Tecnología y Ciencias del Agua
ISSN: 0187-8336
revista.tyca@gmail.com
Instituto Mexicano de Tecnología del Agua
México

Vallejo-Rodríguez, Ramiro; Murillo Tovar, Mario A.; Hernández Mena, Leonel; Saldarriaga Noreña, Hugo; López López, Alberto
Compuestos emergentes: implementación de métodos analíticos para extraer y cuantificar 17 B - estradiol, 17 a -etinilestradiol, ibuprofeno y naproxeno en agua
Tecnología y Ciencias del Agua, vol. III, febrero-marzo, 2012, pp. 101-110
Instituto Mexicano de Tecnología del Agua
Morelos, México

Disponible en: http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=353531980007

Cómo citar el artículo
Número completo
Más información del artículo
Página de la revista en redalyc.org

Sistema de Información Científica
Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Compuestos emergentes: implementación de métodos analíticos para extraer y cuantificar 17β-estradiol, 17α-etinilestradiol, ibuprofeno y naproxeno en agua

• Ramiro Vallejo-Rodríguez • Mario A. Murillo-Tovar •
• Leonel Hernández-Mena •
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, México

• Hugo Saldarriaga-Noreña •
Universidad Autónoma de Coahuila, México

• Alberto López-López •
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, México

Resumen

Los métodos implementados permitieron la cuantificación de dos esteroides (17β-estradiol y 17α-etinilestradiol) y dos fármacos (ibuprofeno y naproxeno) utilizando extracción en fase sólida (EFS) y cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de arreglo de diodos (CLAR-DAD). Las condiciones de EFS con cartuchos C_{18} se evaluaron variando los tipos y las cantidades de disolvente de elución, condiciones de pH y la masa de muestra en el cartucho. La eficiencia se evaluó mediante la fortificación de muestras de agua con cantidades conocidas de los analitos en tres niveles de concentración distintos. Las recuperaciones encontradas indican que la eficiencia de los métodos es independiente de la cantidad de analito tratada en el rango de ensayo ($p > 0.05$) con recobros (promedio ± desviación estándar) para 17β-estradiol (86.9% ± 4.2), 17α-etinilestradiol (87.1% ± 6.1), ibuprofeno (89.4% ± 5.3) y naproxeno (85.9% ± 15), que reúnen criterios de aceptación suficientes para el control de calidad de futuras aplicaciones. Por lo tanto, los métodos propuestos son confiables para ser aplicados a muestras acuosas. Sin embargo será necesario probar su desempeño y ajustar sus condiciones cuando se analicen muestras más complejas.

Palabras clave: compuestos emergentes, esteroides, fármacos, extracción en fase sólida, CLAR-DAD.

Introducción

Los compuestos emergentes (CEs) son contaminantes no regulados en su mayoría. Sin embargo, por sus efectos en la salud y su presencia en el ambiente deberán ser normados a mediano o largo plazos, p.e. fármacos, productos de belleza, surfactantes, retardantes de fuego, aditivos industriales, esteroides y hormonas, entre otros. Debido a su riesgo potencial a la salud, específicamente al sistema endócrino, muchos de estos compuestos han sido nombrados Compuestos Disruptores Endócrinos (CDEs); la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA, por sus siglas en inglés) los define como compuestos exógenos que provocan disrupción en el sistema endócrino, fundamentalmente en el sistema reproductivo de los seres vivos. Es tal su importancia, que los CDEs y sus efectos a la

salud y el ambiente se consideraron dentro de las diez investigaciones científicas prioritarias para Estados Unidos (USEPA, 1997).

En particular, el uso cada vez mayor de esteroides sintéticos y productos farmacéuticos tanto en humanos como en animales se está convirtiendo en un nuevo problema ambiental, tanto que se ha incrementado de forma considerable el interés en tener información acerca de su presencia en el medio y sus posibles efectos adversos sobre los humanos y los ecosistemas (Daughton y Ternes, 1999; Heberer, 2002; EEA, 2010; Kümmerer, 2010). Los ambientes, específicamente los acuáticos, presentan diversas vías de contaminación por fármacos y esteroides; tales compuestos se descargan al sistema de alcantarillado a través de la orina y heces fecales, y finalmente van a las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) o directamente a cuerpos de agua superficial. Las bajas eficiencias de las PTAR para degradar este tipo de compuestos derivado de la persistencia de los mismos y de las descargas urbanas e industriales constantes, cuando los efluentes son descargados sin previo tratamiento, son la principal causa de la presencia de estrógenos naturales y sintéticos en cuerpos de aguas superficiales (Alcock *et al*., 1999; Cargouët *et al*., 2004; Desbrow *et al*., 1998; Gomes *et al*., 2010; Peng *et al*., 2008; Vajda *et al*., 2008). Los fármacos más comunes en los efluentes de las PTAR son antibióticos, antiinflamatorios, reguladores de lípidos, antiepilépticos y trazadores de rayos-X (Kümmerer, 2010; Santos *et al*., 2005). La presencia de fármacos en aguas residuales o en efluentes de las PTAR ha sido reportada en diversas investigaciones. Santos *et al*. (2005) encontraron niveles de concentración de 2.6 μg l^{-1} para naproxeno y 84 μg l^{-1} para ibuprofeno en efluentes de las PTAR. Recientemente, Samaras *et al*. (2010) detectaron concentraciones más bajas de 0.574 μg l^{-1} para ibuprofeno en aguas residuales provenientes de un hospital. Por otro lado, Radjenović *et al.* (2009) reportaron concentraciones de ibuprofeno en aguas residuales de 14.6 a 31.3 μg l^{-1}. En el caso de los esteroides, específicamente las hormonas sexuales femeninas y los esteroides sintéticos, considerados como los compuestos estrogénicos más potentes, diversos estudios han reportado concentraciones ambientales muy bajas del orden de ng l^{-1} (Barel-Cohen *et al*., 2006; Belfroid *et al*., 1999; Benotti *et al*., 2010; Chen *et al*., 2007a; Jafari *et al*., 2009; López de Alda y Barceló, 2000; Snyder *et al*., 1999). Hoy en día, el uso generalizado de anticonceptivos orales formulados con estas sustancias, capaces de inducir respuestas estrogénicas en los peces en concentraciones tan bajas como de 1 ng l^{-1}, ha generado preocupación entre los científicos, dadas las consecuencias potencialmente peligrosas sobre el medio acuático (Fent *et al*., 2006; López de Alda y Barceló, 2001, 2000; Nash *et al*., 2004; Nogueira, 2003; Vajda *et al*., 2008).

Dada la peligrosidad que representan estas sustancias para la salud humana, es importante el monitoreo tanto de fármacos como de esteroides en el agua. Para ello se requiere de métodos analíticos robustos que permitan estimar la presencia de dichos compuestos en muestras de agua (López de Alda y Barceló, 2000; Santos *et al*., 2005; Vallejo-Rodríguez y López-López, 2011). La principal problemática para su determinación se origina en los niveles ambientales bajos y en la complejidad química que caracteriza las muestras, ya que estos compuestos son comúnmente encontrados en concentraciones de orden traza (pg l^{-1}, ng l^{-1} o μg l^{-1}), mezclados con distintas sustancias con diferentes propiedades fisicoquímicas que podrían causar interferencias, y dificultar su identificación y cuantificación (Daughton y Ternes, 1999). Entre las distintas alternativas para resolver estas dificultades es posible realizar procedimientos que purifican y concentran la muestra, como la técnica de extracción en fase sólida (EFS), que facilita el aislamiento de los compuestos desde la matriz de la muestra, y su concentración y dilución en un disolvente orgánico (Gibson *et al*., 2007; Mitra, 2003), para su posterior análisis por técnicas de separación, como cromatografía de líquidos con detector ultravioleta (CL-UV) (López de

Alda y Barceló, 2001) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) (Liu *et al.*, 2009). Aunque la cromatografía de líquidos de alta resolución con acoplamiento a espectrometría de masas simple (CLAR-EM) o tándem (CLAR-EM/EM), y la cromatografía de gases-espectrometría de masas CG-EM/EM (Barceló y Petrovic, 2006) son técnicas que disminuyen el tratamiento previo de la muestra debido a que brindan mayor información estructural y por lo tanto menor probabilidad de sesgos en la identificación y cuantificación, su uso, sin embargo, todavía es limitado debido a los costos de mantenimiento y adquisición.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo de investigación fue establecer las condiciones analíticas óptimas para extraer y cuantificar dos esteroides y dos fármacos anti-inflamatorios en muestras acuosas (sin efecto matriz) utilizando la técnica de extracción en fase sólida (EFS) y el análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) con detector de arreglo de diodos (DAD). Los criterios de selección de los compuestos modelos fueron la abundancia en el cuerpo humano y de acuerdo con el uso en formulaciones farmacéuticas de los compuestos. Así, se eligió al 17β-estradiol (E2), que es secretado por los mamíferos, y el 17α-etinilestradiol (EE2), que es el más comúnmente usado en anticonceptivos orales combinados. Ambos contribuyen de manera importante a la estrogenicidad en efluentes de plantas de tratamiento (Chen *et al.*, 2007b; Gunnarsson *et al.*, 2009). También se seleccionaron dos de los fármacos antiinflamatorios (naproxeno e ibuprofeno) más frecuentemente encontrados en el ambiente (agua y suelo) y en plantas de tratamiento (Buszka *et al.*, 2009; Gibson *et al.*, 2010; Mayumi *et al.*, 2011; Nakagawa *et al.*, 2009).

Metodología

Estándares, disoluciones y materiales

Los estándares en polvo de un esteroide natural E2 y uno sintético EE2 (98%), y los fármacos naproxeno e ibuprofeno (98%) se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, Estados Unidos); el fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) de 99% de pureza se adquirió de Sigma (St. Louis, Missouri, Estados Unidos); los disolventes, grado HPLC, acetonitrilo (ACN) y agua se adquirieron de Tedia (Fairfield, Ohio, Estados Unidos); metanol de J.T. Baker (Phillipsburg, New Jersey, Estados Unidos), y acetato de etilo de Burdick & Jackson (Muskegon, Michigan); los cartuchos empacados con 500 mg de C_{18} Strata para extracción en fase sólida (EFS) se obtuvieron de Phenomenex (Torrance, California, Estados Unidos).

Acondicionamiento de los cartuchos

Antes de la extracción, la fase estacionaria C_{18} se acondicionó para minimizar las impurezas y disponer los sitios activos para la interacción con los analitos. Para los esteroides se pasaron 8 ml de ACN, luego 7 ml de metanol y finalmente 5 ml de agua (López de Alda y Barceló, 2000); para los fármacos se emplearon 3 ml de acetato de etilo, después 3 ml de metanol y finalmente 3 ml de agua.

Optimización de las condiciones

El método de adición de estándares se utilizó para optimizar las condiciones analíticas de cada paso. Así, las muestras de agua ultrapura (1 litro), fortificadas con cantidades conocidas de esteroides y fármacos (Sigma-Aldrich), se pasaron a través de columnas empacadas con una fase estacionaria no polar (C_{18}) para extracción en fase sólida (EFS), que permaneció húmeda en todo el proceso. Una vez que se pasó la muestra, la fase se secó al vacío por aproximadamente 25 minutos, posteriormente la masa retenida de los compuestos se eluyó con un disolvente orgánico y el volumen en exceso del extracto se redujo y se aforó a 1 ml. Las muestras de agua con esteroides se pasaron a un flujo de 3.5 ml min^{-1} y una presión de vacío

de 3 pulgadas Hg, y la de fármacos a un flujo de 4.2 ml min^{-1} y a una presión de 4.5 pulgadas Hg; se tuvo la precaución de que la fase sólida permaneciera húmeda durante la extracción. Inicialmente se evaluó la capacidad de adsorción de la fase estacionaria y se ajustó el volumen de elución de los componentes, como lo describen Thurman y Mills (1998); para esto se pusieron 50 µg de los esteroides, 25 µg de naproxeno y 250 µg de ibuprofeno directamente sobre la fase C_{18}, luego se pasaron por gravedad 12 ml de ACN para eluir los esteroides y 5 ml de acetato de etilo y se colectaron en alicuotas de 1 y 2 ml, que se analizaron por separado. Adicionalmente, la extracción de los fármacos se probó a dos condiciones de pH (4.5 y 7.0) para comprobar su efecto en el recobro, como previamente se ha descrito (Costi *et al*., 2008; Santos *et al*., 2005); la acidez del agua utilizada se fijó mediante una disolución amortiguadora de KH_2PO_4 50 mM. Finalmente, se compararon las eficiencias de la reducción del extracto con dos técnicas distintas, se empleó una corriente suave de nitrógeno cromatográfico (INFRA) y un evaporador rotatorio Büchi R-210 (30 rpm) a 40 °C y con una presión de vacío de 5 pulgadas de Hg. Las condiciones óptimas se eligieron mediante la evaluación del recobro, determinado como la señal analítica de cada muestra de prueba, comparada directamente con la señal respectiva en la disolución de referencia.

Evaluación del método analítico

El método de extracción en fase sólida optimizado se aplicó a muestras de agua ultrapura (1 ml), adicionadas con cantidades distintas de cada uno de los compuestos para evaluar la variación de los recobros con el cambio de la masa de analito en disolución. Estas pruebas se realizaron con tres concentraciones diferentes para los esteroides (12.5, 25 y 50 µg l^{-1}), el ibuprofeno (25, 62.5 y 125 µg l^{-1}) y el naproxeno (2.5, 6.25 y 12.5 µg l^{-1}), seleccionadas de reportes previos (López de Alda y Barceló, 2000; Santos *et al*., 2005).

Análisis químico por CLAR-DAD

Las muestras aforadas se analizaron en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (CLAR) Varian ProStar 7725. Se inyectaron 100 µl para los esteroides y 20 µl para los fármacos. La separación de ambas familias de compuestos se efectuó en una columna LiChrospher 100 RP-18 (25 x 4 mm, 5 µm) antecedida por una guarda columna del mismo tipo de empaque con distintas dimensiones (4 x 4 mm, 5 µm) de Agilent Technologies (Waldbronn, Alemania). Los disolventes empleados para preparar la fase móvil se desgasificaron en un baño de ultrasonido Bransonic 5510 MT. Se probaron un par de gradientes de elución para la optimización de la separación de esteroides (cuadro 1) y uno para fármacos (cuadro 2). La detección se realizó con un detector de arreglo de diodos (DAD) Varian ProStar 230 (Walnut Creek, CA); empleando la longitud de onda de máxima absorción (λ máx), 197 nm en el caso de esteroides, y 220 y 230 nm para ibuprofeno y naproxeno, respectivamente (López de Alda y Barceló, 2000; Santos *et al*., 2005). Las curvas de calibración se construyeron mediante la inyección de siete diluciones distintas para los esteroides (0.5 a 50 µg ml^{-1}) y nueve para el naproxeno (0.05 a 25 µg ml^{-1}) y el ibuprofeno (0.5 a 125 µg ml^{-1}). En el rango propuesto, los puntos experimentales de la señal analítica del instrumento, para todos los compuestos, se ajustaron significativamente a un modelo de regresión lineal ($p < 0.05$) con coeficientes de correlación (r) mayores que 0.999.

Resultados y discusión

Selección de disolventes para la elución de esteroides y fármacos

Los resultados mostraron que 10 ml de ACN eluyen el 90% de E_2 y el 82% de EE_2, mientras que 3 ml de acetato de etilo eluyen 94% de naproxeno y 85% de ibuprofeno. Por lo tanto,

Cuadro 1. Gradiente de elución para separar E2 y EE2.

Tiempo (min)	% A	% B
0	10	90
50	100	0
52	100	0

A: ACN; B: agua Milli Q.

Cuadro 2. Gradiente de elución para separar ibuprofeno y naproxeno.

Tiempo (min)	% A	% B	% C
0	0	15	85
4.5	0	15	85
12.5	20	0	80
18	25	0	75
27	45	0	55
45	45	0	55

A: ACN; B: MeOH; C: solución buffer 50 mM KH_2PO_4.

la elución desde la fase estacionaria resultó eficiente y se encuentra dentro de los criterios de aceptabilidad para la optimización de métodos de extracción en fase sólida (Thurman y Mills, 1998) y es consistente con métodos desarrollados previamente para el mismo tipo de matriz (López de Alda y Barceló, 2000; Santos *et al.*, 2005).

Efecto del pH en la eficiencia de recuperación de los fármacos

El pH de las disoluciones se reguló con una solución buffer de KH_2PO_4 para evaluar la extracción de los fármacos a dos distintos valores de pH. Los resultados mostraron que los recobros se incrementan con la disminución del pH; con pH 7.0 se recuperó el 15% del naproxeno y el 24% de ibuprofeno; mientras que con pH 4.5, las eficiencias de recuperación de ambos compuestos se incrementaron cerca del 60% (cuadro 3). El efecto observado se explica por la presencia de sílices trifuncionales-derivatizados en el cartucho C_{18} de EFS utilizado en el proceso de extracción de los analitos. Las fases enlazadas trifuncionales EFS son más estables a pH ácidos, por lo que es un factor a considerar en el aislamiento de compuestos ácidos (Thurman y Mills, 1998); dicha característica se aplicó para realizar el resto de ensayos y optimizar el método para fármacos.

Cuadro 3. Recobro de fármacos a dos valores de pH.

Fármaco	pH 7.0	pH 4.5
	% R (CV)	% R (CV)
Naproxeno	15.1 (28.5)	58.5 (3.8)
Ibuprofeno	23.9 (64.3)	57.8 (2.3)

R: recobro; CV: coeficiente de variación.

Efecto de la técnica de reducción en la eficiencia de recuperación de esteroides y fármacos

La reducción del extracto eluido desde la fase estacionaria se realizó de dos formas: una mediante una corriente suave de nitrógeno grado cromatográfico (99.999%) y la otra utilizando un evaporador rotatorio. Las recuperaciones y reproducibilidad de la determinación de esteroides y fármacos se incrementaron significativamente cuando se utilizó el evaporador rotatorio, como se observa en los cuadros 4 y 5. Este resultado, además de incrementar la confiabilidad del análisis, contribuye a reducir los costos por el uso del nitrógeno de ultra alta pureza y disminuye el tiempo de tratamiento por ml de muestra; mientras que en la reducción en el evaporador rotatorio se invirtieron treinta minutos, con nitrogeno tardó aproximadamente dos horas debido al peso molecular de los disolventes (baja presión de vapor).

Evaluación de la eficiencia de recuperación con condiciones optimizadas

El análisis por duplicado de muestras fortificadas con distintas cantidades de esteroides y fármacos mostró que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los recobros cuando la cantidad de los analitos adicionada cambió. Esto sugiere que la eficiencia del método de extracción y el análisis por CLAR-DAD es independiente de la masa de cada compuesto en la muestra, por lo tanto se puede utilizar un factor de recobro absoluto promedio cuando se determinen en muestras o en ensayos con concentraciones dentro del rango probado (cuadros 6 y 7). Adicionalmente, los resultados encontrados (promedio del recobro ± deviación estándar) para 17β-estradiol (86.9% ± 4.2), 17α-etinilestradiol (87.1% ± 6.1), ibuprofeno (89.4% ± 5.3) y naproxeno (85.9% ± 15) reúnen los criterios de aceptación de métodos propuestos para el control de calidad de las determinaciones de compuestos orgánicos en diferentes tipos de muestras (USEPA, 1999; Shah *et al*., 1992; Taverniers *et al*., 2004).

Conclusiones

Durante la implementación de métodos analíticos para extraer y cuantificar compuestos emergentes, la aplicación de la técnica de extracción en fase sólida (EFS) facilitó la concentración eficiente de la masa de dos esteroides y dos fármacos disueltos en muestras de agua, y su posterior obtención

Cuadro 4. Porcentaje de recuperación de esteroides con dos técnicas de reducción.

Esteroide	% R (CV) con N_2	% R (CV) con rotaevaporador
17-β-estradiol[1]	72.6 (2.4)	89.5 (6.5)
17-α-etinilestradiol[2]	67.7 (0.1)	80.1 (4.3)

[1,2] La prueba se realizó con 50 µg l^{-1}; R: recobro; CV: coeficiente de variación ($n = 2$).

Cuadro 5. Porcentaje de recuperación de los fármacos con dos técnicas de reducción.

Fármaco	%R (CV) con N_2	% R (CV) con rotaevaporador
Ibuprofeno[1]	23.9 (28.4)	94.0 (2.1)
Naproxeno[2]	15.1 (67.3)	93.0 (2.7)

Las pruebas se realizaron con [1-]250 ug l^{-1} y [2-] 25 ug l^{-1}; R: recobro; CV: coeficiente de variación ($n = 2$).

Cuadro 6. Porcentaje de recuperación de esteroides en condiciones optimizadas.

Esteroide	**% R (CV) con rotaevaporador**		
	50 μg l^{-1}	**25 μg l^{-1}**	**12.5 μg l^{-1}**
17-β-estradiol	89.5 (6.5)	89.1 (0.8)	82.0 (4.1)
17-α-etinilestradiol	80.1 (4.3)	91.2 (1.0)	90.1 (4.6)

R: recobro; CV: coeficiente de variación (n = 2).

Cuadro 7. Porcentaje de recuperación de fármacos en condiciones optimizadas.

Fármaco	**% R (CV) con rotaevaporador**		
Ibuprofeno	125 μg l^{-1}	62.5 μg l^{-1}	25 μg l^{-1}
	85.0 (1.0)	95.3 (4.5)	88.0 (5.2)
Naproxeno	12.5 μg l^{-1}	6.25 μg l^{-1}	2.5 μg l^{-1}
	82.4 (3.4)	102.3 (12.1)	72.9 (2.4)

R: recobro; CV: coeficiente de variación (n = 2).

en disolventes orgánicos, también favoreció su detección por cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de arreglo de diodos (CLAR-DAD). Asimismo se mostró que el uso de evaporador rotatorio, en vez de una corriente suave de nitrógeno, contribuye al incremento de los recobros y a la disminución del tiempo del tratamiento de la muestra. Sin embargo, las distintas propiedades químicas de los compuestos dificultaron su extracción simultánea, ya que los recobros de los fármacos se incrementaron significativamente cuando la solución se acidificó. Finalmente, se encontró que la eficiencia y precisión de los métodos cumplen con los criterios de aceptación para ser aplicados a muestras acuosas, independientemente de la cantidad de analito en la muestra en el rango de concentración probado. Por lo tanto, estos métodos son una alternativa de análisis simple que pueden ser utilizados rutinariamente en laboratorios con mínima infraestructura analítica, y se proponen como un antecedente confiable para facilitar la estandarización y validación de métodos de referencia que ayuden a monitorear estos componentes en muestras ambientales con mayor complejidad y efecto matriz, y que favorezcan la implementación de regulaciones en México.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por el financiamiento otorgado para el desarrollo de esta investigación (Proyecto CONACYT-CB-84425), y a Sandra Daniela Bravo (CIATEJ) por el apoyo técnico para la implementación de los métodos analíticos y el manejo del equipo cromatográfico.

Recibido: 15/12/10
Aprobado: 12/10/11

Referencias

ALCOCK, R.E., SWEETMAN, A., and JONES, K.C. Assessment of organic contaminant fate in waste water treatment plants. I: Selected compounds and physicochemical properties. *Chemosphere*. Vol. 38, No. 10, 1999, pp. 2247–2262.

BARCELÓ, D. and PETROVIC, M. Meeting report: LC-tandem MS workshop updates on latest developments and applications. Report on the Second International Workshop on "Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry for Screening and Trace Level Quantitation in Environmental and Food Samples", Barcelona, September 18 and 19, 2006. *Trends in Analytical Chemistry*. Vol. 25, No. 11, 2006, pp. 1043-1044.

BAREL-COHEN, K., SHORE, L.S., SHEMESH, M., WENZEL, A., MUELLER, J., and KRONFELD-SCHOR, N. Monitoring of natural and synthetic hormones in a polluted river. *Journal of Environmental Management*. Vol. 78, No. 1, 2006, pp. 16-23.

BELFROID, A.C., VAN DER HORST, A., VETHAAK, A.D., SCHÄFER, A.J., RIJS, G.B.J., WEGENER, J., and COFINO, W.P. Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronide in surface water and waste water in the Netherlands. *Science of the Total Environment*. Vol. 225, No. 1-2, 1999, pp. 101-108.

BENOTTI, M.J., STANFORD, B.D., and SNYDER, S.A. Impact of Drought on Wastewater Contaminants in an Urban Water Supply. *Journal of Environmental Quality*. Vol. 39, No. 4, 2010, pp. 1196-1200.

BUSZKA, P.M., YESKIS, D.J., KOLPIN, D.W., FURLONG, E.T., ZAUGG, S.D., and MEYER, M.T. Waste-Indicator and Pharmaceutical Compounds in Landfill-Leachate-Affected Ground Water near Elkhart, Indiana, 2000-2002. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. Vol. 82, No. 6, 2009, pp. 653-659.

CARGOUËT, M., PERDIZ, D., MOUASSIMSOUALI, A., KAROLAK, S., and LEVI, Y. Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France). *Science of the Total Environment*. Vol. 324, No. 1-3, 2004, pp. 55-66.

CHEN, J.P., ROSENFELDT, J.E., KULLMAN, W.S., HINTO, E.D., and LINDEN, G.K. Biological assessments of a mixture of endocrine disruptors at environmentally relevant concentrations in water following UV/H2O2 oxidation. *Science of the Total Environment*. Vol. 376, No. 1-3, 2007a, pp. 18-26.

CHEN, C.Y., WEN, T.Y., WANG, G.S., CHENG, H.W., LIN, Y.H., and LIEN, G.W. Determining estrogenic steroids in Taipei waters and removal in drinking water treatment using high-flow solid-phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Science of the Total Environment*. Vol. 378, No. 3, 2007b, pp. 352-365.

COSTI, E.M., GORYACHEVAB, I., SICILIA, M.D., RUBIO, S., and PÉREZ-BENDITO, D. Supramolecular solid-phase extraction of ibuprofen and naproxen from sewage based on the formation of mixed supramolecular aggregates prior to their liquid chromatographic/photometric determination. *Journal of Chromatography A*. Vol. 1210, No. 1-2, 2008, pp. 1-7.

DAUGHTON, C.G. and TERNES, T.A. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environmental Health Perspectives*. Vol. 107, No. 6, 1999, pp. 907-938.

DESBROW, C., ROUTLEDGE, E.J., BRIGHTY, G.C., SUMPTER, J.P., and WALDOCK, M. Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 1. Chemical Fractionation and in Vitro Biological Screening. *Environmental Science & Technology*. Vol. 32, No. 11, 1998, pp. 1549-1558.

EEA. *Technical Report No 1/2010, ISSN 1725-2237. Pharmaceuticals in the environment: Results of an EEA workshop*. Copenhagen: European Environment Agency, 2010.

FENT, K., ESCHER, C., and CAMINADA, D. Estrogenic activity of pharmaceuticals and pharmaceutical mixtures in a yeast reporter gene system. *Reproductive Toxicology*. Vol. 22, No. 2, 2006, pp. 175-85.

GIBSON, R., DURÁN-ALVAREZ, J.C., ESTRADA, L.K., CHÁVEZ, A., and JIMÉNEZ, C.B. Accumulation and leching potential of some pharmaceuticals and potential endocrine disruptors in soils irrigated with wastewater in the Tula Valley, Mexico. *Chemosphere*. Vol. 81, No. 11, 2010, pp. 1437-1445.

GIBSON, R., BECERRIL-BRAVO, E., SILVA-CASTRO, V., and JIMÉNEZ, B. 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*. Vol. 1169, No. 1-2, 2007, pp. 31-39.

GOMES, R.L., SCRIMSHAW, M.D., CARTMELL, E., and LESTER, J.N. The fate of steroid estrogens: partitioning during wastewater treatment and onto river sediments. *Environmental Monitoring and Assessment*. Vol. 175, No. 1-4, 2010, pp. 431-441.

GUNNARSSON, L., ADOLFSSON-ERICI, M., BJÖRLENIUS, B., RUTGERSSON, C., FÖRLIN, L., and LARSSON, D.G.J. Comparison of six different sewage treatment processes-reduction of estrogenic substances and effects on gene expression in exposed male fish. *Science of the Total Environment*. Vol. 407, No. 19, 2009, pp. 5235-5242.

HEBERER, T. Occurrence, Fate, and Removal of Pharmaceutical Residues in the Aquatic Environment: A Review of Recent Research Data. *Toxicology Letters*. Vol. 131, No. 1-2, 2002, pp. 5-17.

JAFARI, A.J., POURKABIREH-ABASABAD, R., and SALEHZADEH, A. Endocrine Disrupting Contaminants in Water Resources and Sewage in Hamadan City of Iran, Iran. *Journal of Environmental Health Science and Engineering* Vol. 6, núm. 2, 2009, pp. 89-96.

KÜMMERER, K. Pharmaceuticals in the environment: sources, fate, effects and risks. *Environmental Science & Pollution Research*. Vol. 17, núm. 2, 2010, pp. 519–521.

LIU, Z., KANJO, Y., and MIZUTANI, S. Removal mechanisms for endocrine disrupting compounds (EDCs) in wastewater treatment-physical means, biodegradation, and chemical advanced oxidation: A review. *Science of the Total Environment*. Vol. 407, No. 2, 2009, pp. 731-748.

LÓPEZ DE ALDA, M.J. and BARCELÓ, D. Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds

considered as endocrine disrupters in water by liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A.* Vol. 892, No. 1-2, 2000, pp. 391-406.

LÓPEZ DE ALDA, M.J. and BARCELÓ, D. Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by fully automated on-line solid-phase extraction —liquid chromatography— diode array detection. *Journal of Chromatography A.* Vol. 911, No. 2, 2001, pp. 203–210.

MAYUMI, A., FUJIO, S., RYO, K., SHIHO, K., DAISUKE, N., SUMIO, G., and GRAEME, A. A Pilot Study of the Water Quality of the Yarra River, Victoria, Australia, Using In Vitro Techniques. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. Vol. 87, No. 5, 2011, pp. 591-596.

MITRA, S. Sample preparation techniques in analytical chemistry. Hoboken, New Jersey: Wiley-Interscience, 2003, 458 pp.

NAKAGAWA, S., MATSUO, H., MOTOYAMA, M., NOMIYAMA, K., and SHINOHARA, R. Behavior of endocrine disrupting chemicals in Johkasou improved septic tank in Japan. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. Vol. 83, 2009, No. 3, pp. 328-333.

NASH, J.P., KIME, D.E., VAN DER VEN, L.T., WESTER, P.W., BRION, F., MAACK, G., STAHLSCHMIDT-ALLNER, P., and TYLER, C.R. Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethynylestradiol causes reproductive failure in fish. *Environmental Health Perspectives.* Vol. 112, No. 17, 2004, pp. 1725-1733.

NOGUEIRA, J.M.F. Desreguladores endócrinos: efeitos adversos e estratégias para monitoração dos sistemas aquáticos. *Química.* Vol. 88, No. 2, 2003, pp. 65-71.

PENG, X., YU, Y., TANG, C., TAN J., HUANG, Q., and WANG, Z. Occurrence of steroid estrogens, endocrine-disrupting phenols, and acid pharmaceutical residues in urban riverine water of the Pearl River Delta, South China. *Science of the Total Environment.* Vol. 397, No. 1-3, 2008, pp. 158-166.

RADJENOVIĆ, J., PETROVIĆ, M., and BARCELÓ, D. Fate and distribution of pharmaceuticals in wastewater and sewage sludge of the conventional activated sludge (CAS) and advanced membrane bioreactor (MBR) treatment. *Water Research*. Vol. 43, No. 3, 2009, pp. 831-841.

SAMARAS, V.G., THOMAIDIS, N.S., STASINAKIS, A.S., GATIDOU, G., and LEKKAS, T.D. Determination of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs in wastewater by gas chromatography-mass spectrometry. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry.* Vol. 90, No. 3-6, 2010, pp. 219-229.

SANTOS, J.L., APARICIO, I., ALONSO, E., and CALLEJÓN, M. Simultaneous determination of pharmaceutically active compounds in wastewater samples by solid phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array and fluorescence detectors. *Analytica Chimica Acta.* Vol. 550, No. 1-2, 2005, pp. 116-122.

SHAH, V.P., MIDHA, K.K., DIGHE, S., MCGILVERY, I., SHELLY, J.P., YAKOBI, A., LAYLOFF, T., VISWANATHAN, C.T., COOK, C.E., MCDOWALL, R.D., PITTMAN, K.A., and SPECTOR, S. Analytical methods validation: Bioavailability, bioequivalence, and pharmacokinetic studies. *Pharmaceutical Research*. Vol. 9, No. 4, 1992, pp. 588-592.

SNYDER, S.A., KEITH, T.L., VERBRUGGE, D.A., SNYDER, E.M., GROSS, T.S., KANNAN, K., and GIESY, J.P., Analytical methods for detection of selected estrogenic compounds in aqueous mixtures. *Environmental Science & Technology.* Vol. 33, No. 16, 1999, pp. 2814-2820.

TAVERNIERS, I., DE LOOSE, M., and BOCKSTAELE, E.V. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Trends in Analytical Chemistry*. Vol. 23, No. 8, 2004, pp. 535-552.

THURMAN, E.M. and MILLS, M.S. *Solid-Phase Extraction: Principles and Practic*e. New York: Wiley Interscience Publication, 1998, 286 pp.

USEPA. Compendium Method TO-13A: Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Ambient Air Using Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS). Second edition. Cincinnati: Center for Environmental Research Information Office of Research and Development U.S. Environmental Protection Agency, January, 1999.

USEPA. *Special Report on Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment and Analysis*. Report No. EPA/630/R-96/012. Washington D.C.: USEPA, 1997.

VAJDA, A.M., BARBER, L.B., GRAY, J.L., LÓPEZ, E.M., WOODLING, J.D., and NORRIS, D.O. Reproductive Disruption in Fish Downstream from an Estrogenic Wastewater Effluent. *Environmental Science & Technology.* Vol. 42, No. 9, 2008, pp. 3407-3414.

VALLEJO-RODRÍGUEZ, R. y LÓPEZ-LÓPEZ, A. Compuestos disruptores endócrinos: identificación y análisis en agua superficial y su degradación utilizando un proceso de oxidación con ozono. *Los retos de la investigación del agua en México*. Oswald-Spring U. (coordinadora). Cuernavaca: UNAM, Centro Regional de Investigaciones Multidisciplinarias, ISBN: 978-3-926979-81-0, 2011, 754 pp.

Abstract

VALLEJO-RODRÍGUEZ, R., MURILLO-TOVAR, M.A., HERNÁNDEZ-MENA, L., SALDARRIAGA-NOREÑA, H. & LÓPEZ-LÓPEZ, A. Emerging compounds: implementation of analytical methods to extract and quantify 17β-estradiol, 17α-ethinylestradiol, ibuprofen and naproxen in water. Water Technology and Sciences *(in Spanish). Vol. III, Special Number TyCA-RETAC, February-March, 2012, pp. 101-110.*

The methods implemented allowed for the quantification of two steroids (17β-estradiol and 17α-ethinylestradiol) and two drugs (ibuprofen and naproxen) using solid phase extraction (SPE) and high performance liquid chromatography (HPLC). SPE conditions with C18 cartridges were evaluated by varying the types and amounts of solvent elution, pH conditions and the mass of the target compound in the cartridge. The efficiency was evaluated by adding water samples with known amounts of analytes in three different concentration levels. The recoveries found indicate that the efficiency of the methods is independent of the amount of analyte mass treated in the range test ($p>0.05$). The recoveries (mean ± standard deviation) for 17β-estradiol (86.9% ± 4.2), 17α-ethinylestradiol (87.1% ± 6.1), ibuprofen (89.4% ± 5.3) and naproxen (85.9% ± 15) sufficiently meet the acceptance criteria for quality control for future applications. While the proposed methods are reliable for aqueous sample applications, when analyzing more complex samples, their performance will need to be tested and the conditions adjusted.

Keywords*: emerging, compounds, steroids, pharmaceuticals compounds, solid phase extraction, HPLC-DAD.*

Dirección institucional de los autores

M.C. Ramiro Vallejo Rodríguez
Dr. Mario A. Murillo Tovar
M.C. Leonel Hernández Mena
Dr. Alberto López López

Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ)
Normalistas 800, Colinas de la Normal
44270 Guadalajara, Jalisco, México
Teléfono: +52 (33) 3345 5200, extensión 1650
Fax: +52 (33) 3345 5200, extensión 1001
rvall75@hotmail.com
mtovar@ciatej.net.mx
lhernandez@ciatej.net.mx
allopez@ciatej.net.mx
alopez103@yahoo.com

Dr. Hugo Saldarriaga Noreña

Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de Coahuila
Venustiano Carranza s/n
25280 Saltillo, Coahuila, México
Teléfono: +52 (844) 4159 534, extensión 112
hsaldarriaga@homail.com