiento de oxidación con ozono para la disminución de actividad estrogénica y remoción de EDC presentes en agua.

Primordialmente se inició con la obtención de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* BLYES para su posterior cultivo tanto en placa como en medio líquido, una vez cultivada la levadura se realizó el ensayo BLYES. Para el ensayo BLYES se utilizó como muestra problema agua tipo MilliQ la cual fue fortificada con Nonilfenol, 4-nonilfenol, Triclosan, Bisfenol-A y Estrona en diferentes concentraciones, tanto individualmente como en mezcla. Se realizó un pre-tratamiento de las muestras problema el cual consistió en la extracción de los analitos de interés mediante SPE del que se obtuvo un extracto de eluido de metanol con los compuestos en estudio, que posteriormente fue evaporado mediante una corriente de nitrógeno gas.

El extracto concentrado fue utilizado para determinar el potencial estrogénico mediante el ensayo BLYES el cual mostró una respuesta positiva a la prueba, para las muestras en las que los compuestos se encontraban en mezcla e individualmente. El extracto obtenido en la prueba BLYES también fue utilizado para detectar y cuantificar los compuestos de interés mediante GC/MS, con lo que se logró el acoplamiento de la técnica BLYES-GC/MS.

Una vez implementadas la técnica BLYES-GC/MS se probó la metodología desarrollada en muestras de agua de abastecimiento del pozo de Química de CU-UNAM, sin embargo, al analizar las muestras no se detectó la presencia de los EDC en estudio y la actividad estrogénica fue nula.

Debido a la ausencia de Nonilfenol, 4-nonilfenol, Triclosan, Bisfenol-A y Estrona en el agua de abastecimiento analizada, se realizó una fortificación de los EDC de interés, con la finalidad de probar la metodología desarrollada, así como el de evaluar un proceso de oxidación con ozono para determinar su eficiencia tanto en la disminución de actividad estrogénica como en la remoción de los EDC en estudio.

Teniendo la metodología implementada se realizó el proceso oxidación con ozono a las muestras de agua fortificada. El ozono resultó ser eficiente para la remoción de EDC así como para disminuir la actividad estrogénica. Con base en un análisis estadístico se determinó el tiempo de contacto y la concentración de ozono en fase gas ideal para tener una máxima eficiencia del tratamiento.

6.1. Implementación y aplicación de las técnicas BLYES y BLYES-GC/MS para evaluar la presencia de EDC en agua, así como su actividad estrogénica

Se evaluó la actividad estrogénica de Nonilfenol, 4-nonilfenol, Triclosan, Bisfenol-A y Estrona individualmente, (Figuras 5.1) en concentraciones de 0.5, 10, 50, 75, 100, 250, 500, 750 y 1000 ng/L utilizando la metodología de BLYES-CG/MS. Con la finalidad de evaluar si existía interferencia entre los EDC, éstos fueron analizados también como mezcla (Figura 6.1). La actividad estrogénica máxima observada para los cinco compuestos de manera individual fue calculada entre 5.56 y 11.16 ng/L EEQ (Tabla 6.2) demostrando el potencial estrogénico de los EDC estudiados, que con base en lo reportado por Andeson *et al.*, 2012 estos valores se encuentran por encima de la concentración pronosticada sin efectos, (por sus siglas en inglés, PNEC; predicted-no-effect concentration) la cual la establecen entre 2 y 5 ng/L equivalentes de 17 β -estradiol como los niveles más probables en los cuales la producción de peces puede verse perjudicada tras exposiciones a largo y corto plazo, respectivamente. Así mismo, Caldwell *et al.* en 2012 establecieron un PNEC a largo plazo de 8.7 ng/L equivalentes de 17 β -estradiol en la etapa reproductiva de la especie *Oryzias latipes*, mostrando así el potencial efecto de los EDC en estudio, sobre organismos acuáticos. Por otra parte, Wenzel *et al.* en 2003 reportaron una concentración máxima de exposición para humanos en agua potable de 1.6 y 4.1 ng/L de 17 β -estradiol por día para niños y adultos, respectivamente, lo que indica que la actividad estrogénica de las muestras fortificadas se encuentra por encima de lo permitido en agua para consumo humano. Las muestras fortificadas mostraron una respuesta positiva para el ensayo de BLYES, lo que concuerda con lo reportado por varios autores quienes establecen que la metodología BLYES es aplicable para determinación de la actividad estrogénica de EDC presentes en muestras de agua de abastecimiento y potable (Di Dea *et al.*, 2011; Dawn, 2015; Montagner *et al.*, 2014 y Alves *et al.*, 2017) fungiendo así como una herramienta de monitoreo para evaluar los efectos estrogénicos de los EDC presentes en este tipo de agua, lo que resulta importante debido a la exposición de la población a estos compuestos. Corroborando lo establecido por Sanseverino en 2005, quien estableció que la técnica BLYES es una técnica rápida y de alto rendimiento de compuestos estrogénicos y tiene la capacidad de utilizarse para monitoreo remoto, casi en tiempo real, de sustancias químicas con alteraciones estrogénicas en el ambiente.

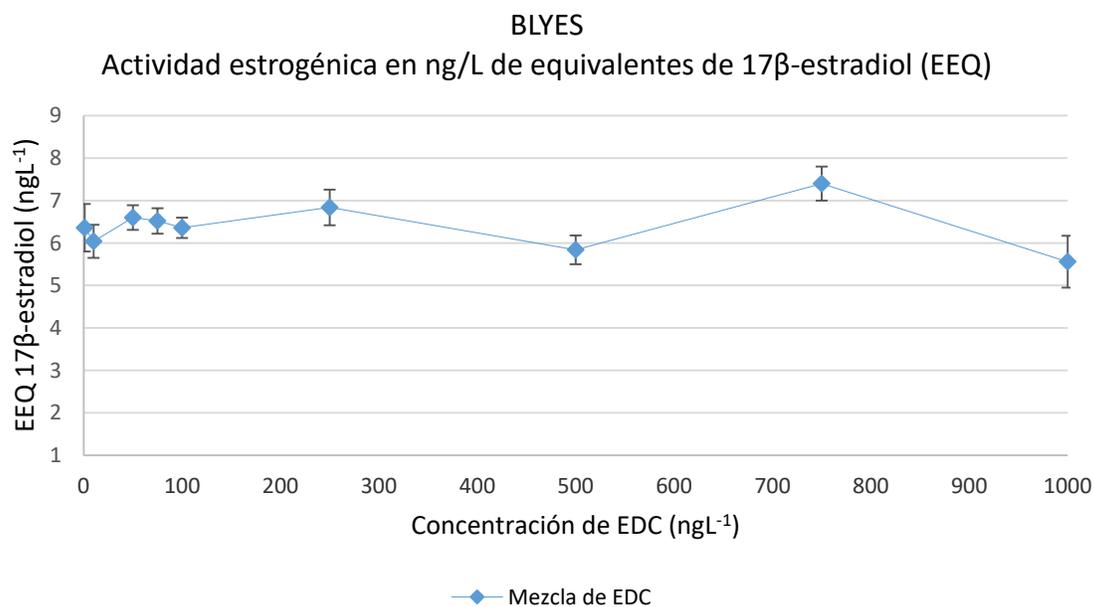


Figura 6.1. Actividad estrogénica (EEQ 17β-estradiol ng/L) de Nonilfenol, 4-nonilfenol, Triclosán, Bisfenol-A y Estrona analizados como mezcla en una muestra fortificada de agua para abastecimiento.

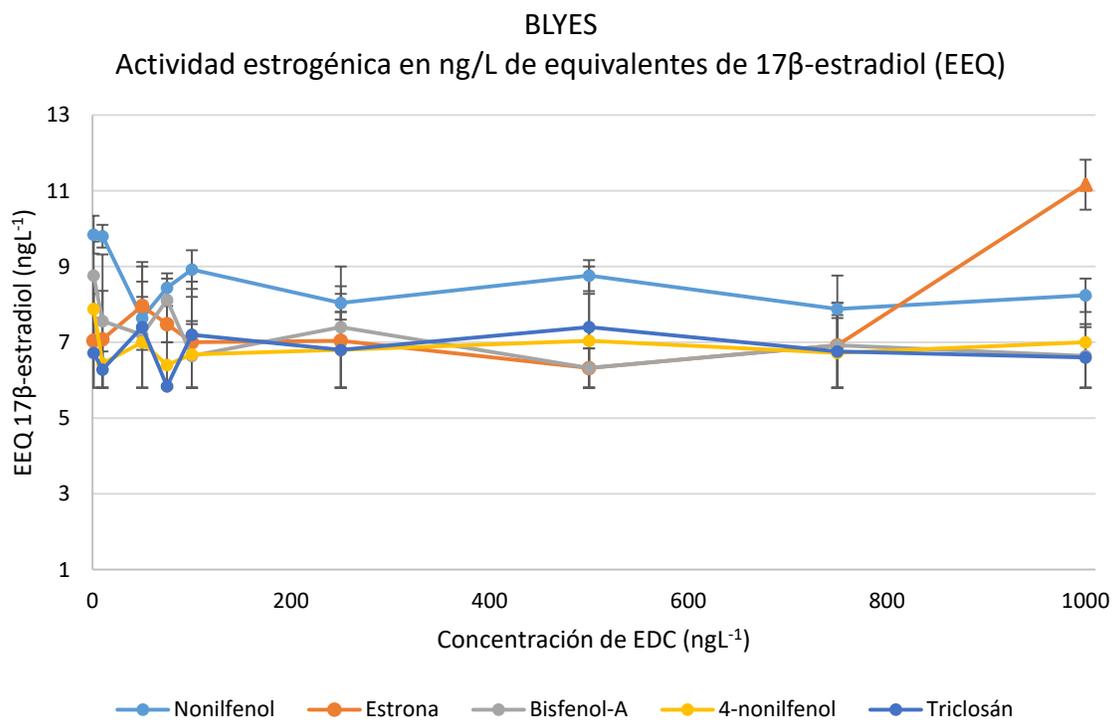


Figura 6.2. Actividad estrogénica (EEQ 17β-estradiol ng/L) de Nonilfenol, 4-nonilfenol, Triclosan, Bisfenol-A y Estrona analizados individualmente en una muestra fortificada de agua para abastecimiento.

En la Tabla 6.1 se observa que no hay una relación directa entre la intensidad en la respuesta de actividad estrogénica reportada como ng/L EEQ con la concentración cuantificada por GC/MS. Este comportamiento es explicado por Myers y Hessler (2007) en el que reporta que una característica de especial relevancia de los EDC es que no presentan un patrón lineal (a mayor dosis mayor efecto negativo) en la relación dosis – respuesta debido a que muchas sustancias químicas con actividad endocrina no siguen este patrón, sino que presentan curvas dosis respuesta no lineales, ya sea en forma de U o de U invertida, indicando que pueden provocar efectos tóxicos a dosis altas, ningún efecto a dosis intermedias y efectos adversos a dosis bajas o viceversa-

Resultados similares fueron reportados por Di Dea *et al.* en 2011 quienes compararon la respuesta de la actividad estrogénica de muestras de agua superficial con las concentraciones de EDC encontradas, usando análisis de cromatografía líquida. Ellos reportan que BLYES tuvo mayor sensibilidad que cromatografía líquida, y en sus resultados se observa que concentraciones encontradas para BPA de 8.1 o 47 ng/L pueden presentar la misma respuesta por BLYES: 0.2 ng/L EEQ. Esto lo atribuyen a que al tratarse de muestras reales, es posible que otros compuestos que no fueron encontrados mediante cromatografía líquida se encuentren en cantidades suficientes como para causar respuesta positiva a la actividad estrogénica usando BLYES. En el presente trabajo fue posible usar el mismo extracto para ambas técnicas, BLYES y GC/MS y tratándose de muestras reales fortificadas podría pensarse en la interferencia de otros compuestos. No obstante se analizaron las muestras de agua de pozo sin fortificar en las que no se detectó presencia de EDC ni actividad estrogénica, por lo que no fue posible determinar posibles interferencias. Por otra parte, cuando los cinco EDC se encuentran en una mezcla, la actividad estrogénica tiende a disminuir entre 2 y 3 ng/L EEQ de 17 β -estradiol (Figura 6.1) esto debido a una posible inhibición, por la interacción entre los EDC en estudio, esto fundamentado en lo reportado por Kortenkamp *et al.* (2009) quienes establecen que una de las características de algunos EDC, es que el efecto adverso puede ser el resultado de la acción combinada de diversas sustancias, que a nivel individual no presentan efectos negativos detectables, pero combinados pueden desencadenar una respuesta paradójica, bien sinérgica, antagónica, aditiva o inhibitoria, éste último comportamiento fue el caso de la combinación de Nonilfenol, 4-nonilfenol, Triclosan, Bisfenol-A y Estrona para el presente estudio.

No existe un umbral de concentración exacto para el desarrollo del efecto endocrino, o al menos ese nivel de concentración es diferente al conocido como límite de seguridad para otros aspectos toxicológicos distintos de la disrupción endocrina (Colborn y Clement, 1992). Aunque hipotéticamente pudiese establecerse un umbral de exposición segura para una sustancia determinada en un individuo determinado, no es posible establecer umbrales de exposición seguros para una población, dada la diferente sensibilidad individual a los EDC. Por todo ello, los EDC deben considerarse sustancias sin límite de exposición seguros, ya

que al evaluar la actividad estrogénica mediante BLYES no se estableció un comportamiento lineal por parte de los EDC estudiados en comparación con la concentración de los mismos.

Tabla 6.1. Concentración Y Actividad estrogénica evaluada en agua de abastecimiento fortificada con EDC aplicando la metodología de BLYES-CG/MS.

Concentración de EDC	ng/L EEQ de 17 β -estradiol					
	Mezcla de EDC	Nonilfenol	Estrona	Bisfenol A	4-nonilfenol	Triclosan
1000	5.56 \pm 0.61	8.24 \pm 0.44	11.16 \pm 0.66	6.64 \pm 0.84	7.00 \pm 1.20	6.60 \pm 0.80
750	7.40 \pm 0.40	7.88 \pm 0.88	6.92 \pm 1.12	6.92 \pm 1.12	6.72 \pm 0.92	6.76 \pm 0.96
500	5.84 \pm 0.34	8.76 \pm 0.41	6.32 \pm 0.52	6.32 \pm 0.52	7.04 \pm 1.24	7.40 \pm 1.60
250	6.84 \pm 0.42	8.04 \pm 0.44	7.04 \pm 1.24	7.40 \pm 1.60	6.80 \pm 1.00	6.80 \pm 1.00
100	6.36 \pm 0.24	8.92 \pm 0.51	7.00 \pm 1.20	6.64 \pm 0.84	6.68 \pm 0.88	7.20 \pm 1.40
75	6.52 \pm 0.30	8.44 \pm 0.38	7.48 \pm 0.48	8.12 \pm 0.56	6.40 \pm 0.60	5.84 \pm 0.04
50	6.60 \pm 0.29	7.64 \pm 0.29	7.96 \pm 1.16	7.20 \pm 1.40	7.00 \pm 1.20	7.40 \pm 1.60
10	6.04 \pm 0.39	9.80 \pm 0.30	7.08 \pm 1.28	7.56 \pm 1.76	6.44 \pm 0.64	6.28 \pm 0.48
1	6.36 \pm 0.56	9.84 \pm 0.50	7.04 \pm 1.24	8.76 \pm 0.90	7.88 \pm 0.88	6.72 \pm 0.92

6.2. Aplicación de la técnica BLYES-GC/MS en agua de pozo

Con la implementación de la técnica BLYES-GC/MS fue posible aplicar la metodología desarrollada a muestras de agua real, para la cuales se utilizó agua de abastecimiento del pozo de Química de CU-UNAM en el cual se realizó un total de tres muestreos, con la finalidad de evaluar su actividad estrogénica mediante BLYES así como detectar y cuantificar Nonilfenol, 4-nonilfenol, Triclosan, Bisfenol-A y Estrona por GC/MS. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6.2 en la cual se puede observar que no se encontró presencia de los EDC en estudio, debido a que no se logró la detección y cuantificación de los mismos, mediante GC/MS; así también se tuvo una respuesta negativa al ensayo BLYES, lo que indica que no hay presencia de otros disruptores endocrinos que puedan interferir o generar actividad estrogénica en el agua analizada, descartando la posibilidad de contaminación de EDC en el suministro de agua potable de la UNAM por la posible infiltración del agua tratada proveniente de la PTAR Cerro del Agua, utilizada para el riego de áreas verdes en Ciudad Universitaria. Con base en esto se determinó que el agua de abastecimiento proveniente del pozo de Química de CU-UNAM no se tiene presencia de EDC que pudieran generar actividad estrogénica que pusiera en riesgo a la población del campus de la UNAM.

Tabla 6.2. Evaluación de agua de pozo de abastecimiento de Química mediante la técnica BLYES-GC/MS

EDC determinados por GC/MS (ng/L)					Actividad estrogénica (ng/L EEQ)
Nonilfenol	4-Nonilfenol	Triclosán	Bisfenol-A	Estrona	BLYES
<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	ND

ND: No detectado

6.3. Aplicación de la técnica BLYES-GC/MS para determinar la actividad estrogénica durante el tratamiento oxidación con ozono del agua de pozo fortificada con EDC.

Dado que en el agua de abastecimiento analizada no se encontraron EDC, ni hubo respuesta positiva de actividad estrogénica evaluados mediante la técnica BLYES-GC/MS, se realizó la fortificación de la misma con Nonilfenol, 4-nonilfenol, Triclosan, Bisfenol-A y Estrona mezclados en una concentración de 1000 ng/L para posteriormente aplicar un tratamiento de oxidación con ozono.

Para el tratamiento con ozono se trabajaron las muestras fortificadas con EDC en mezcla, debido a que estos compuestos rara vez se encuentran de manera individual en los cuerpos de agua. Se esperaba que al aplicar un tratamiento de oxidación con ozono este fuera capaz de remover todos los compuestos presentes en la muestra, así como disminuir el potencial estrogénico generado por la presencia de EDC.

Mediante la técnica BLYES-GC/MS, se determinó el potencial estrogénico de las muestras fortificadas antes y después del tratamiento con ozono. Los resultados se pueden observar en la Tabla 6.3 y Figura 6.3 en las cuales se puede ver la eficiencia del tratamiento para disminuir el potencial estrogénico de los cinco EDC estudiados, esto debido a que el ozono es un potente oxidante que puede llevar a los compuestos de interés hasta la mineralización (Soo *et al.*, 2006) logrando así una alta eficiencia en cuanto a remoción y a la reducción del potencial estrogénico de los compuestos.

Diversos autores han investigado la actividad estrogénica de EDC en agua y la reducción después de un tratamiento con ozono utilizando técnicas de biología molecular para evaluar los efectos estrogénicos entre las que se encuentran YES y la línea celular MCF-7 (Alum *et al.*, 2004, Huber *et al.*, 2004). Estos autores indican la generación de subproductos que son también biológicamente activos incluso después de aplicación de altas dosis de ozono, lo cual puede explicar porque no se da una completa reducción de la actividad estrogénica en las muestras tratadas, después del proceso de ozonación. Huber *et al.*, (2004) reporta que un aumento en la concentración de ozono de 0.5 a 10 mgO₃/L reduce la estrogénicidad del agua original en un factor de 200-1000 unidades, sin embargo, esta estrogénicidad residual, aunque es baja, puede ser relevante si se considera que el agua es sólo una de muchas posibles fuentes de contaminación.

Tabla 6.3. Resultados de la actividad estrogenica evaluada con BLYES de las muestras fortificadas con la mezcla de los cinco EDC antes y después del tratamiento con ozono.

Prueba	Cge (mg/L)		Tiempo (min)	Actividad estrogenica de muestras de agua de pozo fortificada con EDC en estudio (ng/L EEQ)		
				Inicial	Ozononada	Disminución en %
1	10.96	± 0.7	10	5.56 ± 0.44	0.28 ± 0.14	95±3
2	9.88	± 1.01	5.5	7.42 ± 0.42	0.3 ± 0.10	96±4
3	9.4	± 0.9	1	6.89 ± 0.36	0.41 ± 0.15	94±3
4	1.08	± 0.32	10	7.22 ± 0.22	0.51 ± 0.39	93±5
5	1.32	± 0.24	5.5	6.34 ± 0.22	0.38 ± 0.16	94±4
6	1.32	± 0.32	1	5.84 ± 0.34	0.18 ± 0.16	97±6
7	5.28	± 0.63	10	6.83 ± 0.25	0.27 ± 0.11	96±6
8	5.72	± 0.8	5.5	5.92 ± 0.38	0.12 ± 0.09	98±7
9	5.28	± 0.83	1	5.67 ± 0.55	0.34 ± 0.24	94±5

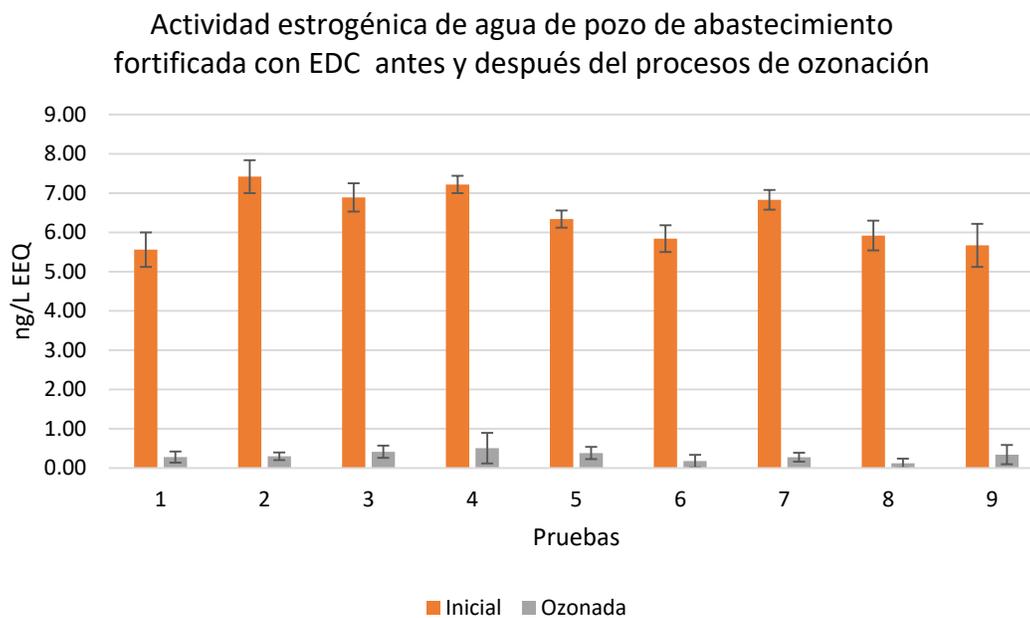


Figura 6.3. Reducción de la actividad estrogenica de muestras de agua fortificada con cinco EDC mediante el tratamiento con ozono.

6.4. Determinación de la remoción de EDC obtenida en el proceso de ozonación

A la par de evaluar la actividad estrogénica en las muestras de agua fortificadas antes y después del tratamiento con ozono, se cuantificó la concentración de Nonilfenol, 4-nonilfenol, Triclosan, Bisfenol-A y Estrona mediante la técnica de GC/MS a partir de las curvas de calibración realizadas para cada uno de estos compuestos.

El proceso de ozonación resultó ser eficiente en la remoción de los cinco EDC en estudio, obteniéndose remociones mayores al 90% para todos los compuestos, en la Figura 6.4 se puede observar la eficiencia del tratamiento con ozono en la remoción de los EDC, esto a partir del diseño experimental aplicado.

Con el fin de dar mayor confiabilidad a los resultados obtenidos en el diseño experimental, se realizó un análisis estadístico, empleando el software Statgraphics Centurion XV. II donde se incluyen: Tabla ANOVA, diagrama de Pareto, gráfica de superficie de respuesta, coeficiente de correlación, grafica de efectos principales y valor óptimo de las variables.

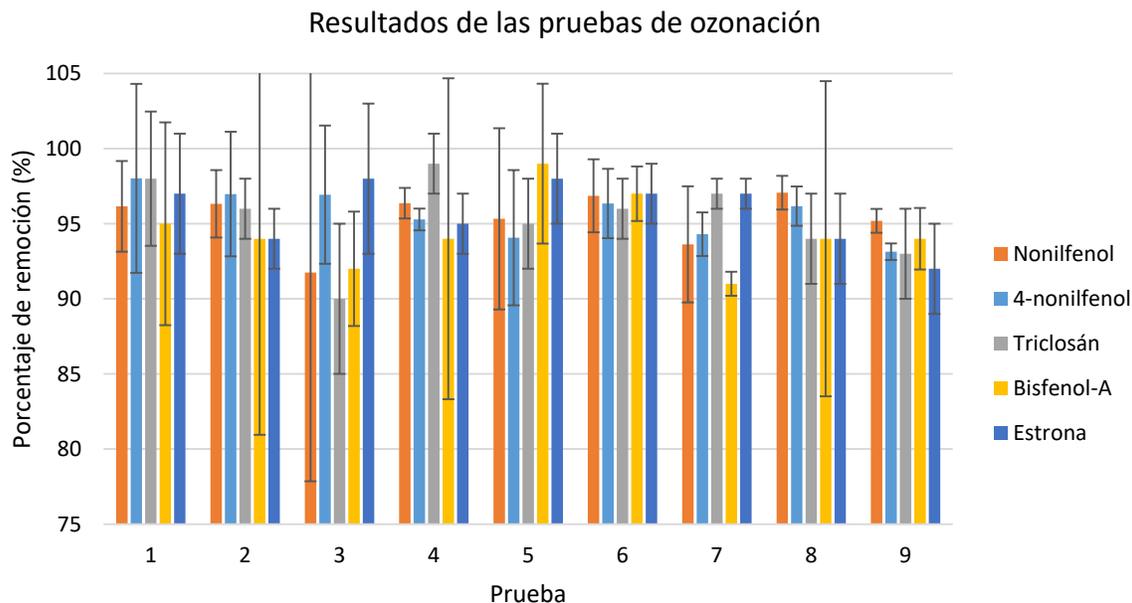


Figura 6.4. Resultados del tratamiento con ozono para la remoción de cinco EDC presentes en agua de pozo fortificada

A continuación se muestra el análisis de resultados obtenido para cada uno de los EDC analizados.

6.4.1. Remoción de nonilfenol

El proceso de ozonación resultó ser eficiente en la remoción del nonilfenol presente en muestras de agua fortificadas con una concentración de 1000 ng/L, en la Tabla 6.4 se observan los resultados obtenidos, cabe mencionar que cada prueba se realizó por triplicado para corroborar la factibilidad del diseño.

Tabla 6.4. Resultados obtenidos de las pruebas de ozonación para la remoción de nonilfenol.

Prueba	Cge (mg/L)	Tiempo (min)	Nonilfenol		
			Concentración inicial (ng/L)	Concentración final (ng/L)	% Remoción
1	10.96 ± 0.7	10	824 ± 382	26 ± 21	96 ± 3
2	9.88 ± 1.01	5.5	992 ± 445	30 ± 1	96 ± 2
3	9.4 ± 0.9	1	706 ± 459	41 ± 54	92 ± 14
4	1.08 ± 0.32	10	1211 ± 422	46 ± 24	96 ± 1
5	1.32 ± 0.24	5.5	983 ± 128	48 ± 59	95 ± 6
6	1.32 ± 0.32	1	1023 ± 149	34 ± 28	97 ± 2
7	5.28 ± 0.63	10	810 ± 282	55 ± 49	94 ± 4
8	5.72 ± 0.8	5.5	766 ± 231	21 ± 4	97 ± 1
9	5.28 ± 0.83	1	713 ± 194	34 ± 7	95 ± 1

En la Tabla 6.5 se presenta el análisis de varianza aplicado a los resultados de los experimentos de ozonación. Se compara el valor-P de cada factor y de sus interacciones con el valor del nivel de significancia prefijado para el análisis ($\alpha=0.05$). Si el valor-P es menor a 0.05, se concluye que el efecto correspondiente es estadísticamente diferente de cero, es decir, tal efecto está activo o influye de manera significativa sobre el parámetro de repuesta (% de remoción de nonilfenol). Entre más pequeño sea el valor-P de un efecto, este último es más importante. Se determinó que los dos factores estudiados son significativos para el proceso.

Tabla 6.5. Análisis de la Varianza para la remoción de nonilfenol.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Cge	8.16667	1	8.16667	28.45	0.0129
B:Tiempo	13.5	1	13.5	47.03	0.0063
AA	2.72222	1	2.72222	9.48	0.0542
AB	0.25	1	0.25	0.87	0.4195
BB	0.0555556	1	0.0555556	0.19	0.6897
Error total	0.861111	3	0.287037	R ² = 96.63	
Total (corr.)	25.5556	8		R ² _{aj} = 91.01	

Los valores de R^2 y R^2_{aj} permiten comparar la variabilidad explicada por el modelo frente a la variación total y cuantificar el porcentaje de variabilidad presente en los datos y que es explicado por el modelo, el análisis de varianza para la remoción de nonilfenol con el proceso de ozonación, que se muestra en la Tabla 6.5, indica los parámetros determinantes en el proceso, con un intervalo de confianza del 95%. Se obtiene una $R^2_{aj} = 91.01$, lo cual permite definir que el modelo explica solo el 91.01% de las variables que influyen en la remoción de nonilfenol.

6.4.2. Efectos de las interacciones entre variables que afectan la remoción de nonilfenol por ozonación.

En la Figura 6.5 se muestra el diagrama de Pareto, el cual también fue obtenido con el software estadístico. El diagrama de Pareto estandarizado compara el valor absoluto de los efectos estandarizados contra el valor crítico de tablas de la distribución T de Student ($t_{\alpha/2, g.l.}$). En la Figura 6.6 se puede observar la influencia (positiva o negativa) de cada factor y sus interacciones. Por lo cual, un incremento en las variables con efecto positivo aumentaría el porcentaje de remoción del nonilfenol. Siendo el tiempo el factor de mayor influencia en la remoción del EDC.

El grado de oxidación de los compuestos de interés depende de la cantidad de ozono empleado y del tiempo del contacto, es por ello que la cantidad de ozono en fase gaseosa y el tiempo de contacto en el proceso son factores importantes debido a que la cantidad de ozono consumida por el agua, depende del tiempo en que se transfiera ozono desde la fase gas a la fase líquida, lo que va relacionado con el grado de oxidación de los compuestos presentes en el agua, que a su vez se relaciona con los costos de operación de los sistemas de tratamiento. Para este proceso se determinó a mayor concentración de C_{ge} y tiempo de contacto la remoción del nonilfenol tiende a una mayor eficiencia de remoción (Figura 6.6). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Joo *et al.* (2006), en donde ellos variaron dosis de ozono para la remoción de nonilfenoles y concluyeron que a medida que se incrementaba dosis de ozono y el tiempo de contacto la eliminación del EDC era mayor. Resultados parecidos han sido reportados por Wang *et al.* (2014), en donde variaron concentraciones de ozono de 0.5, 0.75 y 1 mg/L, obteniendo remociones más altas a medida que la concentración de ozono se incrementa.

En la Figura 6.6 se presenta el gráfico que ilustra los efectos principales. Se observa que los niveles con mayor peso en los factores son los siguientes:

- **C_{ge} : Nivel mayor (10 mg/L)**
- **Tiempo: Nivel mayor (10 minutos)**

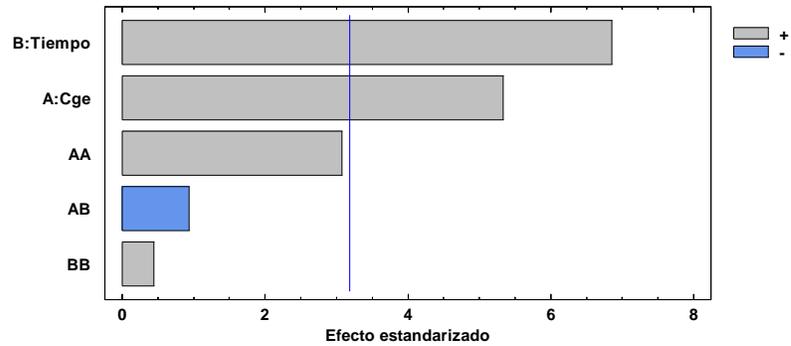


Figura 6.5. Diagrama de Pareto estandarizado para la remoción de nonilfenol.

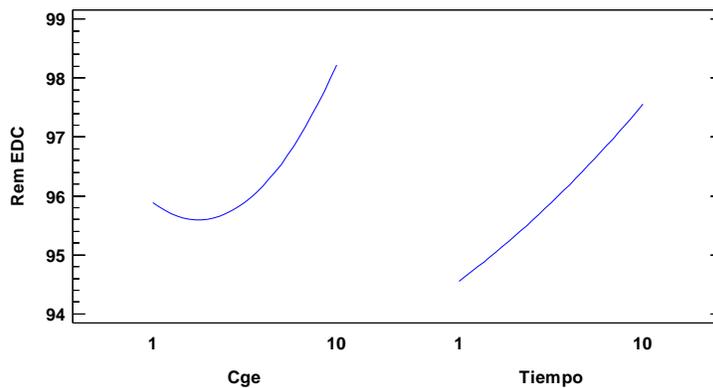


Figura 6.6. Gráfica de efectos principales para la remoción de nonilfenol.

La ecuación de regresión o modelo matemático que se ha ajustado a los datos y se obtuvo a partir del software es la siguiente:

$$\text{Remoción de nonilfenol} = 94.2479 - 0.306584 \cdot \text{Cge} + 0.3107 \cdot \text{Tiempo} + 0.0576132 \cdot \text{Cge}^2 - 0.0123457 \cdot \text{Cge} \cdot \text{Tiempo} + 0.00823045 \cdot \text{Tiempo}^2$$

La superficie de respuesta estimada del análisis de varianza se presenta en la Figura 6.7 ilustrando el efecto del Cge y el tiempo de contacto sobre la remoción del nonilfenol, en el que se puede observar como la remoción del compuesto tiende a incrementar a medida que los factores de experimentación son mayores. Los mejores valores de los factores evaluados para obtener una máxima remoción de nonilfenol se muestran en la Tabla 6.6.

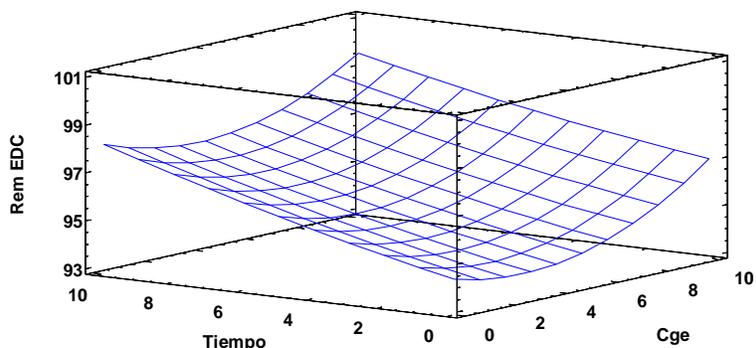


Figura 6.7. Superficie de respuesta estimada para los factores significativos en la remoción de nonilfenol

Tabla 6.6. Mejores valores de los factores evaluados para lograr la mayor remoción de nonilfenol por ozonación.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Cge	1.0	10.0	10.0
Tiempo	1.0	10.0	10.0
% rem NP = 99.63			

6.4.3. Pruebas de ozonación para la remoción de 4-nonilfenol

El proceso de ozonación resultó ser favorable en la remoción de 4-nonilfenol presente en las muestras de agua fortificadas, obteniendo remociones mayores al 93%. En la Tabla 6.7 se pueden observar los resultados obtenidos en cada una de las pruebas realizadas.

Tabla 6.7. Resultados obtenidos de las pruebas de ozonación para la remoción de 4-nonilfenol.

Prueba	Cge (mg/L)	Tiempo (min)	4-nonilfenol		
			Concentración inicial (ng/L)	Concentración final (ng/L)	% Remoción
1	11 ± 0.7	10	1084 ± 109	21.5 ± 12	98 ± 6.3
2	9.88 ± 1.01	5.5	1141 ± 28	34.5 ± 20	97 ± 4.2
3	9.4 ± 0.9	1	754 ± 175	23.1 ± 5	97 ± 4.6
4	1.08 ± 0.32	10	1181 ± 255	55.7 ± 32	95 ± 0.7
5	1.32 ± 0.24	5.5	934 ± 94	55.4 ± 27	94 ± 4.5
6	1.32 ± 0.32	1	1202 ± 284	43.9 ± 20	96 ± 2.3
7	5.28 ± 0.63	10	624 ± 144	35.5 ± 28	94 ± 1.4
8	5.72 ± 0.8	5.5	753 ± 127	28.8 ± 19	96 ± 1.3
9	5.28 ± 0.83	1	584 ± 87	40 ± 23	93 ± 0.6

El análisis de varianza en la remoción de 4-nonilfenol que se muestra en la Tabla 6.8, indica los parámetros más determinantes en el proceso, con un intervalo de confiabilidad del 95%.

Se obtiene un $R^2_{aj} = 87.34$, lo cual permite definir que el modelo explica el 87.34% de las variables que afectan la remoción del 4-nonilfenol. Los factores que poseen un valor-P inferior a 0.05 se consideran como los más importantes a la hora de obtener la máxima eficiencia. Para este caso tanto el Cge y el tiempo resultaron influir significativamente en la remoción del 4-nonilfenol, siendo el tiempo de contacto el factor con mayor influencia sobre la variable de respuesta.

Tabla 6.8. Análisis de la Varianza para la remoción de 4-nonilfenol.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Cge	13.5	1	13.5	18.46	0.0232
B:Tiempo	24.0	1	24.0	32.81	0.0106
AA	0.0555556	1	0.0555556	0.08	0.8008
AB	6.25	1	6.25	8.54	0.0613
BB	0.222222	1	0.222222	0.30	0.6199
Error total	2.19444	3	0.731481	$R^2 = 95.25$	
Total (corr.)	46.2222	8		$R^2_{aj} = 87.34$	

6.4.4. Efectos de las interacciones entre variables que afectan la remoción de nonilfenol por ozonación

En la Figura 6.8, se presenta el diagrama de Pareto estandarizado, en el cual se puede observar de manera esquemática la influencia positiva o negativa de los factores significativos en la variable de respuesta.

Habiendo mencionado la importancia de los factores evaluados en la presente investigación (Cge y tiempo de contacto), se obtuvieron resultados similares al nonilfenol para la remoción del 4-nonilfenol. En la Figura 6.9 se puede observar que al nivel más alto de los factores evaluados se tiende a mayores remociones del compuesto. Corroborando lo reportado por Joo *et al.* (2006), quienes concluyen que la remoción del 4-nonilfenol incrementa a medida que la concentración de ozono es mayor. Así mismo Hernández *et al.* en 2011 reportaron resultados similares en el cual evaluaron la remoción de EDC en muestras de agua MiliQ mediante la combinación de ozono y carbón activado, obteniendo resultados similares al presente trabajo en el cual determinaron que a medida que se incrementa la dosis de ozono aplicada que va en función del Cge y el tiempo de contacto, la remoción de los EDC es mayor incluyéndose nonilfenoles, bisfenol-A y triclosán, siendo los nonilfenoles los compuestos más resistentes al tratamiento con ozono, reportando una dosis de ozono aplicada de 15 mg/L durante 60 minutos para obtener eficiencias de remoción mayores al 79%.

En la Figura 6.8 se presenta el gráfico de efectos principales para la remoción de 4-nonilfenol a través del proceso de ozonación. Los niveles con mayor peso en la variable de respuesta son los siguientes:

- **Cge: Nivel mayor (10 mg/L)**
- **Tiempo: Nivel mayor (10 minutos)**

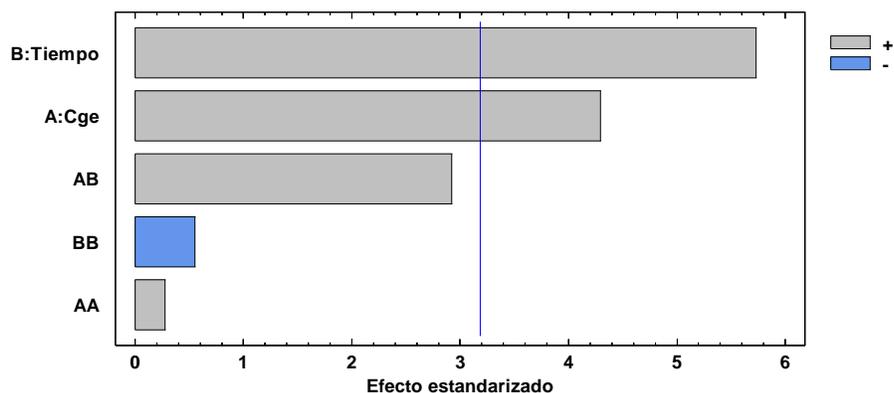


Figura 6.8. Diagrama de Pareto estandarizado para la remoción de 4-nonilfenol

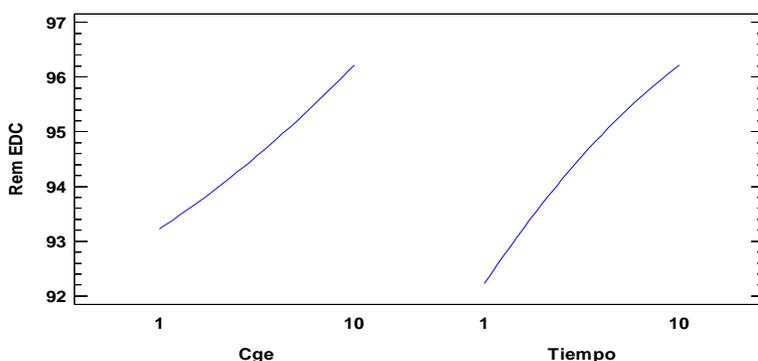


Figura 6.9. Gráfica de efectos principales para la remoción del 4-nonilfenol.

La ecuación de regresión o modelo matemático que se ha ajustado a los datos y se obtuvo a partir del software es la siguiente:

$$\text{Remoción 4-NP} = 91.8961 - 0.0967078 \cdot \text{Cge} + 0.286008 \cdot \text{Tiempo} + 0.00823045 \cdot \text{Cge}^2 + 0.0617284 \cdot \text{Cge} \cdot \text{Tiempo} - 0.0164609 \cdot \text{Tiempo}^2$$

La superficie de respuesta estimada del análisis de varianza se presenta en la Figura 6.10, mostrando el efecto del Cge y el tiempo sobre la remoción de 4-nonilfenol, en el que se puede observar como la remoción del compuesto tiende a incrementar a medida que los factores de experimentación son mayores. Los mejores valores de los factores evaluados para obtener una máxima remoción de 4-nonilfenol se muestran en la Tabla 6.9.

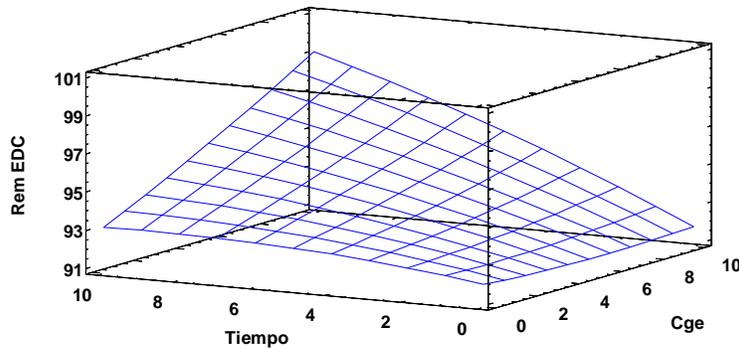


Figura 6.10. Superficie de respuesta estimada para los factores significativos en la remoción de 4-nonilfenol-

Tabla 6.9. Mejores valores de los factores evaluados para lograr la mayor remoción de 4-nonilfenol por ozonación.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Cge	1.0	10.0	10.0
Tiempo	1.0	10.0	10.0
% rem 4-NP = 99.14			

6.4.5. Pruebas de ozonación para la remoción de triclosan

El proceso de ozonación resultó ser favorable en la remoción del triclosan presente en las muestras de agua fortificadas, obteniendo remociones mayores al 90%. En la Tabla 6.10 se pueden observar los resultados obtenidos en cada una de las pruebas realizadas.

Tabla 6.10. Resultados obtenidos de las pruebas de ozonación para la remoción de triclosan.

Prueba	Cge (mg/L)	Tiempo (min)	Triclosan		
			Concentración inicial (ng/L)	Concentración final (ng/L)	% Remoción
1	11 ± 0.7	10	1168 ± 76	38 ± 11	98 ± 4
2	9.88 ± 1.01	5.5	1175 ± 104	52 ± 18	96 ± 2
3	9.4 ± 0.9	1	1335 ± 93	46 ± 9	90 ± 5
4	1.08 ± 0.32	10	1162 ± 141	28 ± 11	99 ± 2
5	1.32 ± 0.24	5.5	1226 ± 347	116 ± 26	95 ± 3
6	1.32 ± 0.32	1	1182 ± 49	10 ± 4	96 ± 2
7	5.28 ± 0.63	10	832 ± 132	66 ± 17	97 ± 1
8	5.72 ± 0.8	5.5	833 ± 105	52 ± 16	94 ± 3
9	5.28 ± 0.83	1	1431 ± 275	138 ± 41	93 ± 3

El análisis de varianza en la remoción de triclosan que se muestra en la Tabla 6.11, indica los parámetros más determinantes en el proceso, con un intervalo de confiabilidad del 95%.

Se obtiene un $R^2_{aj} = 65.56$, lo cual permite definir que el modelo explica el 65.56% de las variables que afectan la remoción del triclosan. El tiempo de contacto resulto influir significativamente en la remoción del compuesto.

Tabla 6.11. Análisis de la Varianza para la remoción de triclosan

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Cge	6.0	1	6.0	2.32	0.2249
B:Tiempo	37.5	1	37.5	14.52	0.0318
AA	2.0	1	2.0	0.77	0.4437
AB	6.25	1	6.25	2.42	0.2177
BB	0.5	1	0.5	0.19	0.6897
Error total	7.75	3	2.58333	$R^2 = 87.08$	
Total (corr.)	60.0	8		$R^2_{aj} = 65..56$	

6.4.6. Efectos de las interacciones entre variables que afectan la remoción de triclosan por ozonación.

En la Figura 6.11, se presenta el diagrama de Pareto estandarizado, en el cual se puede observar de manera esquemática la influencia positiva o negativa de los factores significativos en la variable de respuesta, donde se puede observar que el factor de mayor influencia positiva y que afecta directamente la remoción del triclosan es el tiempo de contacto. Siendo el tiempo el factor con influencia positiva dentro del proceso, en la Figura 6.12, puede observarse que a medida que el tiempo incrementa la remoción de triclosan es mayor. Por lo contrario el Cge resulto tener influencia negativa en la remoción del compuesto, dado que como puede observarse en la Figura 6.12, a medida que el Cge aumenta la remoción del compuesto tiende a disminuir. Berk en 2014 reporta que a medida que se incrementa el tiempo de contacto la remoción del triclosan tiende a ser mayor así mismo obtuvo que no hay diferencia significativa entre el uso de dosis altas y bajas de ozono obteniendo remociones del 99% con un Cge de 5 mgO₃/L en 10 minutos.

En la Figura 6.12 se presenta el gráfico de efectos principales para la remoción de triclosan mediante el proceso de ozonación. Los niveles con mayor peso en la variable de respuesta son los siguientes:

- **Cge: Nivel menor (1 mg/L)**
- **Tiempo: Nivel mayor (10 minutos)**

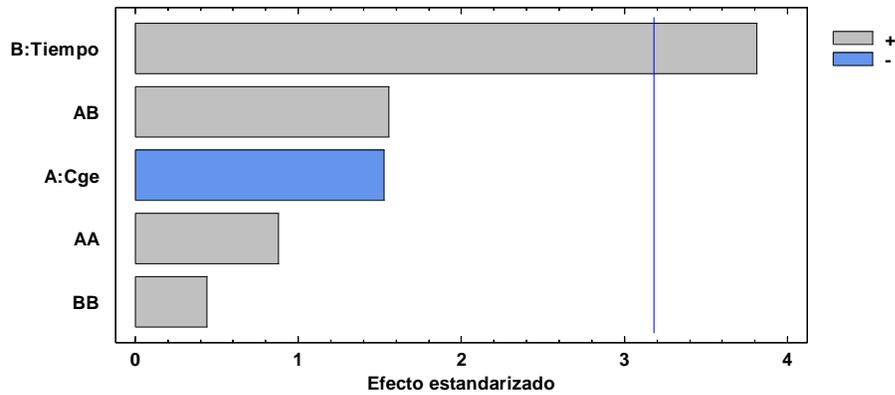


Figura 6.11. Diagrama de Pareto estandarizado para la remoción de triclosan.

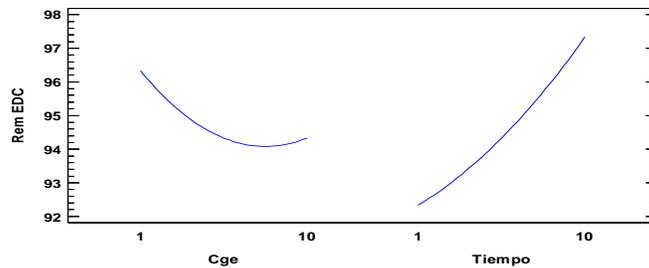


Figura 6.12. Gráfica de efectos principales para la remoción del triclosan.

La ecuación de regresión o modelo matemático que se ha ajustado a los datos y se obtuvo a partir del software es la siguiente:

$$\text{Remoción de triclosan} = 96.608 - 1.10494 \cdot \text{Cge} - 0.0555556 \cdot \text{Tiempo} + 0.0493827 \cdot \text{Cge}^2 + 0.0617284 \cdot \text{Cge} \cdot \text{Tiempo} + 0.0246914 \cdot \text{Tiempo}^2$$

La superficie de respuesta estimada del análisis de varianza se presenta en la Figura 6.13 ilustrando el efecto del Cge y el tiempo sobre la remoción de triclosan, en el que se puede observar como la remoción del compuesto tiende a incrementar a medida que el tiempo es mayor, sin embargo, la eficiencia del tratamiento disminuye con el aumento del Cge. Los mejores valores de los factores evaluados para obtener una máxima remoción de triclosan se muestran en la Tabla 6.12.

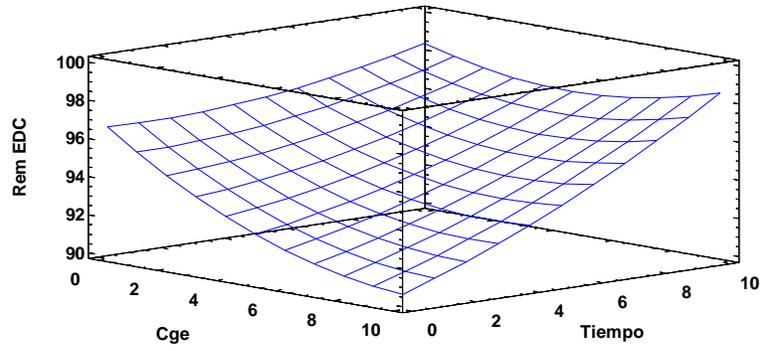


Figura 6.13. Superficie de respuesta estimada de los factores significativos en la remoción de triclosán.

Tabla 6.12. Mejores valores de los factores evaluados para lograr la mayor remoción de triclosán por ozonación.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Cge	1.0	10.0	10.0
Tiempo	1.0	10.0	10.0
			% rem TC = 98.58

6.4.7. Pruebas de ozonación para la remoción de Bisfenol-A

El proceso de ozonación resultó ser favorable en la remoción del Bisfenol-A presente en las muestras de agua fortificadas, obteniendo remociones mayores al 90% que se compara con lo reportado con Deborde *et al.* (2008) y Rocha (2017) quienes reportan una alta eficiencia de remoción de bisfenol-A mediante ozonación. En la Tabla 6.13 se pueden observar los resultados obtenidos en cada una de las pruebas realizadas.

Tabla 6.13. Resultados obtenidos de las pruebas de ozonación para la remoción de Bisfenol-A.

Prueba	Cge (mg/L)	Tiempo (min)	Bisfenol-A		
			Concentración inicial (ng/L)	Concentración final (ng/L)	% Remoción
1	11 ± 0.7	10	777 ± 381	67 ± 11	95 ± 7
2	9.88 ± 1.01	5.5	967 ± 427	182 ± 18	94 ± 13
3	9.4 ± 0.9	1	673 ± 466	72.5 ± 9	92 ± 4
4	1.08 ± 0.32	10	1070 ± 271	131 ± 11	94 ± 11
5	1.32 ± 0.24	5.5	783 ± 260	34.5 ± 26	99 ± 5
6	1.32 ± 0.32	1	1047 ± 233	40.6 ± 4	97 ± 2
7	5.28 ± 0.63	10	723 ± 89	139 ± 17	91 ± 1
8	5.72 ± 0.8	5.5	766 ± 66	105 ± 16	94 ± 10
9	5.28 ± 0.83	1	814 ± 116	136 ± 41	94 ± 2

El análisis de varianza en la remoción de bisfenol-A se muestra en la Tabla 6.14, indica los parámetros más determinantes en el proceso, con un intervalo de confiabilidad del 95%. Se obtiene un $R^2_{aj} = 91.5$, lo cual permite definir que el modelo explica el 91.5% de las variables que afectan la remoción del bisfenol-A. Los factores que poseen un valor-P inferior a 0.05 se consideran como los más importantes a la hora de obtener la máxima eficiencia. En este proceso la interacción Cge y tiempo resultó ser el factor de mayor influencia en la remoción del compuesto.

Tabla 6.14. Análisis de la Varianza para la remoción de Bisfenol-A.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Cge	1.5	1	1.5	4.15	0.1343
B:Tiempo	2.66667	1	2.66667	7.38	0.0727
AA	24.5	1	24.5	67.85	0.0037
AB	2.25	1	2.25	6.23	0.0880
BB	2.0	1	2.0	5.54	0.1000
Error total	1.08333	3	0.361111	$R^2 = 96.81$	
Total (corr.)	34.0	8		$R^2_{aj} = 91.50$	

6.4.8. Efectos de las interacciones entre variables que afectan la remoción de bisfenol-A por ozonación.

En la Figura 6.14, se presenta el diagrama de Pareto estandarizado, en el cual se puede observar de manera esquemática la influencia positiva o negativa de los factores significativos en la variable de respuesta, donde se puede observar que el factor de mayor influencia positiva y que afecta directamente la remoción de bisfenol-A es la interacción entre los niveles del Cge, en la Figura 6.15 se puede observar que a concentraciones de Cge menores la remoción del bisfenol-A es mayor, a un nivel medio de la concentración de Cge la eficiencia de remoción es menor, sin embargo, a niveles altos de Cge se vuelve a incrementar la remoción del compuesto. Es por ello que el factor de mayor influencia en la remoción de bisfenol-A es la interacción entre sus niveles.

Así mismo en la Figura 6.15 se observa que el tiempo de contacto tiene influencia positiva sobre la remoción del compuesto, siendo el nivel medio en el que se tienen mayores remociones. También se puede observar que la interacción entre el Cge y tiempo tiene influencia positiva.

En la Figura 6.15 se presenta el gráfico de efectos principales para la remoción de bisfenol-A mediante el proceso de ozonación. Los niveles con mayor peso en la variable de respuesta son los siguientes:

- **Cge: Nivel bajo (1 mg/L)**
- **Tiempo: Nivel medio (5.5 minutos)**

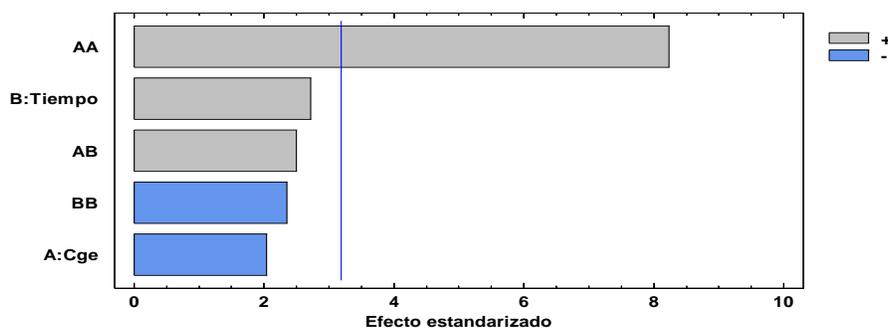


Figura 6.14. Diagrama de Pareto estandarizado para la remoción de Bisfenol-A.

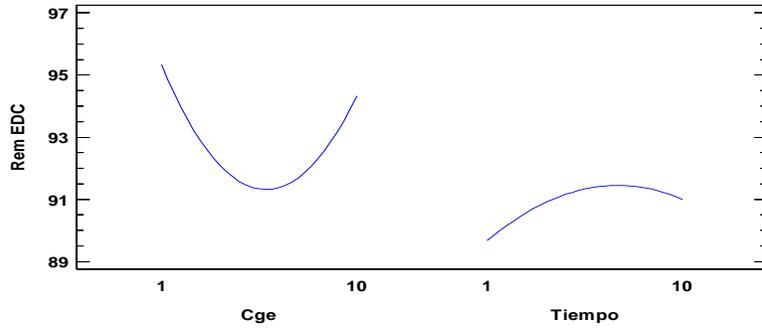


Figura 6.15. Gráfica de efectos principales para la remoción del bisfenol-A.

La ecuación de regresión o modelo matemático que se ha ajustado a los datos y se obtuvo a partir del software es la siguiente:

$$\text{Remoción de bisfenol-A} = 95.9846 - 2.21605 \cdot \text{Cge} + 0.487654 \cdot \text{Tiempo} + 0.17284 \cdot \text{Cge}^2 + 0.037037 \cdot \text{Cge} \cdot \text{Tiempo} - 0.0493827 \cdot \text{Tiempo}^2$$

La superficie de respuesta estimada del análisis de varianza se presenta en la Figura 6.16 ilustrando el efecto del Cge y el tiempo sobre la remoción de bisfenol-A, en el que se puede observar como la remoción del compuesto tiende a incrementar en concentraciones bajas de Cge y a medida que se incrementa el tiempo de contacto la remoción va en aumento. Los mejores valores de los factores evaluados para obtener una máxima remoción de bisfenol-A se muestran en la Tabla 6.15.

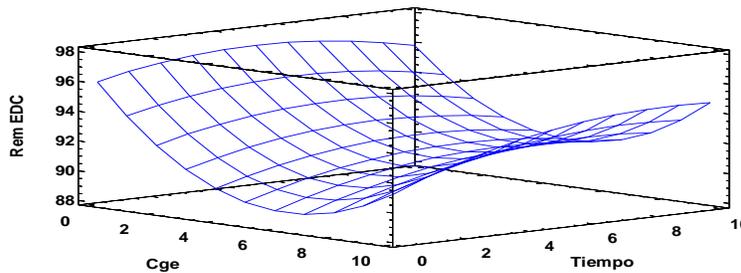


Figura 6.16. Superficie de respuesta estimada de los factores significativos en la remoción de bisfenol-A.

Tabla 6.15. Mejores valores de los factores evaluados para lograr la mayor remoción de bisfenol-A por ozonación.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Cge	1.0	10.0	1.0
Tiempo	1.0	10.0	5.3
% rem BPA = 95.3			

6.4.9. Pruebas de ozonación para la remoción de estrona

El proceso de ozonación resulto ser favorable en la remoción de estrona presente en las muestras de agua fortificadas, obteniendo remociones mayores al 92%. En la Tabla 5.16 se pueden observar los resultados obtenidos en cada una de las pruebas realizadas.

Tabla 6.16. Resultados obtenidos de las pruebas de ozonación para la remoción de estrona.

Prueba	Cge (mg/L)	Tiempo (min)	Estrona		
			Concentración inicial (ng/L)	Concentración final (ng/L)	% Remoción
1	11 ± 0.7	10	835 ± 472	67 ± 31	97 ± 4
2	9.88 ± 1.01	5.5	876 ± 111	182 ± 50	94 ± 2
3	9.4 ± 0.9	1	611 ± 42	72.5 ± 11	98 ± 5
4	1.08 ± 0.32	10	1077 ± 183	131 ± 50	95 ± 2
5	1.32 ± 0.24	5.5	871 ± 196	34.5 ± 10	98 ± 3
6	1.32 ± 0.32	1	1062 ± 160	40.6 ± 22	97 ± 2
7	5.28 ± 0.63	10	473 ± 84	139 ± 30	97 ± 1
8	5.72 ± 0.8	5.5	730 ± 50	105 ± 50	94 ± 3
9	5.28 ± 0.83	1	636 ± 93	136 ± 72	92 ± 3

El análisis de varianza en la remoción de estrona que se muestra en la Tabla 6.17, indica los parámetros más determinantes en el proceso, con un intervalo de confiabilidad del 95%. Se obtiene un $R^2_{aj} = 66.66$, lo cual permite definir que el modelo explica el 66.66% de las variables que afectan la remoción del estrona. Los factores que poseen un valor-P inferior a 0.05 se consideran como los más importantes a la hora de obtener la máxima eficiencia. En este proceso la Cge resulto ser el factor de mayor influencia en la remoción del compuesto.

Tabla 6.17. Análisis de la Varianza para la remoción de estrona.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Cge	0.666667	1	0.666667	10.29	0.0491
B:Tiempo	0.166667	1	0.166667	2.57	0.2071
AA	0.222222	1	0.222222	3.43	0.1612
AB	0.25	1	0.25	3.86	0.1443
BB	0.0555556	1	0.0555556	0.86	0.4228
Error total	0.194444	3	0.0648148	$R^2 = 87.5$	
Total (corr.)	1.55556	8		$R^2_{aj} = 66.66$	

6.4.10. Efectos de las interacciones entre variables que afectan la remoción de estrona por ozonación.

En la Figura 6.17, se presenta el diagrama de Pareto estandarizado, en el cual se puede observar de manera esquemática la influencia positiva o negativa de los factores significativos en la variable de respuesta, donde se puede observar que el factor de mayor influencia y que afecta directamente la remoción de estrona es el Cge, sin embargo, con base en el esquema se puede observar que la influencia de este factor es negativa, lo que se puede visualizar de mejor manera en la Figura 6.18, en donde se observa que a manera que la concentración de Cge aumenta la remoción de estrona es menor. Para el tiempo de contacto se observa que tiene una influencia positiva sobre la remoción del EDC, un incremento de esta variable aumentara el porcentaje de remoción del compuesto (Figura 6.17).

Resultados similares reporto Oliveira *et al* en 2011 quienes evaluaron la remoción de estrona y 17β -estradiol mediante ozonación en el que variaron el Cge de 0.5 a 30 mg O₃/L obteniendo mayores remociones a dosis bajas de ozono que en comparación a dosis altas. En la Figura 6.18 se presenta el gráfico de efectos principales para la remoción de estrona mediante el proceso de ozonación. Los niveles con mayor peso en la variable de respuesta son los siguientes:

- **Cge: Nivel medio (5.5mg/L)**
- **En diTiempo: Nivel mayor (10 minutos)**

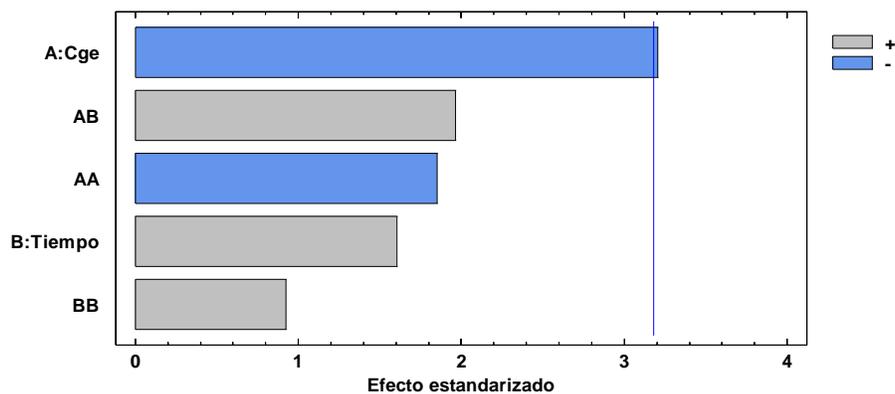


Figura 6.17. Diagrama de Pareto estandarizado para la remoción de estrona.

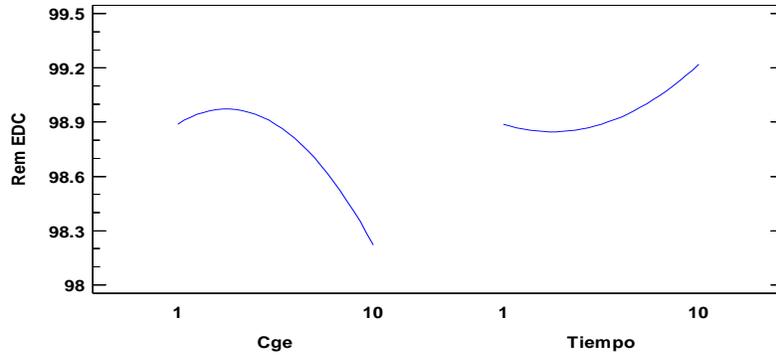


Figura 6.18. Gráfica de efectos principales para la remoción del estrona.

La ecuación de regresión o modelo matemático que se ha ajustado a los datos y se obtuvo a partir del software es la siguiente:

$$\text{Remoción de estrona} = 99.2171 + 0.0390947 \cdot \text{Cge} - 0.121399 \cdot \text{Tiempo} - 0.0164609 \cdot \text{Cge}^2 + 0.0123457 \cdot \text{Cge} \cdot \text{Tiempo} + 0.00823045 \cdot \text{Tiempo}^2$$

La superficie de respuesta estimada del análisis de varianza se presenta en la Figura 6.19 ilustrando el efecto del Cge y el tiempo sobre la remoción de estrona, en el que se puede observar como la remoción del compuesto tiende a incrementar a medida que los factores de experimentación son mayores. Los mejores valores de los factores evaluados para obtener una máxima remoción de estrona se muestran en la Tabla 6.18.

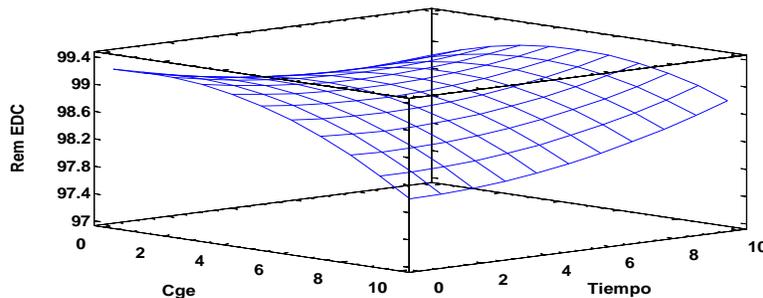


Figura 6.19. Superficie de respuesta estimada de los factores significativos en la remoción de estrona.

Tabla 6.18. Mejores valores de los factores evaluados para lograr la mayor remoción de estrona por ozonación.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Cge	1.0	10.0	4.93
Tiempo	1.0	10.0	10.0
			% rem EST = 99.22

En la Tabla 6.19 se puede observar un resumen de los valores óptimos de los factores aplicados en esta investigación para obtener las máximas remociones de los cinco EDC en estudio, donde se puede observar que a niveles altos de Cge y tiempo de contacto la remoción de los cinco EDC es mayor, a excepción de bisfenol-A y estrona, ya que para su remoción requiere concentraciones más bajas de Cge esto debido a su mayor biodegradabilidad con respecto a los otros EDC.

Tabla 6.19. Condiciones óptimas para la remoción de EDC.

Disruptor endocrino	Cge óptimo (mg/L)	Tiempo de contacto óptimo (Minutos)	% remoción esperado
Nonilfenol	10	19	99.6
4-nonilfenol	10	10	99.1
Triclosan	10	10	98.6
Bisfenol-A	1	5.3	95.3
Estrona	4.9	10	99.2

6.5 Balance masa del proceso de ozonación

Estos resultados se visualizan de una mejor manera a partir del balance de masa realizado en cada una de las pruebas (Tabla 6.20), en el que se observa que a mayor tiempo de contacto y concentración de ozono en la fase gaseosa se tiene una eficiencia de transferencia mayor, lo que se ve reflejado en la remoción de los EDC en estudio, debido a que la transferencia de ozono gas a la fase líquida es mayor, por lo tanto las reacciones entre el ozono y los compuestos es más probable, obteniendo un proceso más eficiente en cuanto a la remoción de estos compuestos. Debido a su carácter electrofílico, el ozono reacciona comúnmente con los anillos aromáticos por sustitución electrófila o de cicloadición 1,3-dipolar (Mvula y Sonntag, 2003). Huang y Shu en 1995 reportaron que la ozonización de las soluciones acuosas de fenol se acompaña de su oxidación a la benzoquinona que se descompone para formar diversos productos, principalmente compuestos carboxílicos, que no tienen actividad estrogénica. Con base en esto, se espera que los mecanismos de ozonización son similares en el caso de los cinco EDC debido a la presencia del grupo fenólico en la estructura molecular de cada uno de los compuestos en estudio, en el que primero se oxidan a sus compuestos intermedios hidroxilados como hidroquinonas, catecoles y dioles, luego benzoquinonas, lo que conduce a la ruptura oxidativa del anillo aromático y que el proceso se lleva a cabo en condiciones poco alcalinas (Anexo A), por lo que el proceso de ozonación se da por acción directa.

Tabla 6.20. Balance de masa del proceso de ozonación para la remoción de EDC.

Prueba	Condiciones de prueba		Balance de masa			
	Cge (mg O ₃ /L)	Tiempo (min)	DOA (mg/L)	DOT (mg/L)	DOC (mg/L)	ET
1	10.96 ± 0.7	10	54.8 ± 3.5	7.7 ± 1.3	5.9 ± 2.7	14.1 ± 2.9
2	9.88 ± 1.0	5.5	27.2 ± 2.8	7.6 ± 3.4	6.3 ± 4.7	29.1 ± 14.7
3	9.40 ± 0.9	1	4.7 ± 0.5	2.9 ± 0.8	2.0 ± 1.1	61.3 ± 19.9
4	1.08 ± 0.3	10	5.4 ± 1.6	1.3 ± 1.3	1.2 ± 1.3	28.6 ± 32.2
5	1.32 ± 0.2	5.5	3.6 ± 0.7	0.4 ± 0.2	0.3 ± 0.2	12.2 ± 6.9
6	1.32 ± 0.3	1	0.7 ± 0.2	0.1 ± 0.03	0.1 ± 0.03	15.1 ± 4.5
7	5.28 ± 0.6	10	26.4 ± 3.2	6.2 ± 5.4	5.6 ± 5.6	22.4 ± 16.8
8	5.72 ± 0.8	5.5	15.7 ± 2.2	3.6 ± 1.4	3.0 ± 0.9	22.6 ± 7.5
9	5.28 ± 0.8	1	2.6 ± 0.4	0.7 ± 0.4	0.6 ± 0.5	26.2 ± 10.7

DOA: Dosis de ozono aplicada; DOT: Dosis de ozono transferido; DOC: Dosis de ozono consumido;
ET: Eficiencia de transferencia

En las siguientes gráficas se muestra de manera más esquemática el balance de masa obtenido en cada una de las pruebas realizadas, en las que se puede observar que cuando se utilizó una concentración de Cge de 10 mg/L (Pruebas 1, 2 y 3) la eficiencia de transferencia del proceso fue mayor en comparación con los otros Cge (1 y 5.5 mg/L), lo que indica que no hay demanda inmediata por parte de los compuestos presentes en las muestras y por lo tanto la eficiencia de transferencia va en aumento a medida que el tiempo es mayor, dando lugar a un saturación del agua, permitiendo así la reacción entre el ozono y los compuestos en estudio, esto debido a que la concentración en la que se encuentran los EDC es muy baja y la demanda de ozono que requieren no es inmediata, lo que ocasiona utilizar altas Cge y tiempos de contacto para llevar a cabo una eficiente remoción de los EDC en estudio así como la disminución de la actividad estrogénica.

Balance de masa de las pruebas de ozonación

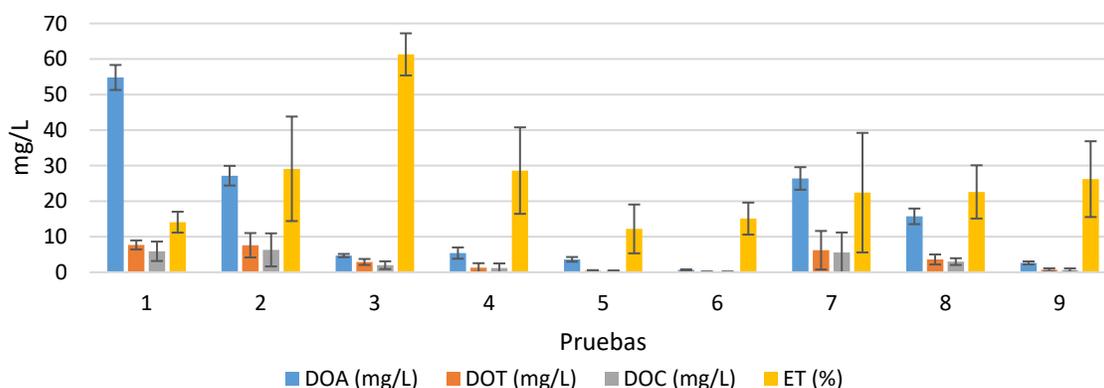


Figura 6.20. Balance de masa de las pruebas de ozono.

7. CONCLUSIONES

El principal aporte de éste trabajo fue proponer metodologías apropiadas que permitan la determinación, así como la estimación de la actividad estrogénica de nonilfenol, 4-nonilfenol, triclosán, bisfenol-A y estrona en agua de pozo destinada al suministro, toda vez que éstos compuestos al estar presentes en agua residual y tratada tienen una alta probabilidad de llegar a los mantos acuíferos por acción de la infiltración. Así mismo, se estudió la aplicación del ozono como tecnología de tratamiento de oxidación avanzada para la remoción de dichos compuestos presentes en el agua.

Tanto las metodologías, como el proceso de tratamiento estudiados redundan, por un lado en un diagnóstico oportuno y adecuado de la presencia de EDC en agua; y por otro, en la remoción eficaz de éstos compuestos. Conforme a los objetivos trazados y de acuerdo a los resultados obtenidos, se presentan las siguientes conclusiones:

- El acoplamiento de dos metodologías BLYES-GC/MS, que regularmente se usan por separado, es aplicable para estimar la actividad estrogénica, detectar y además cuantificar EDC en agua de abastecimiento sin la necesidad de realizar el proceso de extracción de los analitos por separado. Las ventajas del acoplamiento son el ahorro de tiempo del análisis, menor volumen de muestra y de disolventes orgánicos, así como la disminución de insumos y materiales para la extracción, esto contribuye a eficientar ambas metodologías y reducir el impacto al ambiente.
- La aplicación de las metodologías en conjunto (acoplamiento) en muestras de agua de pozo, permitió determinar una concentración por debajo del Límite de Detección de Nonilfenol, 4-nonilfenol, Triclosan, Bisfenol-A y Estrona, así como la ausencia de actividad estrogénica, en el agua de abastecimiento proveniente del pozo de la Facultad de Química del campus Ciudad Universitaria de la UNAM.
- En agua de pozo fortificada con Nonilfenol, 4-nonilfenol, Triclosan, Bisfenol-A y Estrona, la metodología acoplada BLYES-GC/MS fue probada en los compuestos de manera individual y en mezcla, lo que permitió visualizar un comportamiento de inhibición de la actividad estrogénica cuando los EDC se encuentran mezclados, que es la forma en la cual se encontrarán en el ambiente; esto podría ser un factor de interferencia en el diagnóstico.
- El proceso de ozonación es una tecnología eficaz para la remoción de nonilfenol, 4-nonilfenol, triclosán, bisfenol-A y estrona presentes en agua de abastecimiento, obteniendo remociones mayores al 90%.

- La metodología acoplada BLYES-GC/MS es una opción aplicable para evaluar la eficacia del ozono respecto a la remoción y disminución del potencial estrogénico de los EDC en agua.
- Las condiciones de operación para obtener remociones mayores al 98% de nonilfenol, 4-nonilfenol y triclosan son: concentración de ozono en fase gas de 10 mg/L; tiempo de ozonación 10 min
- Las condiciones de operación para obtener remociones mayores al 95% de bisfenol-A, son: concentración de ozono en fase gaseosa de 1 mg/L y un tiempo de contacto de 5.3 minutos.
- Las condiciones de operación para obtener remociones mayores al 99% de Estrona, son: concentración de ozono en fase gaseosa de 4.9 mg/L y un tiempo de contacto de 10 minutos.

8. REFERENCIAS

- Ahel M., Giger W. (1993). Partitioning of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates between water and organic-solvents. *Chemosphere*, 26, 1471–1478.
- Alum A., Yoon Y., Westerhopff P., Abbaszadegan M. (2004). Oxidation of bisphenol A, 17 β -estradiol, and 17 α -ethynyl estradiol and byproduct estrogenicity. *Environmental Toxicology*, 19, 257-264.
- Alder L., Greulich K., Kempe G., Vietth B. (2006). Residue analysis of 500 high priority pesticides: better by GC-MS OR LC-MS/MS?. *Mass Spectrometry Review*, 25, 838-865.
- Alvares A., Parsons S., Diaper C. (2001). Partial oxidation by ozone to remove recalcitrant from wastewaters. *Environmental Technology*, 22, 409-427.
- Alves Q.G., Dayrell F.D., Assis M.G., Fernandes T.F., Pacini M.R., Kuno R., Zanolli S. M. (2017). Investigation of estrogenic activity in groundwater of Sao Paulo State. *Águas subterrâneas*, 31(1), 79-87.
- Anderson P.D., Johnson A.C., Pfeiffer D., Caldwell D.J., Hannah R., Mastrocco F., Sumpter J.P., Williams R.J. (2012). Endocrine disruption due to estrogens derived from humans predicted to be low in the majority of US surface waters. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31, 1407-1415.
- Argemi F., Cianni N., Porta A. (2005). Disrupción endocrina: perspectivas ambientales y salud pública. *Acta bioquímica Clínica Latinoamericana*, 39(3), 291-300.
- Arsenault J.C. (2012). *Beginner's Guide to SPE Solid-Phase-Extraction*, USA: Water Corporation.
- Bader, H., Hoigné J. (1981). Determination of ozone in water by indigo method. *Water research*, 15, 89-112.
- Barceló D., López M.J. (2007). Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. En: Panel Científico- Técnico de seguimiento de la política de aguas. Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales-CSIC. Barcelona, España.
- Beltran F., Gonzalez M., Gonzales J. (1997). Industrial wastewater advanced oxidation part 1, UV radiation in the presence and absence of hydrogen peroxide. *Water Research*, 31(10), 2405-2414.
- Becerril J. (2009). Contaminantes Emergentes en el Agua. En: *Revista Digital Universitaria*, 10(8), 1-7.
- Ben F.S., Teribele N. R., Tizaoui C, Monser L. (2017). Two-Phase Ozonation for the Removal of Estrone, 17 β -Estradiol and 17 α - Ethinylestradiol in Water Using Ozone-Loaded Decamethylcyclopentasiloxane. *Ozone: Science & Engineering*, 1-14
- Berk O.K. (2014). Removal of triclosan from surface waters by ozonation: kinetics & removal mechanism. Tesis de Maestría. Middle East Technical University. Ankara, Turquia
- Bester K. (2003). Triclosan in a sewage treatment process-balances and monitoring data. *Water Research*, 37(16), 3891-3896.
- Bester K. (2005). Fate of triclosan and triclosan-methyl in sewage treatment plants and surface waters. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 49(1), 9-17.

- Bonasea R., Amé M.V., Wunderlin D.A. (2010). Comparación de métodos para la determinación de nonilfenol en muestras ambientales. *Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas*. Ciudad Autónoma de Buenos Aires.
- Brix R., Noguerol T., Piña B., Balam J., Niselen A.J., Tollefsen K., Levy W., Schramm K., Barceló D. (2010). Evaluation of the suitability of recombinant yeastbased estrogenicity assays as a pre-screening tool in environmental samples. *Environment International*, 36, 361–367.
- Calafat A.M., Ye X., Wong L.Y., Reidy J.A., Needham L.L. (2008). Urinary concentrations of triclosan in the US population: 2003-2004. *Environmental Health Perspectives*, 116(3), 303-307.
- Caldwell D.J., Mastrocco F., Anderson P.D., Lange R., Sumpter J.P. (2012). Predicted-no-effect concentrations for the steroid estrogens estrone, 17 β -estradiol, estriol, and 17 α -ethinylestradiol *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31, 1396-1406.
- Carmona P.R., Muñiz A.F. (2014). Contaminación emergente en el Valle del Mezquital. *XXIII Congreso Nacional de Hidráulica*. Puerto Vallarta, Jalisco, México.
- Carnosa R.M. (2008). Desarrollo de metodología analítica para la determinación de triclosán y parabenes. Aplicación al estudio de su distribución y transformación en muestras ambientales. *Memoria para obtener grado de Doctora en Química*. Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela, España.
- Cérpedes R., Petrovic M., Raldúa D., Saura U., Piña B., Lacorte S., Barceló D. (2004). Integrated procedure for determination of endocrine disrupting activity in surface waters and sediments by use of the biological technique recombinant yeast assay and chemical analysis by LC-ESI-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378(3), 697–708.
- Chávez M.A., González T.D., Torner M.F., Jiménez C.B. (2014). Estrategia de operación y configuración de un biorreactor con membrana para la remoción de micro-contaminantes. *IV Congreso Nacional de Membranas, Ciencia, Tecnología y Aplicaciones*. Mérida, Yucatán. 77-89.
- Colborn T., Clement C. (1992). Chemically-Induced Alterations in Sexual and Functional Development: The Wildlife/Human Connection. *Princeton Scientific Publishing Company*, 403.
- Comisión Nacional del Agua (CONAGUA). (2013). *Estadísticas del Agua en México*, Edición 2013.
- Comisión Nacional del Agua (CONAGUA). (2015). Actualización de la disponibilidad media anual de agua en el acuífero Valle del Mezquital (1310), Estado de Hidalgo.
- Companhia Ambiental del estado de Sao Paulo, Brasil (CETESB) (2015). Comunicación personal Daniela Dayrell França.
- Cox C. (1996). Nonylphenol and related chemicals. *Journal of Pesticide Reforme*, 16(1): 15-20.
- Crain D.A., Eriksen M., Iguchi T., Jobling S., Laufer H., LeBlanc G.A., Guillette L.J. (2007). An ecological assessment of bisphenol-A: evidence from comparative biology. *Reproductive Toxicology*, 24(2), 225-239.

- Cruz E.S. (2013). Fármacos y disruptores endócrinos en cuerpos de agua superficial impactadas por descargas de aguas residuales de Tapachula Chiapas, México. *Tesis de Maestría El Colegio de la Frontera Sur*. México, Chiapas.
- Daughton C.G., Ternes T.A. (1999) Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change?. *Environmental Health Perspectives*, 107, 907– 938.
- Dawn P.H. (2015). Estrogenic Activity of Wastewater at Different Stages in Three Activated Sludge Municipal Wastewater Treatment Plants in Central Tennessee. *Thesis Submitted in Partial Fulfillment*. Middle Tennessee State University.
- Deborde M., Rabouan S., Gallard H., Legube B. (2004). Aqueous chlorination kinetics of some endocrine disruptor. *Environ Science Technology*, 38, 5577-5583
- De la Peña., Ducci J., Zamora V. (2013). Tratamiento de aguas residuales en México. *Banco Interamericano de Desarrollo*, 25.
- Díaz T.E., Gibson R., González F.F., Zarco A.E., Mazari H.M. (2013). Endocrine Disruptors in the Xochimilco Wetland, Mexico City. *Water Air Soil Pollut*, 224, 1586.
- Di Dea B.A., Eldridge M., Sanseverino J., Fabriz S.F., Montagner C., Cardoso P.I., Figueiredo J.W., De Aragaño U.G. (2011). Bioluminescent yeast estrogen assay (BLYES) as a sensitive tool to monitor surface and drinking water for estrogenicity. *Journal of Dynamic Environmental Monitoring*, 13, 3288–3293.
- Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 23 de octubre de 2000 por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas.
- Directiva 2003/53/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 18 de junio de 2003 por la que se modifica por vigesimosexta vez la Directiva 76/769/CEE del Consejo respecto a la limitación de la comercialización y el uso de determinadas sustancias y preparados peligrosos (nonilfenol, etoxilatos de nonilfenol y cemento).
- Dougherty J, Swarzenski P, Dinicola R, Reinhard M, (2010). Occurrence of herbicides and pharmaceutical and personal care products in surface water and groundwater around Liberty Bay, Puget Sound, Washington. *Journal of Environmental Quality*. 39, 1173-1180.
- Duran A.J. (2009). Cuantificación de doce contaminantes emergentes, provenientes del agua residual empleada para riego, en suelos del Distrito de Riego 03 “Tula”, Hidalgo. *Tesis de Maestría*. Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF.
- Duran A.J. (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, México, DF.
- Elizalde E., (2003). Desarrollo de la metodología analítica para la determinación de nonilfenoles en el acuífero del Valle de Mezquital, Hidalgo. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. México
- EPA, 1997, <<http://www.epa.gov>> [Consulta: noviembre 2015].
- Esplugas S., Daniele M.B., Krause T.L.G., Dezotti M. (2007). Ozonation and advanced oxidation technologies to remove endocrine disrupting chemicals (EDCs) and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in water effluents. *Journal of Hazardous Materials*, 149, 631–642.

- Estrada A.E., Mantilla M.G., Mijaylova N.P., Ramírez S.N., Moeller C.G., Sánchez Z.M. (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.
- Félix C.T., Durán A.J., Jiménez C.B. (2013). The occurrence and distribution of a group of organic micropollutants in Mexico City's water source. *Science of the Total Environment*, 454-455, 109-118.
- Flint S., Markle T., Thompson S., Wallace E. (2012). Bisfenol A la exposición, los efectos y la política: una perspectiva de la vida silvestre. *Journal Environmental Administrar*, 104, 19-34.
- Gee R.H. (2008) Oestrogenic and androgenic activity of triclosan in breast cancer cells. *Journal of Applied Toxicology*, 28(1), 78-91,
- Gibson R., Becerril B.E., Silva C.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.
- Giesy J.P., Hilscherova K., Jones P.D., Kannan K., Machala M. (2002). Cell bioassays for detections of aryl hydrocarbon (AhR) and estrogen receptor (ER) mediated activity in environmental samples. *Cell Bioassays*, 45, 3-16
- Guedes M.M., Maia B., Dezotti M. (2008). Degradation and estrogenic activity removal of 17 β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol by ozonation and O₃/H₂O₂. *The Science of the Total Environment*, 407, 105-115.
- Gunten U. (2003). Ozonation of drinking water: Part 1. Oxidation kinetics and product formation. Review. *Water Research*, 37 (7), 1443-1467.
- Hernández L. L., Temmink H., Zeeman G., Buisman C.J.N. (2011). Removal of micropollutants from aerobically treated grey water via ozone and activated carbon. *Science Direct*, 45, 2887-2896.
- Huang Y.Q., Wong C.K.C., Zheng J.S., Bouwman H., Barra R., Walhstrom B., Neretin L., Wong M.H. (2012). Bisphenol A (BPA) in China: a review of sources, environmental levels, and potential human health impacts. *Environment International*, 42, 91-99
- Huang C.R., Shu H.Y. (1995). The Reaction Kinetics, Decomposition Pathways and Intermediate Formation of Phenol in Ozonation, UV/O₃ and UV/H₂O₂ Processes. *Journal of Hazardous Materials*, 41, 47-64.
- Huber M., Ternes T.A., Von Gunter U. (2004). Removal of estrogenic activity and formation of oxidation products during ozonation of 17 α -ethinylestradiol, *Environmental Science Technology*, 38, 5177-5186.
- Irmak S., Erbatur O., AKgerman A. (2005). Degradation of 17 β -estradiol and bisphenol-A in aqueous médium by using ozone and ozone/UV techniques. *Journal of Hazardous Materials*, 126, 54-62
- Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (MTA). (2012), Programa de Investigación y Desarrollo Tecnológico del Agua, Horizonte 2030.

- Instituto Mexicano de Tecnología del agua (IMTA). (2007). Sistema de drenaje principal de la Ciudad de México. *Gaceta del IMTA*.
- Joo C.K., Goo K.S., Won K.C., Kwang P.J. (2006). Removal efficiencies of endocrine disrupting chemicals by coagulation/flocculation, ozonation, powdered/granular activated carbón adsorption, and chlorination. *Korean Journal Chemical*, 23(3), 399-408.
- Jiang J.Q., Zhou Z., Sharma V.K. (2013). Occurrence, transpotation, monitoring and treatment of emerging micro-pollutants in waste wáter – A review from global views. *Microchemical Journal*, 110, 292-300.
- Jiménez B. (2008). Water reuse in Latin America and the Caribbean. *Water Reuse: An International Survey on current Practice, issues and needs*, 9, 177-198
- Knepper T, Sacher F, Lange F, Brauch H, Karrenbrock F, Roeden O, Linder K. (1999). Detection of polar organic substances relevant for drinking water. *Waste Management*, 19 (2), 7799.
- Kortenkamp A., Backhaus T., Faust M. (2009) State of the Art Report on Mixture Toxicity. Final Report. Executive Summary. 22 December 2009. Study Contract Number 070307/2007/485103/ETU/D.1.
- Kuster M., López de Alba M.J., Hernando M.D., Petrovic M., Martin A.J., Barcelo D. (2008). Analysis and occurrence of pharmaceutical, estrogens, progestogens and polar pesticide in sewege treatment plant effluents, river wáter and drinking wáter in the Llobregat river basin (Barcelona, España). *Journal Hydrology*, 358, 112-123
- Lavado R., Thibaut R., Raldúa D., Martín R., Porte C. (2004). First evidence of endocrine disruption in feral carp from the Ebro river. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 196(2), 247-257.
- Lesser (2013). Estudios Técnicos de Geohidrología, Calidad del Agua, Tenencia de la Tierra y Aspectos Sociales en la zona de captación para el Sistema Mezquital para el abastecimiento de agua en bloque al Valle de México e Hidalgo. CONAGUA, México, 5.
- Li J., Chen M., Wang Z., Ma M. Peng X. (2011). Analysis of environmental endocrine disrupting activities in wastewater treatment plant effluents using recombinant yeast assays incorporated with exogenous metabolic activation system. *Biomedical and Environmental Sciences*, 24(2), 132–139.
- Liu Z.H.; Kanjo Y., Mizutani S. (2009). Removal mechanisms for endocrine disrupting compounds (EDCs) in wastewater treatment - physical means, biodegradation, and chemical advanced oxidation: a review. *The Science of the Total Environment*, 407(2), 731–748.
- 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 Doctoral*. Universidad Nacional de Educación a Distancia (España). Facultad de Ciencias. Granada, España.
- Marugán J., Bru D., Pablos C., Catalá M. (2012). Comparative evaluation of acute toxicity by *Vibrio fischeri* and fern spore based bioassays in the follow-up of toxic chemicals degradation by photocatalysis. *Journal of Hazardous Materials*, 213-214, 117–122.

- Malato S., Fernández I.P., Maldonado M.L., Blanco J., Gernjak W. (2009). Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: recent overview and trends. *Catalysis Today*, 147(1), 1-59.
- Michałowicz J. (2014). Bisphenol A - Sources, toxicity and biotransformation. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 37(2), 738-758.
- Molina D. (2008). Remoción de nonilfenoles en plantas de tratamiento de aguas residuales en México. Instituto de ingeniería, posgrado en ingeniería ambiental. *Tesis de maestría*. Universidad Nacional Autónoma de México, D.F.
- Montagner C. C., Umbuzeiro G. A., Pasquini C., Jardim W.F. (2014). Caffeine as an indicator of estrogenic activity in source water. *Environmental Science Process and Impacts*, 16, 1866-1869.
- Murk A.J., Legler J., Van Lipzig M.M.H., Meerman J.H.N., Belfroid A.C., Spenkeliink A., Van Der Burg B.; Rijs G.B.J., Vethaak D. (2002). Detection of estrogenic potency in wastewater and surface water with three in vitro bioassays. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(1), 16–23.
- Mvula E., Sonntag C.V. (2003). Ozonolysis of phenols in aqueous solution. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 1, 1749-1756.
- Myers P., Hesler W. (2007). Does ‘the dose make the poison? Extensive results challenge a core assumption in toxicology. *Environmental Health News*. 1-6
- Nguyen M.T., Van D.O., Bovee T.F.H. (2011). Validation of the REA bioassay to detect estrogenic activity in the water cycle. *Toxicology in Vitro*, 25, 2003–2009.
- Noguerol T.N., Boronat S., Jarque S., Barceló D., Piña B. (2006). Detection of hormone receptor ligands in yeast by fluorogenic methods. *Talanta*, 69, 351–358.
- Núñez G.C. (2010). Nuevas metodologías para la determinación de nonilfenol, sus derivados etoxilados y parabenos en muestras medioambientales. Facultad de Ciencias Químicas. *Memoria para obtener grado de doctor*. Madrid, España.
- O’Connor J.C., Chapin R.E. (2003). Critical evaluation of observed adverse effects of endocrine active substances on reproduction and development, the immune system, and the nervous system. *Pure and Applied Chemistry*, 75(11-12), 2099-2123.
- Oller I., Malato S., Sánchez P.J.A. (2011). Combination of Advanced Oxidation Processes and biological treatments for wastewater decontamination--a review. *The Science of the Total Environment*, 409(20), 4141–4166.
- Oliveira P. R., Lopez A. M., Joglar J., Antonio D. L., Barceló. (2011). Identification of new ozonation disinfection of 17 β -estradiol and estrone in water. *Chemosphere*, 84, 1535-1541.
- Peña Á.A., Castillo A.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.
- Ponzo O.J., Silvia C. (2013). Evidence of reproductive disruption associated with neuroendocrine changes induced by UV-B filters, phthalates and nonylphenol during sexual maturation in rats of both gender. *Toxicology*, 311(1-2), 41-51

- PUMAGUA. (2008). Informe Final 2008.
- PUMAGUA. (2009). Informe Final 2009.
- Rahman K.E., Sharfin R.M., Rahnman I. (2015). A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 40(1), 241–258
- Ramírez H.R. (2010). Remoción de nonilfenoles de efluentes biológicos secundarios mediante el acoplamiento de los procesos ozono-filtración en membranas (UF). Instituto de ingeniería, posgrado en ingeniería ambiental. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de México. México D.F.
- Rice R.G. (2002). Century 21 - Pregnant With Ozone. *Ozone: Science & Engineering*. 24,1- 15.
- Rikz. (2001). Estudio químico de bisfenol A. RIKZ / 2001.027. Reporte técnico. Rijksinstituut voor Kust en Zee, Ministerie van Verkeer en Waterstaat, Países Bajos
- Rocha G.B., Lee W.Y. (2012). Determination and comparison of polybrominated diphenyl ethers in primary, secondary, and tertiary wastewater treatment plants. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 92, 1518-1531.
- Routledge, E. J., Sumpter J.P. (1996). Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environ. Toxicol. Chem.* 15:241-248.
- 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 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 del 1 al 4 de julio de 2013.
- Sanchez P.L. (2006) Monitoring the photochemical degradation of triclosan in wastewater by UV light and sunlight using solid-phase microextraction. *Chemosphere*, 65(8), 338-347.
- Sanz, J.I. Lombraña A.L. (2013). Estado del arte en la oxidación avanzada a efluentes industriales: nuevos desarrollos y futuras tendencia. Departamento de Ingeniería Química y del Medio Ambiente, UPV/EHU. *Departamento de Ingeniería Química*, UPV/EHU.
- Sanseverino J., Gupta K.R., Layton C.A., Patterson S.S., Ripp A.S., Saidak L., Simpson L.M., T. Schultz W., Saylor S.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.
- Schultz, T. W., Sinks G.D., Cronin M.T.D. (2000). Effects of substituent size and dimensionality on potency of phenolic xenoestrogens. *Environ. Toxicology Chemical*, 19:2637-2642.
- Schwartz P., Thorpe K.L., Bucheli T.D., Wettstein F.E., Burkhardt H.P. (2010). Short-term exposure to the environmentally relevant estrogenic mycotoxin zearalenone impairs reproduction in fish. *Science of the Total Environment*, 409, 326–333.

- Selma R.M. (2014). Evaluación de la actividad estrogénica (RYA) de aguas contaminadas con compuestos emergentes derivados de la industria del corcho, tratada con Foto-Fenton. *Trabajo de fin de grado*. Departamento de Biotecnología, Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España.
- Sibirny A. A. (2017). *Biotechnology of Yeasts and Filamentous Fungi*. Lviv, Ucrania. Springer International Publishing.
- Silva C. V. (2009). Evaluación de contaminantes emergentes en fuentes de abastecimiento del Valle de Tula. *Tesis de Maestría*. Instituto de Ingeniería UNAM. Ciudad de México, México.
- Sistema de Aguas de la Ciudad de México. (2008). Consultado 25 de noviembre del 2015: [http://www.transparenciamedioambiente.df.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=86%3Afuentes-de-abastecimiento&catid=57%3Aimpactos-en-la-vida-cotidiana&Itemid=415].
- Soares A., Guieysse B, Jefferson B, Cartmell E, Lester JN (2008). Nonylphenol in the environment: a critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environment International*, 34(7), 1033-1049
- Sodré F.F., Locatelli M. Jardim W.F. (2010). Sistema limpo em linha p rrafo extra o em Fase Sólida de Contaminantes Emergentes em Aguas Naturais. *Quimica Nova*, 33, 216-219.
- Soto A.M., Justicia H., Wray J.W., Sonnenschein C. (1991). p-Nonyl-phenol: an estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene. *Environmental Health Perspectives*, 92, 167-173.
- Stuart M., Lapwortha D., Emily Cranea E., Hartb A. (2012). Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater. *Science of the Total Environment*, 416, 1-21.
- Sun J., Wang J., Zhang R., Wei D., Long Q., Huang Y., Xie X., Li A. (2016). Comparison of different advanced treatment processes in removing endocrine disruption effects from municipal wastewater secondary effluent. *Chemosphere*, 168, 1-9.
- Takayanagi S., Tokunaga T, Liu X., Okada H., Matsushima A., Shimohigashi Y. (2006). Endocrine disruptor bisphenol A strongly binds to human estrogen-related receptor γ (ERR γ) with high constitutive activity. *Toxicology Letters*, 167(2), 95-105.
- Tinwel H., Joiner R., Pate I., Soames A., Foster J., Ashby J. (2000). Uterotrophic activity of bisphenol A in the immature mouse. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 32, 118–126
- Toxicology Data Network (TOXNET). (2017). Acceso noviembre 2017. <https://toxnet.nlm.nih.gov/>.
- USEPA (2010). Nonylphenol (NP) and nonylphenol ethoxylates (NPEs) action plan. RIN 2070-ZA09. *United States Environmental Protection Agency*. Washington DC.
- USEPA (2014). EPA 505-F-14-006. Technical fact sheet polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polybrominated biphenyls (PBBs). *Office of Solid Waste and Emergency Response*. Hoja Técnica. Washington, DC, EUA, 1-7
- Umar M., Roddick F., Fan L., Aziz H.A. (2013). Application of ozone for the removal of bisphenol A from water and wastewater – A review. *Chemosphere*, 90, 2197–2207.

- Veldhoen N., Skirrow R., Osachoff H., Wigmore H., Clapson D.J., Gunderson M.P., van Aggelen G., Helbing C.C. (2006). The bactericidal agent Triclosan modulates thyroid hormone-associated gene expression and disrupts postembryonic anuran development. *Aquatic Toxicology*, 80(3), 217-227.
- Vieira D.C., Wegenast G.F., Maia B.D., Sant'Anna J.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 X., Lv Y., Li M., Liu H. (2014). Removal of Nonylphenol from Water by Ozone. *Advanced Material Research*, 859, 357-360.
- Walter J., Weber J.R. (1979). Control de calidad de agua. Procesos fisicoquímicos. Editorial Reverte S. A. España, 210-211.
- Watanabe N., Horikoshi S., Kawabe H., Sugie Y., Zhao, J.; Hidaka, H. (2002). Photodegradation mechanism for bisphenol A at the TiO₂/H₂O interfaces. *Chemosphere*, 52, 851-859.
- Wenzel A., Müller J., Ternes T. (2003). Study on endocrine disrupters in drinking water. *Final Report ENV.D.1/ETU/2000/0083*, Schmollenberg and Wiesbaden, Germany.
- World Health Organization (WHO). (2007). Dioxins and their effects on human health. World Health Organization. Factsheet No. 225. November 2007. Available at: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs225/en/index.html
- Xu L.C., Sun H., Chen J.F., Bian Q., Qian J., Song L., Wang X.R. (2005). Evaluation of androgen receptor transcriptional activities of bisphenol A, octylphenol and nonylphenol in vitro. *Toxicology*, 216(2-3), 197-203.
- Zhang H.Q., Yamada H., Tsuno H. (2008). Removal of endocrine-disrupting chemicals during ozonation of municipal sewage with brominated byproducts control. *Environment Science and Technology*, 42, 3375-3380
- Ziv-Gal A., Craig Z.R., Wang W., Flaws J.A. (2013). Bisphenol A inhibits cultured mouse ovarian follicle growth partially via the aryl hydrocarbon receptor signaling pathway. *Reproductive Toxicology*, 42, 58-67.

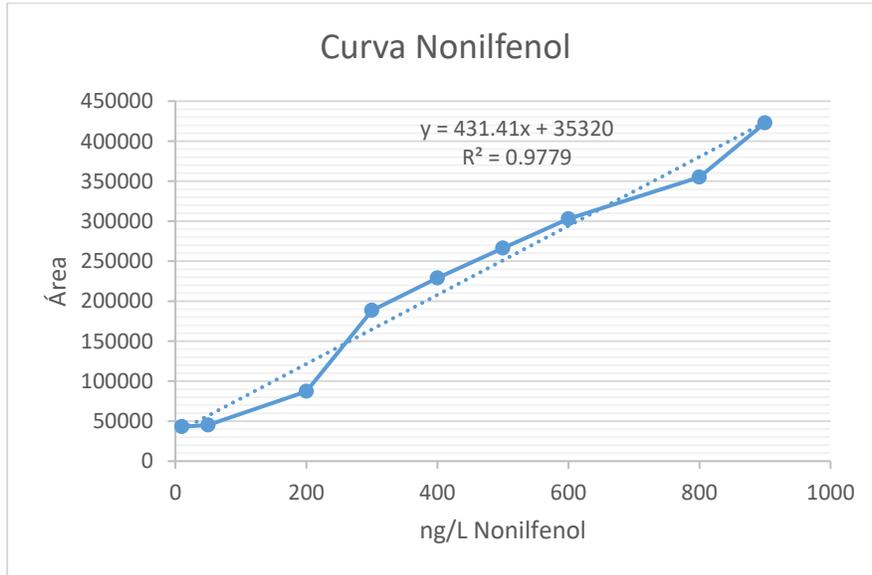
9. Lista de memorias de congreso

- Tecuapa-Flores E., Yañez-Noguez I., Orta de Velásquez M.T. (2017). “Removal of endocrine disruptors with ozone and determination of estrogenic activity by BLYES” en el The 14th IWA Leading Edge Conference on Water and Wastewater Technologies 2017 Florianópolis, Brasil 29 de mayo a 2 de junio del 2017.
- Tecuapa-Flores E., Yañez-Noguez I., Orta de Velásquez M.T. (2017). “Determinación de la actividad estrogénica de disruptores endocrinos presentes en agua de abastecimiento mediante la técnica BLYES” en el 5th IWA México Young Water Professionals Conference 2017 Morelia, México 24 a 26 de mayo del 2017

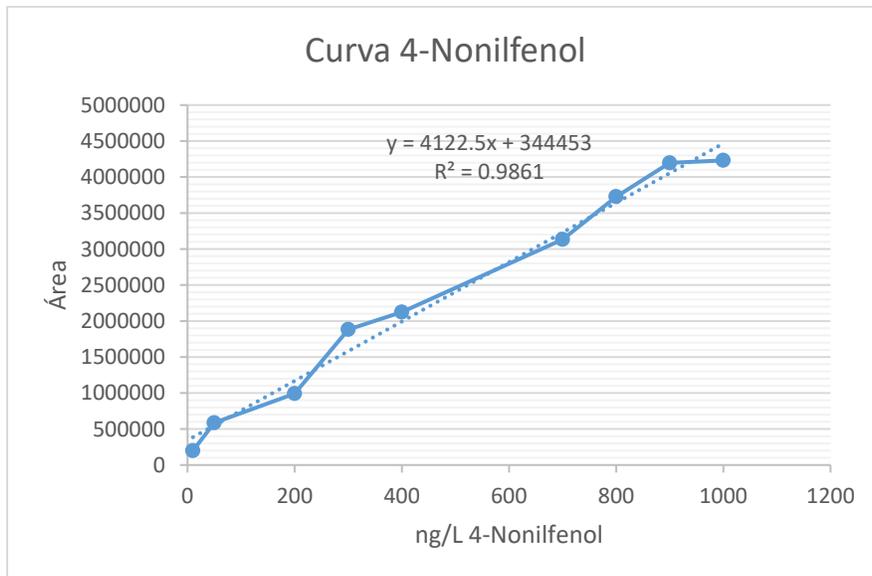
10. ANEXOS

10.1. Anexo A: Curvas de calibración de EDC en estudio

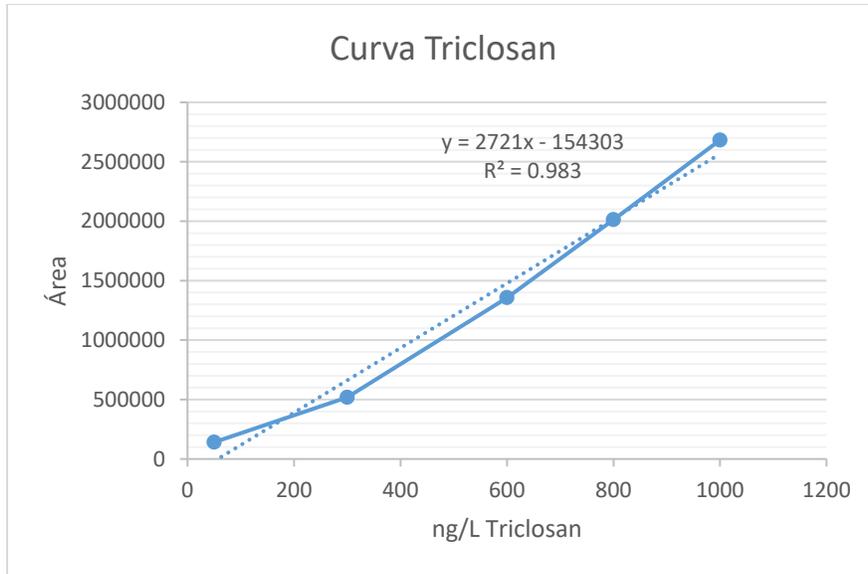
Curvas de calibración de los cinco EDC en estudio para la determinación de su concentración en agua mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.



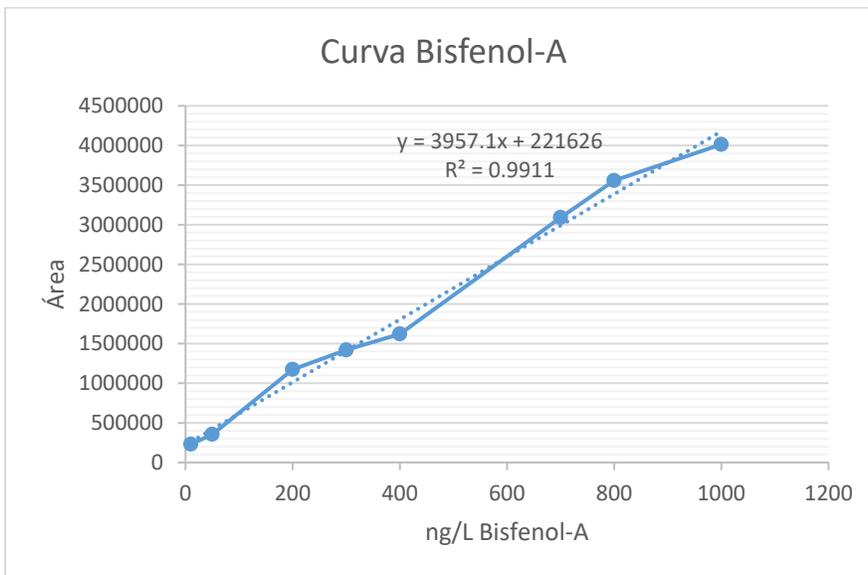
Curva de calibración de nonilfenol mediante GC/MS



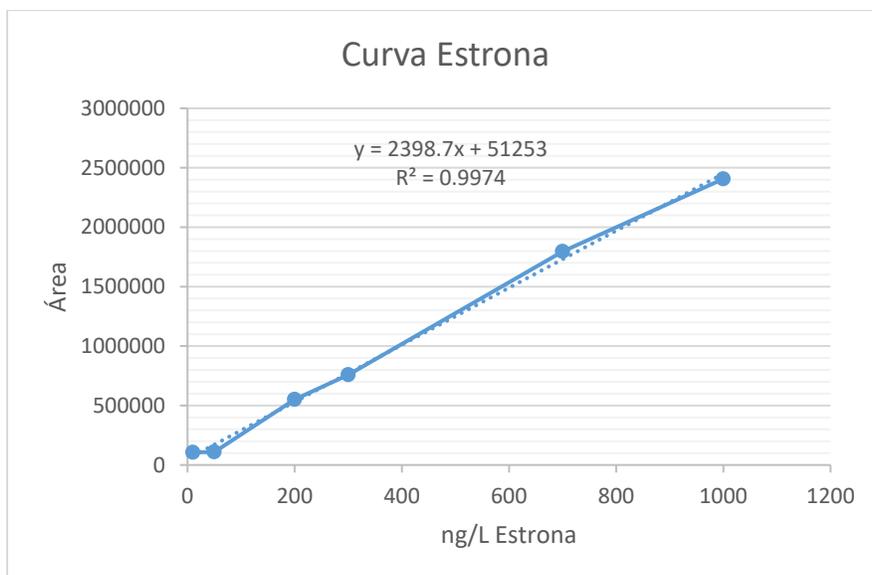
Curva de calibración de 4-nonilfenol mediante GC/MS



Curva de calibración de triclosan mediante GC/MS



Curva de calibración de bisfenol-A mediante GC/MS



Curva de calibración de estrona mediante GC/MS

10.2. Anexo B: Parámetros de calidad del agua

Parámetros medidos durante las pruebas de ozonación

Parámetros de las pruebas de ozonación 1

Prueba	pH		Alcalinidad (mg/L CaCO ₃)		Nitratos (mg/L)	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
1	7.44	8.5	133	337	1.6	0.4
2	7.44	8.22	133	286	1.7	0.4
3	7.44	7.92	133	232	1.5	0.5
4	7.44	8.66	133	366	1.8	0.6
5	7.44	8.25	133	292	1.5	0.6
6	7.44	7.93	133	234	1.6	0.7
7	7.44	8.33	133	306	1.9	0.5
8	7.44	8.12	133	268	1.7	0.5
9	7.44	7.87	133	223	1.6	0.6

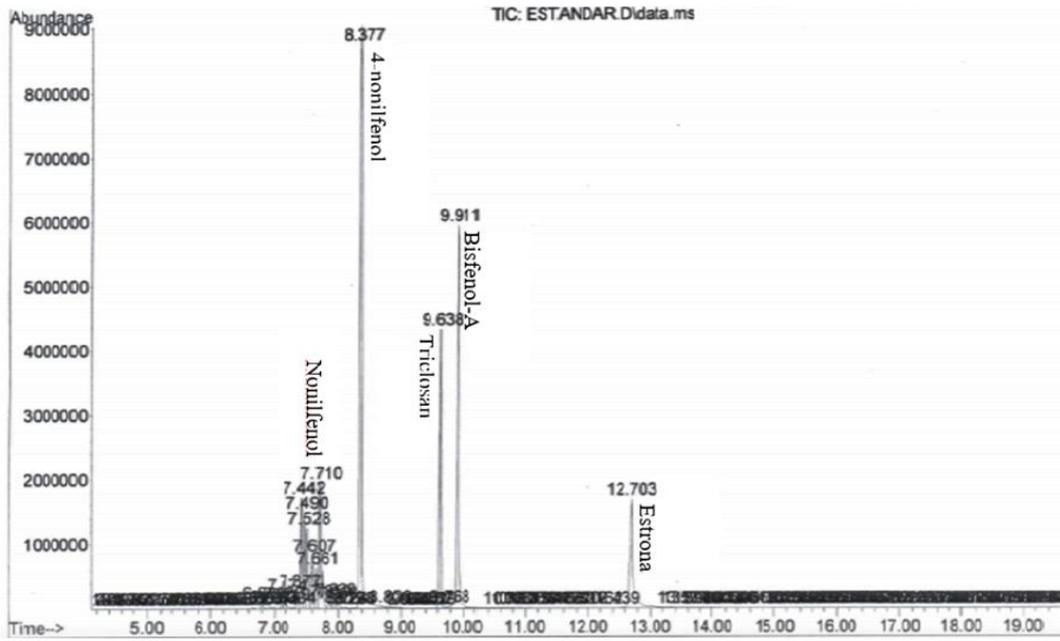
Parámetros de las pruebas de ozonación 2

Prueba	pH		Alcalinidad (mg/L CaCO ₃)		Nitratos (mg/L)	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
1	7.59	8.11	173	267	1.6	0.4
2	7.59	7.92	173	232	1.6	0.4
3	7.59	7.69	173	191	1.6	0.5
4	7.55	8.27	165	296	1.7	0.8
5	7.55	8.16	165	276	1.7	0.8
6	7.55	7.77	165	205	1.7	0.9
7	7.62	8.24	178	290	1.6	0.6
8	7.62	8.07	178	259	1.6	0.6
9	7.62	7.78	178	207	1.6	0.7

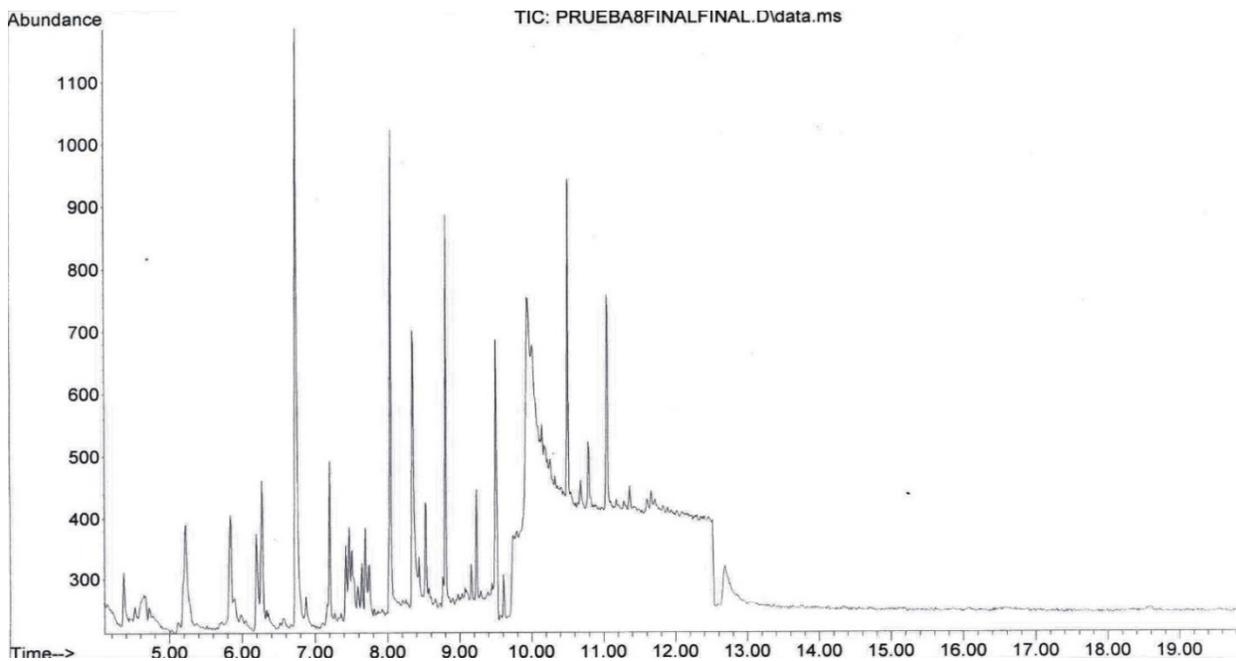
Parámetros de las pruebas de ozonación 3

Prueba	pH		Alcalinidad (mg/L CaCO ₃)		Nitratos (mg/L)	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
1	7.54	8.18	164	279	1.7	0.4
2	7.54	8.02	164	250	1.7	0.4
3	7.54	7.76	164	203	1.7	0.4
4	7.58	8.36	171	312	1.8	0.6
5	7.58	8.22	171	286	1.8	0.6
6	7.58	7.93	171	234	1.8	0.7
7	7.48	8.25	153	292	1.6	0.5
8	7.48	8.06	153	258	1.6	0.5
9	7.48	7.91	153	230	1.6	0.6

10.3. Anexo C: Comparación de los cromatogramas obtenidos antes y después del proceso de ozonación.



Cromatograma de los estándares de referencia de EDC: Nonilfenol, 4-nonilfenol, Triclosan, Bisfenol-A y Estrona usados para la fortificación de la muestra.



Cromatograma de muestra fortificada con: Nonilfenol, 4-nonilfenol, Triclosan, Bisfenol-A y Estrona después del proceso de ozonación.

10.4. Anexo D: Balance de masa

Balance de masa correspondiente a las pruebas de ozonación.

Balance de masa de las pruebas de ozonación 1

Prueba	Inicial			Salida			Ozono residual				Balance de masa			
	mL Na ₂ S ₂ O ₃	Volumen de gas	Cge (mg/L)	mL Na ₂ S ₂ O ₃	Volumen de gas	Cgs (mg/L)	Ab	Am	Vm	Cr	DOA (mg/L)	DOT (mg/L)	DOC (mg/L)	ET
1	8.9	2	10.68	18.5	5	8.88	0.099	0.096	10	0.03	53.40	9	8.97	16.85
2	7.8	2	9.36	6.6	2.75	5.76	0.488	0.474	10	0.13	25.74	9.9	9.77	38.46
3	7.4	2	8.88	0.3	0.5	1.44	0.007	-0.052	10	0.56	4.44	3.72	3.16	83.78
4	0.7	2	0.84	0.6	5	0.29	0.099	0.094	10	0.05	4.20	2.76	2.71	65.71
5	0.9	2	1.08	1	2.75	0.87	0.488	0.481	10	0.07	2.97	0.57	0.50	19.19
6	0.9	2	1.08	0.2	0.5	0.96	0.488	0.486	10	0.02	0.54	0.06	0.04	11.11
7	5	2	6.00	7.3	5	3.50	0.429	0.384	10	0.43	30.00	12.48	12.05	41.60
8	4.6	2	5.52	4.5	2.75	3.93	0.483	0.355	10	1.22	15.18	4.38	3.16	28.85
9	4	2	4.80	0.8	0.5	3.84	0.483	0.449	10	0.32	2.40	0.48	0.16	20.00

Balance de masa de las pruebas de ozonación 2

Prueba	Inicial			Salida			Ozono residual				Balance de masa			
	mL Na ₂ S ₂ O ₃	Volumen de gas	Cge (mg/L)	mL Na ₂ S ₂ O ₃	Volumen de gas	Cgs (mg/L)	Ab	Am	Vm	Cr	DOA (mg/L)	DOT (mg/L)	DOC (mg/L)	ET
1	8.7	2	10.44	18.6	5	8.93	0.474	0.228	10	2.34	52.20	7.56	5.22	14.48
2	7.7	2	9.24	6.7	2.75	5.85	0.474	0.34	10	1.28	25.41	9.33	8.05	36.72
3	7.4	2	8.88	1	0.5	4.80	0.095	0.08	10	0.14	4.44	2.04	1.90	45.95
4	1.2	2	1.44	2.7	5	1.30	0.095	0.083	10	0.11	7.20	0.72	0.61	10.00
5	1.3	2	1.56	1.6	2.8	1.37	0.095	0.057	10	0.36	4.29	0.52	0.16	12.09
6	1.4	2	1.68	0.3	0.5	1.44	0.095	0.092	10	0.03	0.84	0.12	0.09	14.29
7	4	2	4.80	8.5	5	4.08	0.461	0.362	10	0.94	24.00	3.6	2.66	15.00
8	5.5	2	6.60	5.7	2.75	4.97	0.097	0.031	10	0.63	18.15	4.47	3.84	24.63
9	5.2	2	6.24	0.8	0.5	3.84	0.097	0.087	10	0.10	3.12	1.2	1.10	38.46

Balance de masa de las pruebas de ozonación 3

Prueba	Inicial			Salida			Ozono residual				Balance de masa			
	mL Na ₂ S ₂ O ₃	Volumen de gas	Cge (mg/L)	mL Na ₂ S ₂ O ₃	Volumen de gas	Cgs (mg/L)	Ab	Am	Vm	Cr	DOA (mg/L)	DOT (mg/L)	DOC (mg/L)	ET
1	9.8	2	11.76	21.8	5	10.46	0.492	0.195	10	2.83	58.80	6.48	3.65	11.02
2	9.2	2	11.04	10.1	2.5	9.70	0.492	0.208	10	2.70	30.36	3.696	0.99	12.17
3	8.7	2	10.44	1	0.5	4.80	0.492	0.3	10	1.83	5.22	2.82	0.99	54.02
4	0.8	2	0.96	1.8	5	0.86	0.092	0.081	10	0.10	4.80	0.48	0.38	10.00
5	1.1	2	1.32	1.3	2.5	1.25	0.092	0.082	10	0.10	3.63	0.198	0.10	5.45
6	1	2	1.20	0.2	0.5	0.96	0.092	0.089	20	0.01	0.60	0.12	0.11	20.00
7	4.2	2	5.04	9.4	5	4.51	0.092	0.034	10	0.55	25.20	2.64	2.09	10.48
8	4.2	2	5.04	4.5	2.5	4.32	0.092	0.091	10	0.01	13.86	1.98	1.97	14.29
9	4	2	4.80	0.8	0.5	3.84	0.092	0.088	20	0.02	2.40	0.48	0.46	20.00