



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA QUÍMICA**



**EVALUAR HORMONAS ESTEROIDES EN AGUAS DEL LAGO  
TITICACA Y POTABLE DE PUNO EMPLEANDO  
CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA**

**TESIS**

**PRESENTADA POR:**

**Bach. SIRLEITH SIOMARA CONDORI CANAZA**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

**INGENIERO QUÍMICO**

**PUNO – PERÚ**

**2022**



## DEDICATORIA

A Dios y a la Santísima Virgen de Candelaria por haberme dado sabiduría, fuerza y voluntad, guiándome por los caminos de mi vida, vencer todo obstáculo y darme salud para lograr mis metas trazadas, además infinita bondad y amor.

A mis padres, Judith Diana Canaza Casquino, Gladys Marisol Canaza Casquino, Braulio Gastulo Condori Coila, a mis hermanos Camila, Betty, Manfrethzz y Paola por el amor y dedicación conmigo y por enseñarme que la esperanza y la fe nos llevan lejos. y también porque siempre están presentes en todo momento que más los necesito.

A mi esposo Edwin Rogelio Segales Zevallos, por haberme apoyado y acompañado, con mucho amor y cariño, en este arduo y feliz camino.

*“La dicha de la vida consta en tener siempre algo que hacer, alguien a quien amar y alguna cosa que esperar”*

**Sirleith Siomara Condori Canaza**



## AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ingeniería Química de la UNA- Puno, a mis profesores por haberme formado en esta carrera profesional tan amplia y completa.

Al Dr. Walter Alejandro Zamalloa Cuba por su amabilidad y asesoramiento compartiendo sus experiencias en el ámbito científico y por la amistad construida a lo largo del tiempo.

Al Dr. Luiz Valdemar Tornisielo. Jefe del Laboratorio de Ecotoxicología del Centro de energía Nuclear para la Agricultura (CENA) de la Universidad de Piracicaba – USP-Brasil. por el apoyo logístico y uso de los equipos de cromatografía.

Al Dr. Franz Zirena Vilca, y la Dra. Magaly Luque Vilca por su valioso apoyo y conocimiento científico en el tema de contaminantes emergentes transmitido en las investigaciones en el área de cromatografía.

Al Ingeniero Químico Fran Lino Talavera, jefe del Laboratorio del Proyecto Binacional Lago Titicaca por su apoyo logístico préstamo de la lancha y equipo para la toma de muestras a la Bióloga Johivi Manuela Hurtado Vizcarra, y a la Ingeniera Químico Cleofe Zulma Mamani Alanoca por su apoyo en la determinación de los parámetros físico-químicos de las aguas y señor Néstor Coyla Suaña, motorista de la lancha

A mis jurados Dra. Edith Tello Palma, Dra. Lidia Ensueño Romero Iruri, Dr. Roger Huanqui Pérez, por sus sabios consejos y sugerencias para el logro de esta investigación

Una vez más agradezco a mis padres, Judith, Gladys y Braulio, pues sin ellos yo no sero nada si no los tuviese a mi lado.

**Sirleith Siomara Condori Canaza**



## ÍNDICE DE GENERAL

**DEDICATORIA**

**AGRADECIMIENTOS**

**ÍNDICE DE GENERAL**

**ÍNDICE DE TABLAS**

**ÍNDICE DE FIGURAS**

**ÍNDICE DE ACRÓNIMOS**

**RESUMEN** ..... 13

**ABSTRACT**..... 14

### **CAPITULO I**

#### **INTRODUCCIÓN**

1.1. OBJETIVOS ..... 17

1.1.1. OBJETIVO GENERAL..... 17

1.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 17

### **CAPITULO II**

#### **REVISIÓN DE LITERATURA**

2.1. MARCO TEÓRICO..... 18

2.1.1. Características del lago Titicaca ..... 18

2.1.2. La bahía interior de Puno ..... 19

2.1.3. Laguna de oxidación de Espinar ..... 19

2.1.4. Fuente de captación de agua Chimú ..... 20

2.1.5. Calidad del agua del lago Titicaca ..... 20

2.1.6. Agua para consumo humano..... 21

2.1.7. Parámetros físico químicos del agua del lago Titicaca y agua de consumo  
..... 21



2.2.	LOS CONTAMINANTES EMERGENTES .....	22
2.3.	EFEECTO ENDOCRINO .....	27
2.3.1.	Disruptor Endocrino (DE).....	27
2.3.2.	Sistema endocrino .....	27
2.4.	IMPACTO POR LAS HORMONAS EN EL MEDIO AMBIENTE .....	28
2.5.	HORMONAS ESTEROIDES .....	30
2.5.1.	Concepto de hormonas.....	30
2.6.	CLASIFICACIÓN DE LAS HORMONAS ESTEROIDES .....	30
2.6.1.	Hormona estrona, E1.....	31
2.6.2.	Hormona 17 $\beta$ -Estradiol.....	31
2.6.3.	Hormona 17 $\alpha$ -Etinilestradiol .....	32
2.6.4.	Propiedades físico-químicos de las hormonas estudiadas.....	36
2.6.4.1.	Concentraciones de hormonas en aguas potables .....	36
2.6.5.	Características químicas de las hormonas estudiadas .....	38
2.6.6.	Degradación de hormonas en el agua .....	41
2.6.7.	Fotodegradación de hormonas .....	42
2.6.8.	Cloración como tratamiento de agua residual y hormonas .....	43
2.7.	METODOLOGÍAS DE EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE HORMONAS ESTEROIDES EN MUESTRAS MÉDIO AMBIENTALES. ....	44
2.7.1.	Análisis de hormonas en agua.....	45
2.7.2.	Extracción de hormonas en fase solida (SPE) .....	46
2.7.3.	Validación del método analítico .....	49
2.8.	ESTUDIOS DE INVESTIGACIÓN DE HORMONAS ESTEROIDES .....	52

### **CAPITULO III**

#### **MATERIALES Y MÉTODOS**

3.1.	MATERIALES .....	60
------	------------------	----



3.1.1. Solventes y reactivos .....	61
3.1.2. Patrones analíticos .....	61
3.2. MÉTODOS .....	62
3.2.1. Muestreo .....	62
3.2.2. Determinación de parámetros físico -químicos de los puntos de muestreo.....	63
3.2.3. Extracción muestras de agua de la bahía interior del lago Titicaca–Puno.....	71
3.2.4. Preparación de la muestra .....	73
3.2.5. Análisis cromatográficos por HPLC–DAD .....	79
3.2.6. ANÁLISIS CUALITATIVA Y CUANTITATIVA .....	82
3.3. METODOLOGÍA DE LA DETERMINACIÓN DE HORMONAS ESTEROIDES EN AGUA DEL LAGO TITICACA – PUNO Y AGUA POTABLE DE LA CIUDAD DE PUNO .....	84
3.3.1 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO .....	84

## **CAPÍTULO IV**

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

4.1. EVALUACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS HORMONAS ESTEROIDES EN MUESTRAS DE AGUA DEL LAGO TITICA Y DE AGUA POTABLE DE LA CIUDAD DE PUNO.....	90
4.1.1. Resultados de concentracion en ng L-1 de las hormonas estudiadas E2, EE1 y E1 .....	90
4.1.2. Comparacion y discusion de resultados de las hormonas estudiadas .....	94
4.2. RESULTADOS DE LOS PARÁMETROS FÍSICO- QUÍMICOS DEL AGUA DEL LAGO TITICACA Y DE CONSUMO DE LA CIUDAD DE PUNO DE LOS 9 PUNTOS DE ESTUDIO.....	102
4.2.1. Medida del pH.....	102
4.2.2. Medida de la temperatura.....	102



4.2.3. Medida del oxígeno disuelto.....	103
4.2.4. Medida de sólidos totales disueltos.....	104
4.2.5. Medida de la salinidad .....	104
4.2.6. Medida de ORP.....	104
4.2.7. Medida de la profundidad .....	105
4.2.8. Medida de la transparencia .....	105
<b>V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>106</b>
<b>VI. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>107</b>
<b>VII. REFERENCIAS.....</b>	<b>108</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>128</b>

**Área** : Gestión Ambiental

**Tema** : Evaluar hormonas esteroides en aguas del lago Titicaca y potable de puno empleando cromatografía líquida de alta eficiencia

**FECHA DE SUSTENTACIÓN:** 11 de febrero de 2022



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 2. 1</b> Concentraciones de hormonas en aguas de Lagos ng L-1 .....	34
<b>Tabla 2. 2</b> Concentraciones de hormonas en aguas subterráneas ng L-1.....	35
<b>Tabla 2. 3</b> Se establecen los valores de diferentes parámetros físico-químicos, bases de datos HSDB (Hazardous Substances.....	36
<b>Tabla 2. 4</b> Excreción diaria ( $\mu\text{g}$ /Per cápita) de esteroides estrógenos en humanos. ....	40
<b>Tabla 3. 1</b> Patrones de hormonas, Pureza, Abastecedor, Origen Formula molecular.....	61
<b>Tabla 3. 2</b> Datos de los puntos de muestreo, coordenadas de monitoreo, ubicación, profundidad y hora. ....	64
<b>Tabla 3. 3</b> Condiciones Cromatográficas del HPLC -DAD para análisis de las hormonas en agua.....	82
<b>Tabla 3. 4</b> Coeficientes de correlación ( $r^2$ ) cromatográfico de : (E1) , 17 $\beta$ - (E2) , 17 $\alpha$ - (EE3) .....	87
<b>Tabla 3. 5</b> Desviación estándar de las hormonas esteroide en estudio .....	89
<b>Tabla 4. 1</b> Concentración de hormonas esteroides en ngL-1 de los nueve (9) puntos de muestreo .....	91
<b>Tabla 4. 2.</b> valores dados por el cromatograma del punto P6.....	93
<b>Tabla 4. 3</b> valores dados por el cromatograma del punto P9.....	93
<b>Tabla 4. 4</b> Coordenadas, Ubicación, hora y Parámetros físico químicos: Medida de la Conductividad Eléctrica en $\mu\text{S}/\text{cm}$ .....	103



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 2. 1</b> Publicaciones en revistas científicas, “Emerging Pollutants” .....	26
<b>Figura 2. 2</b> Estructura química de la hormona estrona .....	31
<b>Figura 2. 3</b> Estructura química de la hormona 17 $\beta$ -estradiol.....	32
<b>Figura 2. 4</b> Estructura química de la hormona 17 $\alpha$ -etinilestradiol. ....	33
<b>Figura 2. 5</b> Diagrama vías de entrada de hormonas esteroides al medio ambiente. ....	41
<b>Figura 2. 6</b> Puntos de ataque del cloro a la hormona 17 $\beta$ -estradiol.....	44
<b>Figura 2. 7</b> Pasos en la extracción de hormonas utilizando cartuchos SPE.....	47
<b>Figura 3. 1</b> Ubicación de la laguna de oxidación – Espinar- Puno	65
<b>Figura 3. 2</b> Toma de agua -Chimu ubicado a orillas del lago Titicaca - Puno .....	65
<b>Figura 3. 3</b> Ubicación de los seis (6) Puntos, toma de muestras de agua de la Bahía interior del lago Titicaca- Puno.....	66
<b>Figura 3. 4</b> Ubicación de los tres (3) Puntos, toma de muestras de agua de la ciudad de Puno .....	67
<b>Figura 3. 5</b> Ecosonda FURUNO FCV-620.....	68
<b>Figura 3. 6</b> Equipo Sonda Multiparamétrica HORIBA .....	69
<b>Figura 3. 7</b> Medidor de turbidez disco SECCHI.....	71
<b>Figura 3. 8</b> Muestreador Vertical de Teflon Niskym de 5L. ....	71
<b>Figura 3. 9</b> Toma de Muestra en Frasco de vidrio ámbar de 600 ml. ....	72
<b>Figura 3. 10</b> Frascos de Vidrio. Ámbar de 600 ml .....	72
<b>Figura 3. 11</b> Coollerd, para traslado de los frascos con muestras de agua .....	72
<b>Figura 3. 12</b> Filtración para eliminar solidos suspendidos .....	73
<b>Figura 3. 13</b> Filtración – pulgas acuáticas punto P5 (frente Hotel San Antonio).....	73
<b>Figura 3. 14</b> Cartuchos de extracción solido liquido Strata Polymeric (SPE).....	74



<b>Figura 3. 15</b> Acondicionamiento de los Cartuchos con Metanol HPLC y Agua Ultrapura .....	74
<b>Figura 3. 16</b> Extracción Solido Liquido en Cartucho SPE. Extracción al Vacío .....	74
<b>Figura 3. 17</b> Embalaje de los Cartuchos (SPE) para traslado (4°C) .....	75
<b>Figura 3. 18</b> Placa de la Universidad de Piracicaba - CENA-USP. Brasil .....	75
<b>Figura 3. 19</b> Laboratorio de Ecotoxicologías donde está ubicado los HPLC .....	76
<b>Figura 3. 20</b> Filtró de Fibra de Vidrio de 0,45 $\mu$ m. cámaras de vacío .....	77
<b>Figura 3. 21</b> Desgasificación. en Ultra – son BRANSON 25 10.....	77
<b>Figura 3. 22</b> Equipo para el lavado de cartuchos con hormonas .....	77
<b>Figura 3. 23</b> Tubos con elución de las hormonas .....	78
<b>Figura 3. 24</b> Secado de solución eluida con flujo de N <sub>2</sub> a 30°C .....	78
<b>Figura 3. 25</b> Dilución del euiliato con alcohol metílico grado HPLC .....	78
<b>Figura 3. 26</b> Soluciones eluidas de las muestras en viales para el HPLC .....	78
<b>Figura 3. 27</b> Muestras patrón de hormonas en estudios.....	80
<b>Figura 3. 28</b> Balanza analítica de 0.0001 $\mu$ g pesada de muestras patrón .....	80
<b>Figura 3. 29</b> Preparación de soluciones con hormonas patrón .....	80
<b>Figura 3. 30</b> Viales con soluciones preparadas para curva de validación .....	80
<b>Figura 3. 31</b> Selección de Columna Optima. Para el HPLC.....	81
<b>Figura 3. 32</b> Columna Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (100 x 3 mm, 3,5 $\mu$ m) de 24 etapas.....	81
<b>Figura 3. 33</b> Flujograma de evaluación las hormonas esteroides .....	83
<b>Figura 3. 34</b> Cromatograma de corrida de solución en Blanco .....	84
<b>Figura 3. 35</b> Cromatograma de corrida solución hormona patrôn. 17 $\beta$ -estradiol E2 ...	85
<b>Figura 3. 36</b> Cromatograma de corrida solución hormona patrón 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2).....	85



<b>Figura 3. 37</b>	Cromatograma de corrida de solución hormona patrón estrona E2 .....	86
<b>Figura 3. 38</b>	Curva de calibración de la 17 $\beta$ - estradiol – (E2).....	88
<b>Figura 3. 39</b>	Curva de calibración de la 17 $\alpha$ - etinilestradiol – (EE2).....	88
<b>Figura 3. 41</b>	Curva de calibración de la estrona (E1) .....	88
<b>Figura 4. 1</b>	Representación gráfica, concentración de hormonas Vs puntos de estudios P6 a P1 agua del lago y P7 a P9 agua de consumo–Puno.....	92



## ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

<b>PCM</b>	:	Organización Superior del Consejo
<b>ONG</b>	:	Organización No Gubernamental
<b>ANA</b>	:	Autoridad Nacional del Agua
<b>MINA M</b>	:	Ministerio del Ambiente
<b>INEI</b>	:	Instituto Nacional de Estadística e Informática
<b>PTAP</b>	:	Planta de Tratamiento de Agua Potable
<b>CE</b>	:	Conductividad Eléctrica
<b>OMS</b>	:	Organización Mundial de la Salud
<b>HPLC</b>	:	Cromatografía Líquido de Alta Eficiencia
<b>CENA</b>	:	Centro de Energía Nuclear para la Agricultura
<b>EDARS</b>	:	Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales
<b>E1</b>	:	estrona
<b>E2</b>	:	17 $\beta$ estradiol
<b>EE2</b>	:	17 $\alpha$ etinilestradiol
<b>ORP</b>	:	Medida de potencial redox



## RESUMEN

La presencia de residuos de hormonas esteroides en el sistema hidrográfico es un problema ambiental crítico y preocupante a nivel mundial, compuestos considerados como disruptores endocrinos. de organismos acuáticos y seres humanos. Este estudio reporta la presencia de residuos de hormonas esteroides en las aguas de la Bahía Interior Lago Titicaca, potable y subterránea (pozo), ciudad de Puno-Perú. Muestras tomadas mes de marzo 2020. La extracción de hormonas de las aguas, se realizó en cartuchos polymerix extracción reversa fase solida (SPE) previamente acondicionadas, la elución se realizó con alcohol metílico grado HPLC, la determinación y cuantificación de hormonas se realizó en el cromatógrafo HPLC- DAD, con una columna Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (100x300mm,3,5,um), del laboratorio de ecotoxicología CENA-USP-Brasil, Los resultados muestran concentraciones máximas de: estrona (E1) 1,56; 17  $\beta$ -estradiol (E2) 2,27; 17  $\alpha$ -etinilestradiol (EE2) 13,88 ng L<sup>-1</sup>, respectivamente estas concentraciones varían en los puntos de monitoreo, y su presencia podría ocasionar efectos eco toxicológicos a la biota acuática endémica que habita esta parte del lago, también afectar la salud de la población humana que consume esta agua. Los parámetros físico-químicos determinados del agua: temperatura de 15,0 a 10°C, pH de 9,06 a 7,95, mv de -140 a - 81, CE de 1,86 a 1,21, OD de 8,99 a 8,11, TDS de 1,19 a 0,773, salinidad de 0,9 a 0,6, ORP de 100 a 281, profundidad de 5,20 a 0,90 m, transparencia de 4 a 0,3 m. los mismos que no tienen mucha variación con estudios anteriores.

**Palabras Claves:** Contaminante emergente, cromatografía liquida, riesgo ambiental, Titicaca



## ABSTRACT

The presence of steroid hormone residues in the hydrographic system is a critical and worrying environmental problem worldwide, compounds considered as endocrine disruptors. of aquatic organisms and humans. This study reports the presence of steroid hormone residues in the waters of the Interior Bay of Lake Titicaca, potable and underground (well), city of Puno-Peru. Samples taken in March 2020. The extraction of hormones from the water was carried out in polymer cartridges, previously conditioned solid phase reverse extraction (SPE), the elution was carried out with HPLC-grade methyl alcohol, the determination and quantification of hormones was carried out in the HPLC-DAD chromatograph, with an Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 column (100x300mm,3.5,um), from the CENA-USP-Brazil ecotoxicology laboratory, the results show maximum concentrations of: estrone (E1) 1.56; 17  $\beta$ -estradiol (E2) 2.27; 17  $\alpha$ -ethinyl estradiol (EE2) 13.88 ng L<sup>-1</sup>, respectively, these concentrations vary in the monitoring points, and their presence could cause ecotoxicological effects to the endemic aquatic biota that inhabits this part of the lake, also affect the health of the human population that consumes this water. The determined physical-chemical parameters of the water: temperature from 15.0 to 10°C, pH from 9.06 to 7.95, mv from -140 to - 81, EC from 1.86 to 1.21, OD from 8 0.99 to 8.11, TDS 1.19 to 0.773, Salinity 0.9 to 0.6, ORP 100 to 281, Depth 5.20 to 0.90m, Transparency 4 to 0.3m. the same ones that do not have much variation with previous studies.

**Keywords:** Emerging contaminant, liquid chromatography, environmental risk, Titic



# CAPITULO I

## INTRODUCCIÓN

Existe preocupación mundial por la contaminación de compuestos emergente en muchos lagos, que son importantes fuentes de agua, considerando que los lagos a veces son drenajes de cuencas hidrográficas y embalses que se ven alterados por cambios en el uso de la tierra y las condiciones ambientales (Sacdal *et al.*, 2020).

Proteger la integridad y la calidad de los recursos hídricos es una de las tareas ambientales más esenciales en la actualidad. Las hormonas se utilizan cada vez más en todo el mundo (N. H. Torres *et al.*, 2021) ; como la hormona 17  $\alpha$ -etinilestradiol (EE2), que es uno de los compuestos de las píldoras anticonceptivas (González *et al.*, 2013), como de ganado y son capaces de interferir con el sistema endocrino en vertebrados e invertebrados (Bovier *et al.*, 2018). Todos estos compuestos se eliminan a través de la orina y las heces humanas en diferentes cantidades, dependiendo de la edad, estado de salud, dieta, estado de gestación de la mujer y también a través del estiércol del animal(González *et al.*, 2020).

Las hormonas como la estrona (E1); 17  $\beta$ -estradiol (E2) son estrógenos endógenos catalizados por las enzimas del citocromo P450 (CYP) que tienen actividad biológica en el hígado, los tejidos, las células diana extrahepáticas(Zhu & Lee, 2005), produciendo metabolitos como hidroxilación de estrógenos con una estructura similar, pero con diferentes efectos fisiológicos después del metabolismo in vivo (Xu *et al.*, 2021).

Se detectaron hormonas de origen natural y sintético en el medio acuático (Sacdal *et al.*, 2020), como estrógenos en cuerpos de aguas continentales, afluentes de los



tratamientos de aguas residuales (Deich *et al.*, 2021), debido a la ineficacia de los tratamientos convencionales (N. H. Torres *et al.*, 2021).

.Trabajos realizados en diversos países del mundo, detectaron residuos de hormonas esteroides en concentraciones del orden de ngL-1 a ugL-1. en aguas superficiales residuales, (Fent *et al.*, 2006) aguas subterráneas y potables (Baronti *et al.*, 2000; Luo *et al.*, 2014).

Por primera vez se estudió la calidad de las aguas de la zona litoral del lago Titicaca en la década 1980. La mayor información disponible de las características físico-químicas y limnológicas de las aguas del lago Titicaca proviene de investigadores de la Universidad de California, IMARPE y de UBC -UNTA; Thomas G. (Desbrow *et al.*, 1998; Northcote *et al.*, 1991).

No hay leyes vigentes sobre los valores máximos permisibles para estas sustancias en diferentes matrices ambientales, (García-Galán *et al.*, 2010; Jelić *et al.*, 2009; Kuster *et al.*, 2009; Marina *et al.*, 2004; Mallick & Kuster, 2010) instituciones internacionales como la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2013) o las agencias de medio ambiente de Estados Unidos y Europa (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 1996), AEMA, respectivamente) mostraron preocupación por este tema.

El Lago Titicaca, sistema de alto valor ecológico que concentra actividades humanas como: piscicultura, turismo, agricultura, transporte, recreación y provee agua para consumo de la ciudad de Puno y otras ciudades, (Dejoux & Iltis, 1992; Gogoi *et al.*, 2018; Ismail *et al.*, 2019; Ley N° 28611, 2005; Omar *et al.*, 2016). No esta ajena a la contaminación por sustancias emergentes.



## **1.1. OBJETIVOS**

### **1.1.1. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar hormonas esteroides en aguas del lago Titicaca y consumo de la ciudad de Puno Empleando Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia.

### **1.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

- Extraer y cuantificar la concentración de hormonas:  $17\ \beta$ -estriol;  $17\ \alpha$ -etinilestradiol y estrona en agua del lago Titicaca y de consumo de la ciudad de Puno utilizando Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia.
- Diferenciar la concentración de residuos de hormonas esteroides en agua del lago y agua de consumo.
- Validar el método de extracción y cuantificación por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia



## CAPITULO II

### REVISIÓN DE LITERATURA

#### 2.1. MARCO TEÓRICO

##### 2.1.1. Características del lago Titicaca

El lago Titicaca es el lago navegable más alto del mundo, ubicado en el altiplano andino en los andes dentro de la meseta del Collao, a una altitud media de 3812 m s, n, m, entre los territorios de Perú y Bolivia, Uno de los 20 lagos más antiguos en la Tierra (3 106 años); Posee un área de 8562 km<sup>2</sup> de los cuales el 56 % (4772 km<sup>2</sup>) corresponden a Perú y el 44 % (3790 km<sup>2</sup>) a Bolivia; su profundidad máxima se estima en 281 m y se calcula su profundidad media en 107 m (PCM, 2014).

Es un ecosistema muy valioso porque constituye una gran reserva de agua que concentra una serie de formas de vida y sostiene a muchas familias”, afirma Eduardo Dios, secretario técnico de la Comisión Multisectorial para la Prevención y Recuperación Ambiental de la Cuenca del lago Titicaca y sus afluentes.

La ONG alemana Global Nature Fund (Goodman, 2012) nombró al Lago Titicaca de Bolivia y Perú "Lago amenazado", debido al grave impacto ambiental que sufre por el vertido de aguas residuales de hogares e industrias, de pesticidas y abonos de la agricultura intensiva que se practica en las orillas, además de los desechos procedentes de la explotación minera, amenazan los medios de vida de más de 2 millones de personas que viven en el área de influencia del lago.

Según ANA (2018) determinó que existen 840 fuentes de contaminación del agua: 562 pasivos ambientales mineros, vertimientos de aguas residuales municipales; 105,



botaderos de residuos sólidos; 14 vertimientos de aguas residuales domésticas; 14 vertimientos de aguas residuales industriales y 22 vertimientos de pasivos.

En la actualidad se ha masificado la crianza de truchas en el lago, estas incorporan materia orgánica, por lo tanto, estas aguas tienen altas concentraciones de compuestos fosforados y nitrogenados que causan la eutrofización acelerada del lago Titicaca (Northcote *et al.*, 1991; PCM, 2014).

### **2.1.2. La bahía interior de Puno**

Ubicada a 15°50'34" S 69°59'43" W, Se encuentra situada en el sureste del Perú, en la provincia de Puno, la cual a su vez forma parte del departamento de Puno, Va desde Capta bla achica hasta Chucuito Tiene una superficie de aproximadamente 589 km<sup>2</sup>, con un volumen de agua de unos 5 mil millones de m<sup>3</sup>, que varía constantemente, especialmente entre el invierno y el verano, (Dejoux & Iltis, 1992), tiene un extensión de 16,1 km<sup>2</sup>, una profundidad media de 2,7 m, es somera y de poco flujo, sufre un proceso de contaminación gradual desde hace más de 30 años con las aguas contaminadas a raíz de las descargas de aguas servidas de la ciudad de Puno con una población, 219, 494 habitantes (INEI, 2017, 2019) y poblaciones ribereñas, sin el tratamiento adecuado, en la actualidad es una cubeta casi colapsada ecológicamente y aún a pesar de ello continúa proveyendo beneficios, abastecimiento de agua potable, riego, pesca, navegación, turismo, y otros tipos de actividades de recreo (pesca deportiva) (Ley N° 28611, 2005; Loza *et al.*, 2016).

### **2.1.3. Laguna de oxidación de Espinar**

La ciudad de Puno cuenta con una laguna de estabilización (Espinar), para el tratamiento de aguas residuales, construida en el año 1972, ubicado a 4,5, km del muelle y Espinar, a orillas de la bahía menor del Lago Titicaca, compuesta por dos lagunas de



estabilización en serie; Laguna primaria anaeróbica de extensión de 13,4 ha, y una profundidad de 2,30 m – laguna secundaria facultativa de extensión de 7,9 ha profundidad de 2,30 m (Figura N°3,1), su diseño inicial para 100 L/s el año 1972, la ciudad de Puno tenía 30,000 habitantes, actualmente el caudal de ingreso promedio de 350 L/s y la población es de 151, 937 (INEI .et al, 2019) , a ello se suma el vertimiento directo de aguas residuales a través de desagües clandestinos por las poblaciones ribereñas, agravada por la falta de mantenimiento y el crecimiento urbano sin ninguna planificación (PCM, 2014).

#### **2.1.4. Fuente de captación de agua Chimú**

La toma de succión se realiza al final del río Huile, que desemboca al Lago Titicaca, Las bombas están instaladas en una estructura de concreto (CAISSON) las cuales bombean el agua cruda para la Planta de Tratamiento de Agua Potable (PTAP) Aziruni (Salcedo- distrito de Puno), (Figura 3-2), La distancia de la laguna de Espinar y la toma de agua para consumo- Chimú es de 13 km.

#### **2.1.5. Calidad del agua del lago Titicaca**

Las aguas del lago Titicaca son límpidas y sólo levemente salobres, con salinidad que van desde 5,2 hasta 5,5 partes por 1000 (Bruciatelli *et al.*, 2014).

Según, Monroy *et al.* (2014), el agua del lago contiene un alto nivel de plomo que tampoco es apto para el consumo humano y encontró mercurio, zinc, cadmio y cobre en cuatro especies de peces del lago Titicaca, cuyos niveles están por encima del permitido para el consumo humano, Las consecuencias por consumir son enfermedades como anemia, problemas intestinales, osteoporosis, problemas mentales, beber esta agua puede ser mortal, Tampoco la pueden usar para asearse, pues provocaría granos en la piel y enrojecimiento de los ojos, como ya se ve en muchos niños.



Muchas promesas, pocas obras: Presidente, el ex presidente Pedro Pablo Kuczynski en el 2017 prometió que su Gobierno invertirá 437 millones de dólares en la construcción de diez (PTAR) y no se vio materializadas las obras, el ex presidente Ollanta Humala tampoco materializo estaos proyectos en su periodo 2011-2016, El presidente de Bolivia Evo Morales en el 2018 prometido 85 millones de dólares de inversión, siguen esperando, el ex presidente Martin Viscarra en el 2020 firmo contratos para (PTAR), un anhelo de los ciudadanos de la región sur del país y sus 7 provincias, pero ninguna de estas hará el tratamiento de residuos de contaminantes persistentes ni emergentes.

#### **2.1.6. Agua para consumo humano**

El acceso al agua potable es fundamental para la salud, uno de los derechos humanos básicos y un componente de las políticas eficaces de protección de la salud, nacional, regional y local, debe cumplir las características físicas – químicas y bacteriológicas en las condiciones de normatividad vigente, apta para el consumo humano, características físicas no tener olor ni sabor, no tener materia en suspensión ni en disolución, no contener microorganismos y patógenos, Características químicas, pH neutro, ebullición 100°C y congelación 0°C.

#### **2.1.7. Parámetros físico químicos del agua del lago Titicaca y agua de consumo**

Lazzaro & Gamarra *et al.* (2014), brindan valiosa información limnológica de las aguas superficiales del lago Titicaca obtenida por IMARPE entre los años 2006 y 2012 . Esta información es importante para los especialistas interesados en conocer la calidad del agua del lago Titicaca y, por tanto, su “estado de salud” para beneficio del bienestar regional. Ambos autores señalan que la temperatura del agua del Lago osciló entre 10,9 °C (julio 2007) y 17,3 °C (diciembre 2012). El oxígeno disuelto vario de 4,21 mg L<sup>-1</sup> (abril 2010) y 8,85 mgL<sup>-1</sup> (diciembre 2012). El oxígeno disuelto vario de 4,21 mg L<sup>-1</sup> (abril 2010) y 8,85 mg L<sup>-1</sup> (diciembre 2007). El pH del agua vario entre 7,86 y 8,99, es



decir con una tendencia alcalina. La conductividad eléctrica oscilo entre 1,200 uS cm<sup>-1</sup> (abril 2007) y 1,994 uS cm<sup>-1</sup> (diciembre 2012) , Potencia de oxidación Reducción (ORP) 95,9 a 67,5.datos validados por (Moreno Terrazas *et al.*, 2021). Cahui Galarza (2018) reporta valores de: Temperaturas 13,0 a 16,6°C; pH de 7,6 a 7,3; 547 Oxígeno disuelto (OD) de 5,8 a 5,9 mg/L; Conductividad Eléctrica (CE) de 2636,4 a 1300, 9 548 μS/cm; Solidos Totales Disueltos SDT de 1284,2 a 847,3 mg/L; Salinidad de 0,9 a 0,6 g/L; 549 Potencia de oxidación Reducción (ORP) 95,9 a 67,5. (Farfán et al ., 2015), reporta valores de temperatura de 14,8 a 18,4°C; pH de 8,25 a 8,47; Profundidad 2,50 a 546 20 m.

## 2.2. LOS CONTAMINANTES EMERGENTES

El término de contaminantes emergentes (CE) se refiere a compuestos de distinto origen y naturaleza química, cuya presencia en el medio ambiente no se considera significativa en términos de distribución y/o concentración, por lo que pasan inadvertidos; no obstante, ahora están siendo ampliamente detectados y tienen el potencial de acarrear un impacto ecológico, así como efectos adversos sobre la salud (Farré *et al.*, 2008; Stuart *et al.*, 2012).

La European Comisión (2013) define a los contaminantes emergentes como “contaminantes que en la actualidad no está incluidos en los programas de seguimiento sistemático en la Unión, pero que suponen un importante riesgo, lo cual exige su regulación, dependiendo de sus posibles efectos eco toxicológicos y toxicológicos, y de sus niveles en el medio acuático

La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 1996), define un contaminante emergente como un compuesto químico o un material que se caracteriza porque se percibe como un peligro



potencial o real para la salud humana o el medio ambiente o no están establecidos sus efectos sobre la salud (Jurado *et al.*, 2012).

Se ha establecido que estos compuestos entran en el ambiente a través de algunas fuentes y vías, tales como aguas residuales de tipo doméstico e industrial, de los residuos de las plantas de tratamiento (Worrall *et al.*, 2002), de los efluentes hospitalarios (Kümmerer, 2001), de las actividades agrícolas y ganaderas (L. B. Christiansen, 2002), y de los tanques sépticos (Costanzo *et al.*, 2010; Kocher *et al.*, 2003; Swartz, 2006) los cuales contienen un gran número de componentes orgánicos específicos y CEs que se producen a diferentes concentraciones en las aguas superficiales, cuyos criterios de calidad ambiental aún no se han podido especificar (Eggen *et al.*, 2010; Kastelan & Korsic, 2007), y las plantas de tratamiento convencionales de aguas residuales no están diseñadas para eliminarlos (Brown *et al.*, 2001; Caldwell *et al.*, 2012; Winkler *et al.*, 2007), motivo de preocupación científica y para las entidades ambientales reguladoras (Eggen *et al.*, 2010; Kastelan & Korsic, 2007).. Se consideran emergentes debido a que no se encuentran aún regulados, o están siendo sometidos a un proceso de regulación (Kuster *et al.*, 2004).

En los últimos años, los denominados contaminantes emergentes (microcontaminantes) han despertado un notable interés, cuya presencia y consecuencias en el medio ambiente han pasado inadvertidas, Están presentes en aguas en bajas concentraciones – de ngL-1 a µgL-1 y son considerados muy perjudiciales para la salud humana y el medio ambiente, ya que pueden causar diversos efectos en los organismos, tales como toxicidad crónica, disrupción endocrina y bioacumulación, Podrían afectar la salud humana causando pérdida de coeficiente intelectual y muchas otras discapacidades intelectuales y conductuales, así como obesidad, diabetes e infertilidad.



Además, una de las razones por las que estos compuestos han sido considerados sustancias prioritarias es que se ha descubierto que, además de ser tóxicos para el medio, pueden producir cambios en el desarrollo, comportamiento o reproducción de organismos vivos por ser compuestos que pueden comportarse como hormonas (Guedes *et al.*, 2017).

Estas razones han provocado que la investigación acerca de los contaminantes emergentes sea considerada prioritaria para diversos organismos internacionales de salud pública y cuidado del medio ambiente como la Agencia de Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos (US-EPA), la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2013) o la Comisión (Farré *et al.*, 2008).

El principal interés de los organismos internacionales es conocer pormenorizadamente las características, efectos y transporte de los contaminantes emergentes en el medio ambiente para poder realizar reglamentaciones adecuadas a los diferentes compuestos existentes en los distintos compartimentos ambientales. En este sentido, algunas organizaciones como la Comisión Europea han elaborado listas de vigilancia de compuestos (denominadas Watch Lists en inglés), las cuales recogen un máximo de 10 compuestos o familias de compuestos similares que deben ser vigilados y de los que se deben recabar la mayor cantidad de datos posibles sobre su presencia, efectos y propiedades (Amankwaah *et al.*, 2014).

Debido al carácter eminentemente antropogénico de los contaminantes emergentes, las fuentes de emisión de éstos al medio hay que buscarlas en las fuentes de desechos humanas, Estas fuentes pueden ser puntuales, cuando se conoce el lugar donde se produce el vertido, o difusas, más difíciles de detectar y controlar y normalmente ligadas a actividades humanas como la agricultura y la ganadería (Johnson *et al.*, 2008) (Johnson *et al.*, 2008). De entre las fuentes puntuales, las estaciones depuradoras de aguas

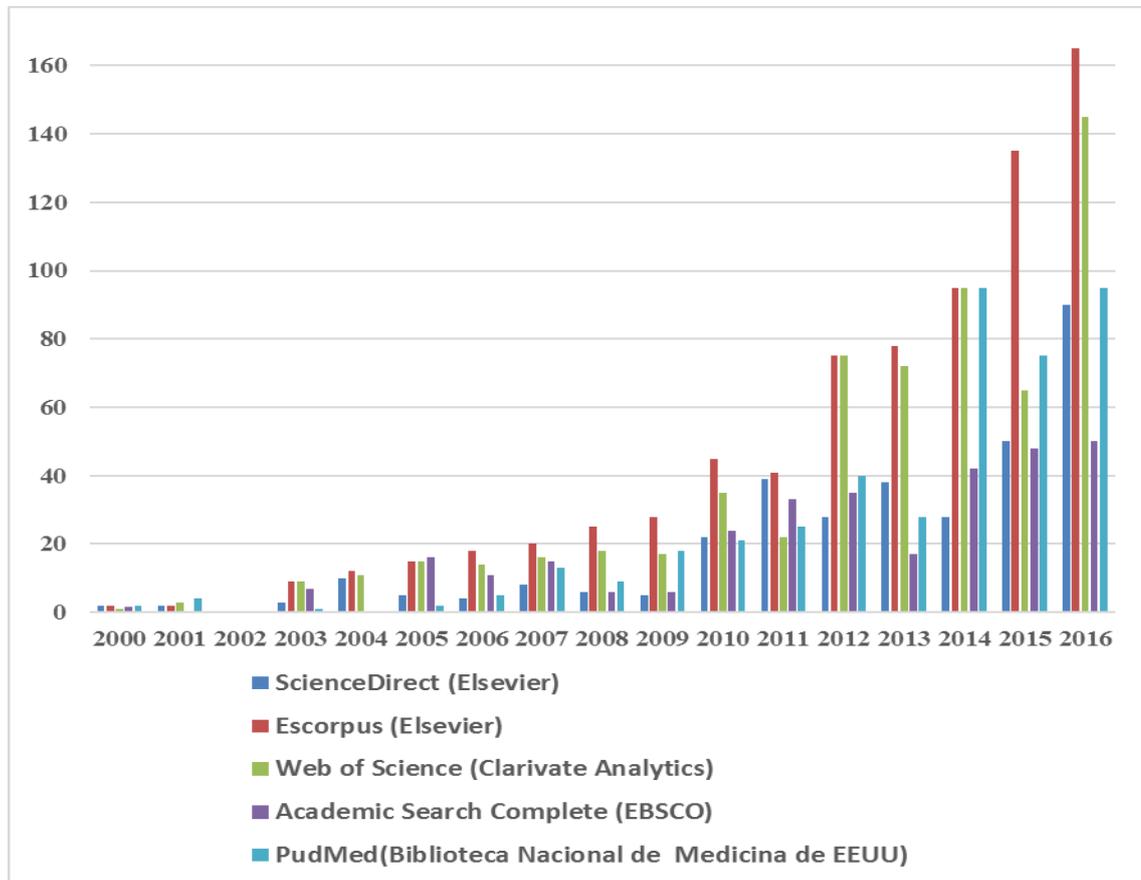


residuales (EDARs) se consideran la fuente principal de contaminantes emergentes al medio acuático (Aydin & Talinli, 2013), ya que a ellas llegan todo tipo de aguas residuales, eminentemente urbanas, pero también aguas de procedencia industrial, agrícola o especial (efluentes de zonas hospitalarias, veterinarias, vertederos, etc.). La finalidad de las estaciones depuradoras de aguas residuales es llevar a cabo una serie de tratamientos, que pueden ser físicos, químicos, biológicos o combinación de éstos, para eliminar tanto la materia suspendida en el agua como la materia orgánica presente en ella (Guedes, Sosa, & Santana, 2017).

Una vez las aguas han sido tratadas y cumplen con los valores de calidad impuestos por las diferentes administraciones públicas, pueden verterse en el medio receptor, Sin embargo, y, debido en gran manera a la falta de legislación, en los efluentes de estas EDARs se pueden detectar concentraciones de contaminantes emergentes debido a que las plantas depuradoras no están diseñadas para eliminarlos ni se tiene la obligación legal de hacerlo, Aparte de dicha fuente, otras vías puntuales de entrada de contaminantes emergentes al medio ambiente pueden ser los vertidos accidentales, las instalaciones agrícolas regadas con aguas depuradas o los lixiviados de vertederos, En cuanto a las fuentes de contaminación difusas se encuentran las fugas de los sistemas de saneamiento, las escorrentías procedentes de instalaciones agrícolas y ganaderas o las infiltraciones de agua de río contaminada en acuíferos subterráneos (Aydin & Talinli, 2013; Christiansen, 2004; Costanzo *et al.*, 2010; García-Galán *et al.*, 2010).

De hecho, no es hasta finales de los años 90 cuando empieza a existir una concienciación científica acerca de los contaminantes emergentes. En la Figura 2.1. se muestra la evolución en el número de trabajos científicos en revistas de alto impacto, pudiéndose comprobar que el número de artículos y, por tanto, de investigaciones,

aumenta constantemente, lo cual refleja el interés de la comunidad científica por este incipiente problema medioambiental (Guedes-Alonso *et al.*, 2017).



**Figura 2. 1 Publicaciones en revistas científicas, “Emerging Pollutants”**

Fuente: (Guedes-Alonso *et al.*, 2017).

El hecho de crear una categoría de nuevos contaminantes surgió, por tanto, hace pocos años, a raíz de la mejora de los métodos de análisis químico, con los cuales se pudo comprobar que los diferentes compartimentos medioambientales presentaban concentraciones de “nuevos compuestos químicos “catalogados como peligrosos o tóxicos para el medio acuático (Guedes-Alonso *et al.*, 2017).



## **2.3. EFECTO ENDOCRINO**

### **2.3.1. Disruptor Endocrino (DE)**

Es cualquier compuesto químico contaminante del medio ambiente que una vez incorporado a un organismo afecta el equilibrio hormonal del mismo en diversas especies, entre ellas el humano, numerosos sistemas han sido descritos que afectan el eje reproductivo masculino (Scaglia & Chichizola, 2007).

### **2.3.2. Sistema endocrino**

El sistema endocrino, es un conjunto de órganos y tejidos encargados de mantener el equilibrio químico del organismo, controlando su normal funcionamiento, Su principal componente son las glándulas endocrinas, las que liberan hormonas al torrente sanguíneo; estas sustancias regulan el crecimiento, el desarrollo y las funciones de varios tejidos, así como también la reproducción sexual (Jara, Garea, & Irabien, 2005).

El termino disruptor endocrino lo utilizo por primera vez Theodora Colman en 1991, actualmente se denominan “compuestos disruptores endocrinos, CDEs” (en inglés, endocrine disrupting compounds, EDCs),

Según la Comisión Europea en uno de sus más recientes documentos (20), UEC-2016,” las sustancias químicas que alteran los procesos endocrinos (“alteradores endocrinos”) son aquellos que perturban las funciones del sistema hormonal y, en consecuencia, producen efectos adversos”.

Según la Organización Mundial de la Salud recoge en su Programa Internacional sobre Seguridad Química (Beltrán *et al.*, 2015), un disruptor endocrino es una sustancia exógena o combinaciones de varios que alteran las funciones del sistema endocrino y, por lo tanto, tienen efectos perjudiciales para la salud en un organismo intacto o su progeñie, o para determinadas (sub) poblaciones”.



Según EPA (1997), “agente exógeno que interfiere con la síntesis, secreción, transporte, unión, acción o eliminación de la hormona natural en el cuerpo que son responsables por el mantenimiento, reproducción, desarrollo y/o comportamiento de los organismos”.

No obstante, existen puntos de encuentro entre todas estas definiciones, como pueden ser la consideración de disruptor endocrino: “compuestos disruptores endocrinos” (EDCs) —término con el cual nos referimos a una sustancia química sintetizada por la acción humana, capaz de alterar el equilibrio hormonal y provocan alteraciones en el sistema endocrino de muchos organismos o en su descendencia, son solubles en grasas. Así la utilización de estiércol de animales y sedimento de aguas servidas como fertilizantes consiste en una de las principales vías de diseminación de estos compuestos en el ambiente (Christiansen, 2002).

Según Bila *et al.* (2007), las sustancias clasificadas como disruptores endocrinas (DE), incluyendo sustancias naturales y sintéticas, usadas o producidas para varios usos pueden agruparse en dos clases: 1, Sustancias sintéticas- utilizadas en la agricultura y sus subproductos como pesticidas, herbicidas, fungicidas e insecticidas; dioxinas, alquilfenoles y otros; compuestos farmacéuticos como los estrógenos sintéticos dietilbestrol (DES) y 17 alfa etinilestradiol (EE2) y 2, Sustancias naturales – Fitoestrogénicos, tales como, genisteína y metaresinol y estrógenos naturales 17 beta-(E2), estrona (E1) y (E3).

#### **2.4. IMPACTO POR LAS HORMONAS EN EL MEDIO AMBIENTE**

Las hormonas son compuestos usados como una parte esencial tanto en la medicina humana, veterinaria y agricultura y a pesar de haber sido aprobado por el gobierno y sometido a estudios farmacocinéticos, todavía existe una considerable falta de



conocimiento sobre su destino en el medio ambiente. La salud humana depende del buen funcionamiento del sistema endocrino, que regula la liberación de hormonas esenciales para funciones tales como el metabolismo, el crecimiento y desarrollo, el sueño o el estado de ánimo (OMS, 2013).

En los últimos años, se ha mostrado gran interés en la detección, eliminación de estrógenos, aunque los estudios realizados no han sido suficientes para impulsar la elaboración de una legislación que permita conocer la concentración real en la que se comienza a producir daños a los seres vivos, la investigación del destino de hormonas sexuales, en el medio ambiente, especialmente en ecosistemas acuáticos, es un tema prioritario para la química ambiental (Bodzek & Dudziak, 2006).

Los esteroides y sus metabolitos son constantemente vertidos en las aguas receptoras, ríos, lagos o mares, debido a su eliminación incompleta en plantas de tratamiento de aguas residuales, tratamiento de residuos sólidos, Estos esteroides que se eliminan a través de la orina, estiércol de animales y heces humanos, en diferentes cantidades, dependiendo de la edad, estado de salud, dieta y estado de embarazo de las mujeres, o por eliminación directa a través de aguas residuales de uso doméstico, y la escorrentía de las tierras de cultivo son consideradas fuentes principales introducidos al medio acuático y causar daños a la salud (Górak & Hoffmann, 2001; Gupta *et al.*, 2007; Liu & Zhou, 2013; Liu *et al.*, 2009). Una posible contaminación del suelo y del agua subterránea puede ser causada por aplicación del lodo proveniente de las plantas de tratamiento municipales, así como transporte de las hormonas a través de la filtración de aguas residuales superficiales (Ternes *et al.*, 1999).



## **2.5. HORMONAS ESTEROIDES**

### **2.5.1. Concepto de hormonas**

Las hormonas son sustancias orgánicas producidas por las glándulas y tejidos endócrinos que, por lo general, pasan a la circulación general y ejercen su acción en otros tejidos distantes del lugar de secreción. Las hormonas son auténticos mensajeros químicos de forma individual, poseen funciones vitales de acción inmediata, en horas, como la insulina, o más tardía, en días, como el cortisol. También intervienen en la regulación de crecimiento y el desarrollo, mientras que otras participan en funciones de la vida de relación, reacción y defensa. En los humanos, las hormonas son fundamentales para la vida sexual y, por lo tanto, para la reproducción (Vargatu, 2016).

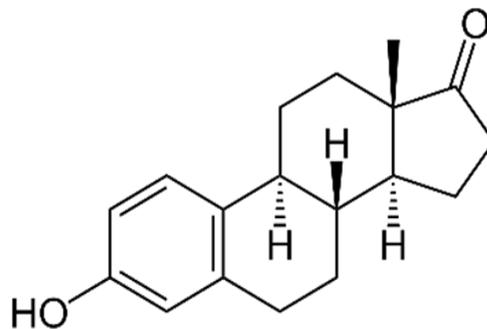
Las hormonas esteroideas de origen natural se sintetizan mayoritariamente en el tejido suprarrenal, ovarios, testículos y placenta, Cuando son excretadas, llegan al medio ambiente, al ser moléculas biológicamente activas, pueden activar las células receptoras de los organismos presentes en los sistemas medioambientales, produciendo cambios en los sistemas endocrinos de éstos (Guedes-Alonso *et al.*, 2017).

## **2.6. CLASIFICACIÓN DE LAS HORMONAS ESTEROIDES**

Se clasifican de acuerdo con su naturaleza: naturales (producción en el cuerpo humano); artificial o sintéticas (producción industrial), Los esteroides que causan preocupación con relación al medio ambiente acuático debido a su potencial disruptor endocrino son principalmente, estrógenos y anticonceptivos, los cuales incluyen el 17  $\beta$ -estradiol (E2), estrona (E1), estriol, (E3), 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2) y el mestranol (MeEE2) (Ying *et al.*, 2002).

### 2.6.1. Hormona estrona, E1

Se representa por (E1). Es una hormona estrogénica secretada por el ovario y el tejido adiposo denominada también foliculina. Es el estrógeno menos abundante en el cuerpo de la mujer en edad reproductiva, después de la menopausia pasa a ser el estrógeno mayoritario llegando a ser su concentración entre el doble y cuatro veces más que la del  $17\beta$  estradiol (Raymond et al., 2005).. Estructuralmente sólo posee un grupo hidroxilo unido al C3, Formula química se muestra en la Figura N° 2.2 y su nombre según la IUPAC.



Fuente: (Vessman *et al.*, 2001).

(IUPAC):3-hydroxy-13-methyl-7,8,9,11,12,14,15,16-octahydro-6H-cyclopenta[a]phenanthren-17-one.

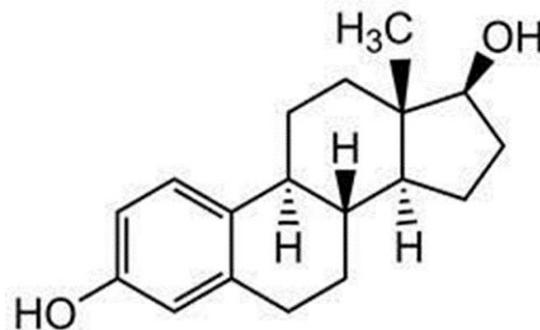
**Figura 2. 2** Estructura química de la hormona estrona

### 2.6.2. Hormona $17\beta$ -Estradiol

Se representa por (E2).: El  $17\beta$ -estradiol se sintetiza en los ovarios y es una hormona del desarrollo sexual de la mujer siendo el estrógeno predominante durante la etapa reproductiva, es responsable del crecimiento de cáncer de mama y epitelio reproductivo, la maduración de huesos largos y el desarrollo de características sexuales secundarias. Esta hormona es la más importante ya que tiene un efecto estrogénico menor a un nivel de ng/L, es responsable de interrumpir una parte principal de efectos

significativos de disruptores endocrinos observados en el medio acuático (Hu *et al.*, 2009).

Químicamente. El estradiol tiene 3 dobles ligaduras en el anillo A, un OH en C3, y otro OH en C 17, en posición beta, es el estrógeno más potente dentro de un grupo de esteroides estrógenos endógenos que incluyen la estrona y el estriol. Su fórmula química se muestra en la figura 2.4 y su nombre del IUPAC.



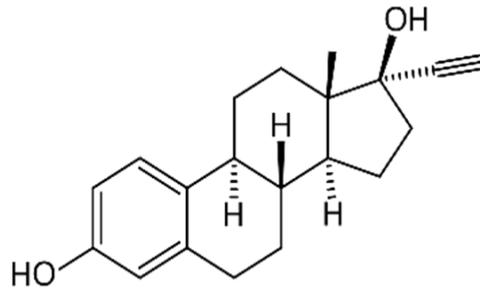
Fuente: (Vessman *et al.*, 2001).

(IUPAC): (17 $\beta$ )-estra-1,3,5(10)-triene-3,17-diol

**Figura 2. 3** Estructura química de la hormona 17  $\beta$ -estradiol

### 2.6.3. Hormona 17 $\alpha$ -Etinilestradiol

Es un estrógeno sintético ampliamente utilizado en la actualidad (Kümmerer, 2001). Estructuralmente su molécula es igual a la del  $\beta$ -estradiol, con la única diferencia de la adición de un grupo etinil en el C17, Al igual que en el caso del  $\beta$ -estradiol, una vez metabolizado, forma complejos glucurónidos y sulfatos que se excretan en la orina y las heces, En la actualidad sigue usándose no sólo en terapias de remplazo hormonal o en el tratamiento de hipogonadismo femenino, sino como anticonceptivo, normalmente en presencia de un progestágeno, (Runnalls *et al.*, 2010) a fórmula química se muestra en la Figura 2,5, y el nombre según la (IUPAC)



Fuente: (Vessman *et al.*, 2001).

(IUPAC). 17-etinil-13-metil-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17- decahidro-6H-ciclopenta[a]fenantrene3,17-diol.

**Figura 2. 4** Estructura química de la hormona 17  $\alpha$ -etinilestradiol.

Los estrógenos que mayor preocupación despiertan en los investigadores pertenecen al grupo de los disruptores endocrinos, debido a que pueden afectar el desarrollo de los seres vivos.

La concentración de estas sustancias en muestras es del orden de nanogramos por litro (ng/L) se muestra en la Tabla 2.1 contracción de hormonas esteroides en aguas de lago.

**Tabla 2. 1 Concentraciones de hormonas en aguas de Lagos ng L-1**

Localización Del Lago	Estrona E1	17 $\alpha$ -etionilestradiol EE2	17 $\beta$ estriol E2	Referencia
Lake Michigan, Usa	2,2-3,4	Nd	1,3-1,7	(Blair, Crago, Hedman, & Klaper, 2013)
Luoma Lake, China	nr	4,25-12,85	2,52-21,82	(Dan Liu et al., 2017)
East Lake, China	9,62	16,85	17,58	(J. Wang & Zhu, 2017)
Honghu Lake China	83,52	43,93	74,71	(Yang et al., 2015)
East Dongting Lake, China	41,01	24,88	52,81	(Yang et al., 2015)
Lake Kasumigaura, Ibaraki, Japan	0,20-0,80	-	-	(Isobe et al., 2003)
Paldang And Dongbok Lake, South Korea	1,7-5,0	-	-	(Kim, Cho, Kim, Vanderford, & Snyder, 2007)
Lake Taihu, China	15,77	16,37	10,75	(Lu, Yan, Wang, & Chen, 2011)
Lake Donghu China	10	-	11	(A. Lukowski et al., 2013)
Buyukcekmece Lake Istanbul, Turkey	0,5-5,74	0,5-11,7	0,5-10,2	(Aydin & Talinli, 2013)
Dianchi Lake, China	1,2-22,7	4,4	8,3	(J. Wang & Zhu, 2017)
Alemania Cuerpo Hidrico	0,1-4,1	0,1-5,1	0,15-3,6	(Kummerer, 2001)
Brasil Rios Piracicaba	14 - 82	24 - 194	90 - 137	(Díaz-Torres, Gibson, González-Farías, Zarco-Arista, & Mazari-Hiriant, 2013)
Colombia				

Fuente: (Papoutsakis *et al.*, 2015).

**Tabla 2. 2 Concentraciones de hormonas en aguas subterráneas ng L<sup>-1</sup>**

Hormona	Localización	Concentración ngL <sup>-1</sup>	Referencia
Estrona E1	EEUU	27	Kolpin, 2002
	China	75	Zhro 2009
	Japon	3,4 – 66	Isobe,2003
	China	180	Yang, 2006
	EEUU	122	Kolpin 2002
	Norte América	38	Pal 2010
	Europa	0,4 – 33	Pal, 2010
	Europa	4	Loos, 2010; Barnes, 2008
	Australia	3,8 – 34	Pal, 2010
	España	500	Cespedes, 2004
	Francia	0,7	Vulliet 2011 a
	EEUU	79	Fram, 2011
	Francia	0,4	Vulliet, 2011 b
β-estradiol E2	Norte América	0 – 45	Pal, 2010
	Italia	2 – 80	Lagana 2004
	Europa Alemania	01 – 36 2,4	Pal, 2010 dler, 2001
	Francia	0,7	Vulliet, 2011 b
17 α-etimilestradiol EE2	EEUU	73	Kolpin, 2002
	Norteamérica	2 – 46,7	Pal, 2010

Fuente: (Papoutsakis *et al.*, 2015).

#### 2.6.4. Propiedades físico-químicas de las hormonas estudiadas.

#### 2.6.5. Concentraciones de hormonas en aguas potables

**Tabla 2. 3** Se establecen los valores de diferentes parámetros físico-químicos, bases de datos HSDB (Hazardous Substances

Hormona	CAS	Nombre Químico IUPAC	Formula	PM (g/mol)	Pv (mmHg a 20°C) <sup>a</sup>	Solubilidad en Agua (mg/L <sup>-1</sup> 20°C) <sup>b</sup>	log K <sub>ow</sub> <sup>b</sup>	Constante de Ley Henry H <sup>a</sup> (atm·m <sup>3</sup> /mol)	pKa <sup>c</sup>
17 β- E2	50-28-2	(17β)-estra-1,3,5(10)-triene-3,17-diol	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	272,38	6,4 x 10 <sup>-9</sup>	3,0	4,01	3,64 x 10 <sup>-11</sup>	10,4
		17-etinil-13-metil-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6H-ciclopenta[a]fenantrene-3,17-diol	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	296,403	1,95 x 10 <sup>-9</sup>	11,3,	,67	7,94 x 10 <sup>-12</sup>	10,5
E1	53-16-7	3-hidroxy-13-metil-7,8,9,11,12,14,15,16-octahidro-6H-ciclopenta[a]phenanthren-17-one	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	270,366	2,5 x 10 <sup>-10</sup>	3,0	,13	1,3x10 <sup>-12</sup>	10,33

Fuente: (Guedes-Alonso et al., 2017)



En la Tabla 2,3. Se indica lo siguiente: Nombre de la hormona: compuestos de estudio. Numero de CAS (Chemical Abstracts Service): es un indicador numérico único que designa una sustancia que no tiene ningún significado químico, y que se enlaza con una gran cantidad de información de acerca de esa sustancia química específica, se usa internacionalmente en las hojas de seguridad pueden ser 9 dígitos de tres ó dos números separados por un guion

Nombre IUPAC Unión Internacional para la Química Pura y Aplicada. De cada hormona en estudio. Formula global de la hormona . Peso molecular de cada hormona expresada en g mol<sup>-1</sup>. Presión de vapor, estos esteroides tienen baja presión de vapor, entre  $1,9 \times 10^{-9}$  y  $9,9 \times 10^{-12}$  mm Hg, e indican que es poco probable que se evaporen o volatilicen y pasen al medio aéreo, manteniéndose en las fases líquida o sólida,

La solubilidad, Los esteroides naturales como la hormona  $17 \beta$ -E2 y E1, tienen una solubilidad de aproximadamente, 3 mgL<sup>-1</sup>, y la hormona sintética  $17 \alpha$ -EE2 tiene una solubilidad de 11,3 mgL<sup>-1</sup>, valores relativamente bajos de solubilidad en agua, precipitaran hacia las fases sólidas.

Los valores de Log K<sub>ow</sub>, de los esteroides naturales son 3,13 para E1 y 4,01 para el  $17 \beta$  E2, El esteroide sintético  $17 \alpha$  EE2 tiene un valor alto de Log K<sub>ow</sub>, 3,67, para las propiedades psico térmicas de estos esteroides, se observa que los estrógenos son compuestos orgánicos hidrofóbicos de baja volatilidad, Debido a estas características, se espera que la adsorción en el suelo o el sedimento pueda ser un factor significativo para la reducción de las concentraciones en la fase acuosa (Esteves *et al.*, 2009; Ying *et al.*, 2002). Es lógico asumir que este tipo de disruptores endocrinos tendrán a pasar de la fase líquida a la fase sólida. Además, debido a este carácter lipófilo, tenderán a permanecer fuertemente adsorbidos en los tejidos grasos de los organismos presentes en el medio,



produciéndose los fenómenos de bioacumulación en organismos acuáticos (Lai *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2012).

Las hormonas estudiadas presentan un valor de pKa superiores a 10, lo que indica el incremento de solubilidad en medios con pH altos.

#### **2.6.6. Características químicas de las hormonas estudiadas**

Las hormonas esteroides suelen presentar grupos metilo en las posiciones 10 y 13, grupos carbonilo o hidroxilo en el C3 o cadenas laterales de hidrocarburos en la posición 17. La presencia de unos u otros grupos funcionales determina el tipo de receptor celular al que pueden unirse las diferentes hormonas esteroides (Dan Liu *et al.*, 2017; Larsson *et al.*, 1999; Lednicer, 2011; Ying *et al.*, 2002). Son los principales responsables por el crecimiento y por la reproducción de especies animales, incluyendo a los seres humanos, sus derivados sintéticos son bastante empleados como anticonceptivos (hormonas inhibitoras del proceso de ovulación), también son administrados en el control de los síntomas como la menopausia, disturbios fisiológicos y en el tratamiento de cáncer de próstata y de mama. En general, son rápidamente absorbidos por el organismo y, luego metabolizados en el hígado (Ghiselli & Jardim, 2007; Torres, 2018).

Los esteroides sintéticos  $17\ \alpha$ -EE2 y el  $17\ \beta$ -E2, son los más potentes de la clase de los disruptores endocrinos, El  $17\ \beta$ -E2 es uno de los estrógenos endógenos producidos naturalmente por el cuerpo humano (Desbrow *et al.*, 1998). El  $17\ \alpha$ -EE2 se encuentra en las pastillas anticonceptivas (que contiene 30 a 50 ug de  $17\ \alpha$ -EE2 por pastilla) y en terapia de reposición hormonal (Bila & Dezotti, 2003; Torres, 2018; Vine, 2005).

El  $17\ \alpha$ -EE2 y el  $17\ \beta$ -E2 reciben atención especial porque son excretados continuamente por los desagües y no son removidos completamente en los PTAR, y son



lanzados en los sistemas acuáticos y pueden ser encontrados en las aguas superficiales, muchas veces utilizadas como suministro de agua potable (Bila & Dezotti, 2003);

Recientes investigaciones muestran que el esteroide 17  $\beta$ - E2 es uno de los mayores responsables por la actividad estrogénica en los efluentes de los PTAR, Esteroides naturales también se encuentran en aguas naturales, suelos y lodos biológicos en varias partes del mundo (Belfroid *et al.*, 1998; López & Barceló, 2001; Ternes *et al.*, 1999) , reportaron la presencia de 17  $\beta$  - E2 (6 a 66 ng L<sup>-1</sup>) en aguas subterráneas próximas a áreas con alta densidad de cría de animales.

El 17  $\alpha$ - EE2. Es ejemplo claro de un compuesto hormonalmente activo (muy potente) que puede tener algún impacto en el sistema endocrino de organismos como los peces (Johnson *et al.*, 2008; Torres, 2018).

Así, de acuerdo con Thorpe & Baynes (2003), el 17  $\alpha$ - EE2 se encontró en algunos ambientes acuáticos que reciben efluentes domésticos y es suficiente para inducir muchos de los efectos reportados de feminización de peces usados en pruebas de laboratorio y de los que viven en su hábitat natural,

Estudios que han sido desarrollados utilizando el pez “paulistinha” (Danio rerio) y se mostró que hubo una notable sensibilidad de peces para el esteroide estrógeno El 17  $\alpha$ - EE2, La exposición crónica de paulistinhas machos jóvenes y a concentraciones muy bajas de El 17  $\alpha$ - EE2 (15 ng L<sup>-1</sup>) se revierte el sexo (“imposex”) de machos en hembras fenotípicas (Pickering; Sumpter, 2003), La feminización inducida también ha sido demostrada en machos jóvenes de paulistinhas, cuando están expuestos al El 17 beta- E2 (100 ng L<sup>-1</sup>) de 21 a 45 días después de la fertilización, durante el periodo sexual de diferenciación (Thorpe & Baynes, 2003).

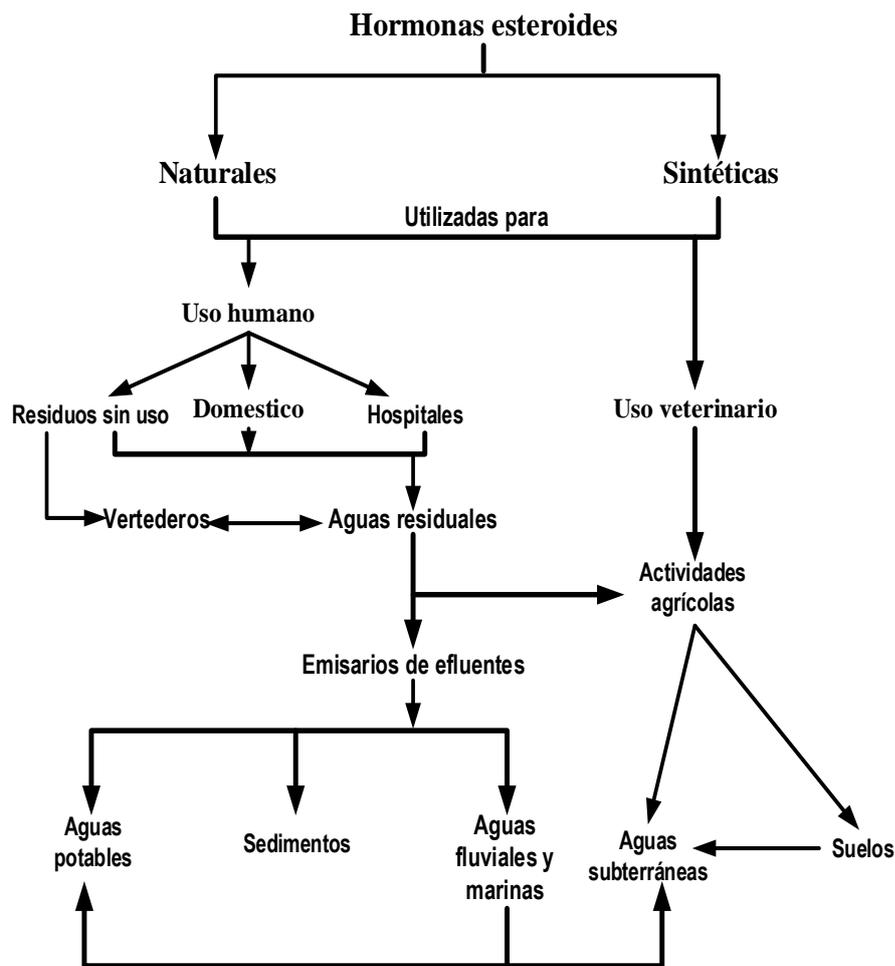
En humanos y animales, estrógenos pasan por varias transformaciones, principalmente en el hígado; el E1 17 beta - E2 es rápidamente oxidado en Estrona, la cual puede ser aun transformada en Estriol, siendo este el principal producto de excreción (Ying *et al.*, 2002).

**Tabla 2. 4 Excreción diaria ( $\mu\text{g}$ /Per cápita) de esteroides estrógenos en humanos.**

Categoría	E2	17 $\beta$ -E1	17 $\alpha$ -EE2
Hombres	3,9	1,6	CT
Mujeres Menstruadas	8	3,5	CT
Mujeres en la Menopausia	4	2,3	CT
Mujeres Embarazadas	600	259	CT
Mujeres que usan anticonceptivos	–	–	35

Fuente: (Johnson *et al.*, 2008).

Las mujeres embarazadas y durante el periodo de menstruación son los dos grupos más importantes que contribuyen a la excreción de hormonas, excretando 1076 y 3,42 mg/d de E1 (estrona), de 308 y 4.66 mg/d, E2 ( 17  $\beta$ - estradiol) en la orina, ;mientras que 100 y 0,3 mg/d de E1, 202 y 0,2 mg/d de E2 en las heces (Topalian *et al.*, 2012).



Fuente: (Guedes-Alonso *et al.*, 2017).

**Figura 2. 5** Diagrama vías de entrada de hormonas esteroides al medio ambiente.

### 2.6.7. Degradación de hormonas en el agua

Es esencial caracterizar los procesos de degradación y la sorción de hormonas esteroides para evaluar su distribución en el medio ambiente, su persistencia e importancia ecológica en los sistemas terrestres y acuáticos (Kuster *et al.*, 2004).

Cuando los estrógenos y los progestágenos se han incorporado en los cuerpos de agua, ocurre una serie de procesos como: (fotólisis, biodegradación y adsorción a los sedimentos) pueden contribuir a su eliminación. Sin embargo, no se ha podido determinar si los mecanismos de biodegradación o absorción son los más importantes para eliminar estos compuestos, es necesario contar con una mayor información sobre estos



mecanismos para mejorar el tratamiento de los sistemas existentes y desarrollar nuevas estrategias para su eliminación de las aguas residuales y los lodos (Auriol y Blanc et al, 2009). Sus tasas de degradación ayudan a determinar su impacto ambiental y amenaza a la vida acuática debido a su gran potencial biológico y tóxico (Chowdhury *et al.*, 2011), La degradación de los estrógenos esteroidales se cree que es microbiológicamente mediada, con la desconjugación de estrógenos sulfatados y glucuronizados y la oxidación de E2 y EE2 en E1, así como de las transformaciones esenciales (Atkinson *et al.*, 2012).

#### **2.6.8. Fotodegradación de hormonas**

El tiempo de la degradación de las hormonas esteroidales en el ambiente puede variar desde unas pocas horas a meses, lo cual está en función de diversos parámetros ambientales; los procesos de degradación en el medio ambiente están dados por factores abióticos y bióticos, en los procesos abióticos se encuentra la Fotodegradación por irradiación solar que es un factor muy importante para determinar su destino final en el medio acuático; su foto transformación puede ocurrir a través de fotólisis directa o indirecta, la fotólisis directa es el resultado de la absorción de luz por los contaminantes causando su degradación molecular que es crucial para la foto degradación de estrógenos esteroidales en el medio acuático (Chowdhury *et al.*, 2011).

La foto productos iniciales generados de la degradación de estos compuestos son muy poco solubles en agua, lo cual dificulta su análisis, Estudios en el laboratorio muestran que las hormonas  $17\beta$ -estradiol y  $17\alpha$ -etinilestradiol expuestas a luz natural se degradan en aguas de río, presentando una vida media menor a 10 días bajo 12 horas de luz solar por día, su foto transformación también ha sido estudiada mediante radiación UV (Mazellier *et al.*, 2008).



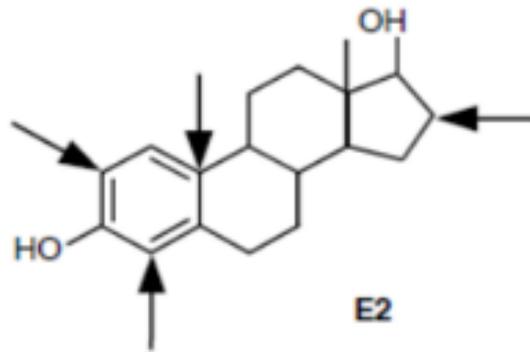
### 2.6.9. Cloración como tratamiento de agua residual y hormonas

El cloro es un fuerte oxidante usado como desinfectante para residuos y para tratamiento de agua potable y/o para mantener una desinfección residual en la distribución de canalizaciones de agua potable, presente como HOCl y OCl es capaz de reaccionar con productos químicos (Pereira *et al.*, 2011).

Varios estudios mostraron que el 17 $\beta$ -estradiol y el etinilestradiol reaccionan rápidamente con HCIO y se eliminan por completo, sin embargo, hay varios subproductos formados clorados, de los cuales algunos pueden producir carcinogenicidad y/o mutagenicidad, por lo tanto, es importante identificar los productos de reacción de los disruptores endocrinos con cloro disponible y sus actividades estrogénica asociadas (Auriol & Blanc, 2009).

La estrona se ha detectado de 10-100 veces en cantidades mayores que el estradiol en agua del medio ambiente, debido a que se oxida rápidamente con ácido hipocloroso, los derivados clorados de Estrona tienen una mayor actividad que los disruptores endocrinos artificiales tales como BPA.

Los subproductos de la cloración de 17 $\beta$ -estradiol (E2, una hormona natural) que han sido identificados son el 2,4-dicloro-17 $\beta$ -estradiol, monocloroestrona, 2,4-dicloroestrona y cuatro subproductos formados por la división del anillo entre las posiciones 9 y 10 y 16 y 17, Estos son posibles debido a que el 17 $\beta$ -estradiol contiene átomos de carbono activado adecuados para el ataque nucleofílico del cloro, En la Figura 2.6, se muestra los puntos de ataque del cloro al 17 $\beta$ -estradiol para la formación de productos clorados en presencia de este ion.



Fuente: (Giger, 2009).

**Figura 2. 6** Puntos de ataque del cloro a la hormona 17  $\beta$ -estradiol

De aquí la importancia de proponer técnicas para su remoción, ya que se ha encontrado estrógenos en concentraciones correspondientes a un intervalo de 0,13-100 ng/L y, aunque la contaminación en cada lugar depende del índice permitido para su venta y consumo, en países como Francia, España, Italia, Austria, Estados Unidos y Japón, este tipo de fármacos es fácilmente adquirido por cualquier persona sin receta médica. El esteroide sintético 17  $\alpha$ - etinilestradiol (EE2) también es descartado en cuerpos de agua y efluentes (Diniz *et al.*, 2010).

## 2.7. METODOLOGÍAS DE EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE HORMONAS ESTEROIDES EN MUESTRAS MÉDIO AMBIENTALES.

Los bajos niveles de contaminación y la complejidad de las matrices ambientales, exigen el uso de métodos con alta sensibilidad y selectividad para el análisis de residuos de estrógenos se convierte en un verdadero reto para los analistas (Peng *et al.*, 2008)..

El proceso analítico deberá comenzar realizando técnicas de extracción y preconcentración que permitan por un lado separar los analitos de interés de la muestra en la que se encuentran y eliminar a su vez las interferencias que puedan afectar a la correcta determinación y, por otra, pre concentrar los analitos extraídos, lo cual aumentará la sensibilidad del análisis (Guedes-Alonso *et al.*, 2017)..



Los avances que se han llevado a cabo en las últimas décadas en el campo de la química analítica han permitido el desarrollo de metodologías de detección y determinación cada vez más selectivas y sensibles, Sin embargo, pese a estos avances, dichas técnicas requieren un paso previo de extracción y preconcentración ya que en muchas ocasiones las muestras son muy complejas y presentan una alta cantidad de interferencias, como ocurre en las aguas residuales, En matrices más limpias la presencia de interferencias no es tan preocupante, sin embargo, las concentraciones de hormonas sufren una gran dilución debido a que llegan a grandes masas de aguas como ríos, lagos, mares u océanos, por lo que estos tratamientos de extracción y preconcentración son también necesarios, La elección, por tanto, del método idóneo para realizar la extracción y preconcentración dependerá de las características de la muestra que se desee analizar (Guedes-Alonso *et al.*, 2017).

### **2.7.1. Análisis de hormonas en agua**

Para el análisis de esteroides, la cromatografía en fase gaseosa acoplada a un espectrómetro de masa (CG- EM), se utilizó inicialmente, aunque es un método laborioso porque requiere transformación de un compuesto químico en uno de estructura química similar, pero con propiedades químicas diferentes. (derivatización) (Esteves *et al.*, 2009).

También se usan con frecuencia cromatografía líquida de alta resolución (CLAE) (HPLC), con detección ultravioleta (UV) (López & Barceló, 2001), detección electroquímica (ED) (Peñalver *et al.*, 2002), detección de fluorescencia (FD) (Matsumoto, 2001; Weber *et al.*, 2005), cromatografía con arreglo de diodos (ADD)(Esteves *et al.*, 2009) y la espectrometría de masa (MS) (Esteves *et al.*, 2009; Ganter *et al.*, 2005; Pichon *et al.*, 1995).



La cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a un espectrómetro de masa (LC-MS) tiene buena sensibilidad y precisión, pero no es accesible en muchos laboratorios, ya que existe un alto costo de equipo y el requisito de operadores capacitados. Por tanto, el HPLC es una buena elección, aunque su sensibilidad y selectividad no son tan buenas como las del LC-MC-MS. Para ello, una muestra necesita un pretratamiento antes del análisis cromatográfico, que normalmente es necesario como extracción líquido-líquido (LLE), (Choi *et al.*, 2006; Novakova *et al.*, 2004) o la extracción en fase sólida (SPE) (Esteves *et al.*, 2009; Laganà *et al.*, 2004; Quintana & Reemtsma, 2004; Weigl *et al.*, 2004).

### **2.7.2. Extracción de hormonas en fase sólida (SPE)**

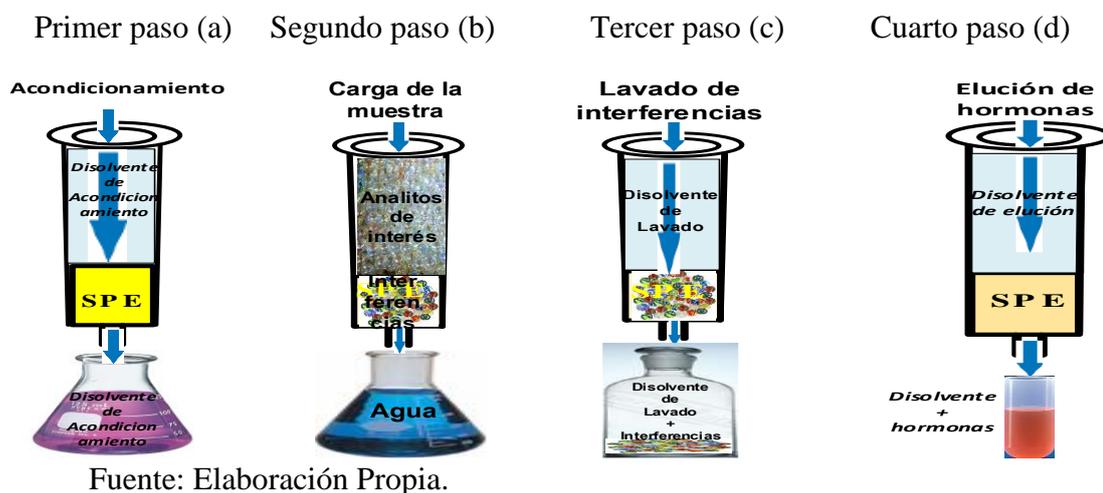
Esta técnica sostenible, es la extracción en fase sólida (SPE, Solid Phase Extraction), la cual se ha convertido en las últimas décadas en la técnica de extracción y preconcentración más utilizada y estandarizada, de hecho, la SPE es utilizada en protocolos de análisis de diversas administraciones como la US-EPA o la Comisión Europea (EPA, 2010; Esteves *et al.*, 2009).

La extracción en fase sólida (SPE) se puede describir como un proceso cromatográfico simplificado, con el adsorbente como una fase estacionaria. La fase móvil es la muestra acuosa durante la etapa de extracción o el disolvente orgánico durante la etapa de elución. Se obtienen factores de enriquecimiento elevados cuando el sorbente retiene fuertemente los analitos en presencia de agua y cuando tienen una baja retención con el disolvente orgánico utilizado para la desorción (Esteves *et al.*, 2009).

La extracción en fase sólida está basada en la retención selectiva de los analitos en una fase adsorbente y su posterior elución, utilizando un disolvente adecuado, los analitos quedan retenidos en su superficie, mientras que los otros componentes de la

muestra no retenidos pasan a través de él, dependiendo del adsorbente utilizado, así como del disolvente orgánico que se utilice en este procedimiento se pueden obtener extracciones realmente selectivas, por lo que el estudio y optimización de los pasos anteriormente descritos, así como la elección de fases adsorbentes y eluyentes adecuados es vital para obtener recuperaciones lo más altas posibles (Guedes-Alonso *et al.*, 2017).

Para la realización del SPE, utilizando, el C18, son necesarios cuatro pasos de acuerdo a la Figura 2.6, muestra la secuencia de pasos que se deben realizar en la extracción en fase sólida, estos pasos deben optimizarse para obtener una máxima recuperación del producto a analizar.



**Figura 2. 7** Pasos en la extracción de hormonas utilizando cartuchos SPE

En el caso de las hormonas esteroideas los adsorbentes más utilizados son los de sílice unida a grupo C18, así como los poliméricos de tipo PS-DVB, los cuales se suelen utilizar en métodos de análisis multiresiduo para la extracción de diversos tipos de fármacos, es lógico pensar que se utilice la estructura básica de ciclopentanoperhidrofenantreno para realizar la impresión molecular de estos polímeros, obteniéndose así un medio adsorbente de alta especificidad y selectividad para la extracción de hormonas esteroideas presentes en muestras medioambientales (Gadzała *et al.*, 2009)..



### **2.7.2.1 Acondicionamiento del los cartuchos strata polymeric SPE**

Cada adsorbente de SPE requiere de un acondicionamiento con el objetivo de activar o preparar para retener el analito. La limpieza previa con solvente orgánico y agua, sirve para remover los contaminantes indeseables que pueda estar presente en el cartucho. Ese paso o etapa es un prerequisite para la adsorción del analito (Esteves *et al.*, 2009; Lancas, 1994) Figura s 2.7. y 3.15.

### **2.7.2.2 Carga de la muestra**

En este paso, el compuesto se distribuye entre la muestra líquida y la superficie del adsorbente, por simple adsorción a la superficie o a través de la superficie o mediante la penetración en la superficie y se establece un equilibrio. La velocidad de elución debe ser inferior a 2 ml por minuto, controlando el vacío o la presión aplicada durante el paso de adición de la muestra (Esteves *et al.*, 2009; Lancas, 1994).

### **2.7.2.3 Lavado de las interferencias del SPE**

El lavado o la limpieza del cartucho SPE tiene como objetivo eliminar los interferentes con un solvente que no tiene la fuerza suficiente para eliminar el analito de interés del material de empaque. el disolvente ideal es el propio disolvente de la muestra, si no elimina también el analito de interés (Esteves *et al.*, 2009; Lancas, 1994).

### **2.7.2.4 Elución de las hormonas esteroideas adsorbidos en el SPE**

Es el último paso del SPE, los analitos de interés se adsorben con un pequeño volumen de disolvente adecuado. este paso se realiza con mayor éxito utilizando un disolvente que tenga la mayor fuerza elutrónica para el sorbente que se esté utilizando. El disolvente debe ser lo suficientemente selectivo para que la interacción entre el analito y el sorbente se debilite y se produzca la distribución del analito a través del eluyente (Esteves *et al.*, 2009).



El flujo de elución debe ser bajo y el volumen mínimo es aproximadamente 2 veces el del sorbente, es decir, de 2 a 5 ml para cartuchos de 500 mg. cuanto menor es el volumen de desorción, mayor es el factor de pre concentración. la desorción es más eficaz si se realiza con 2 o 3 alícuotas de 1 ml en lugar de una sola alícuota de 2 o 3 ml (Esteves *et al.*, 2009; Farré *et al.*, 2008).

### **2.7.3. Validación del método analítico**

La validación del método propuesto se obtuvo evaluando los parámetros de selectividad, linealidad, precisión, repetibilidad y exactitud (Esteves *et al.*, 2009).

#### **2.7.3.1 Selectividad**

La selectividad de un método instrumental de separación es la capacidad de es la capacidad de evaluar, de manera inequívoca, las sustancias objeto de examen en presencia de componentes que pueden interferir con su determinación en una muestra compleja. La selectividad evalúa el grado de interferencia de especies como otro ingrediente activo, excipientes, impurezas y productos de degradación, así como otros compuestos de propiedades similares que puedan estar presentes (Ribani *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2012)..

La farmacopea estadounidense define la selectividad de un método analítico como su capacidad para medir con precisión un analito en presencia de interferencia, que se espera que esté presente en la matriz de la muestra, en general, una forma sencilla de verificar La selectividad de un método cromatográfico consiste en observar la presencia de picos en la región del tiempo de retención del analito de interés, inyectando un blanco obtenido con la misma matriz a analizar. En este caso, se deben utilizar varias muestras, y se debe observar la ausencia de picos cercanos al tiempo de retención del analito de interés (Esteves *et al.*, 2009; Lancas, 1994).



Este parámetro se puede obtener de varias formas. La evaluación se puede realizar con detectores modernos (diodo array), que comparan el espectro del pico obtenido en la separación con el de un estándar y esto se utiliza como indicación de la presencia del compuesto puro (Buchmeiser *et al.*, 1997; Esteves *et al.*, 2009; Vessman *et al.*, 2001).

### 2.7.3.2. Linealidad

La linealidad es la respuesta obtenida en función de la concentración del analito, que debe estudiarse en un rango de concentración adecuado. la linealidad se determinó mediante el coeficiente de correlación ( $r^2$ ), obtenido por la gráfica relacionada con la respuesta del equipo en función de diversas concentraciones de analitos. el número mínimo de puntos generalmente aceptado en los gráficos de calibración varía entre 5 y 6 puntos (Esteves *et al.*, 2009; Lancas, 1994).

Para estimar los coeficientes de una curva analítica, se puede utilizar un método de regulación lineal. Además de los coeficientes de regresión a y b, el coeficiente de correlación r también se puede calcular a partir de los puntos experimentales. este parámetro permite estimar la calidad de la curva obtenida, pues cuanto más cerca de 1.0, menor dispersión del conjunto de puntos experimentales y menor incertidumbre de los coeficientes de regresión estimados (Esteves *et al.*, 2009; Ribani *et al.*, 2004).

Para verificar que la ecuación de regresión es estadísticamente significativa, se pueden realizar las pruebas de ajuste del modelo lineal. un coeficiente de correlación mayor que 0,99 se considera como evidencia de un ajuste ideal de los datos para la regresión lineal (Esteves *et al.*, 2009; Henry & Heinke, 1999).

En cualquier técnica instrumental, la relación lineal simple, descrita por la ecuación (1), solo es válida en un rango de masa determinado o concentración de las especies medidas (Esteves *et al.*, 2009; Ribani *et al.*, 2004).



$$y = ax + b \quad (1)$$

**Donde:**

y = respuesta medida (área del pico);

x = concentración;

a = inclinación de la curva de calibración = sensibilidad

b = intersección con el eje y, cuando x = 0

### **2.7.3.3. Precisión**

Es la dispersión de resultados entre pruebas independientes, repetidas de la misma, muestras o estándares similares, bajo condiciones definidas para evaluar la precisión, calcular la estimación de la desviación estándar absoluta (s) (Esteves *et al.*, 2009; Ribani *et al.*, 2004).

### **2.7.3.4. Exactitud**

Los procesos más utilizados para evaluar la exactitud o precisión de un método son materiales de referencia, comparación de métodos, pruebas de recuperación; adición estándar (Esteves *et al.*, 2009; Ribani *et al.*, 2004).

#### **2.7.3.4.1. Límites de detección y cuantificación**

La idoneidad de un método analítico está íntimamente ligada a los límites de detección y cuantificación que éste presente, es decir, a las concentraciones mínimas que sea capaz de detectar y cuantificar, Debido a que las hormonas esteroideas se encuentran en el medio a niveles traza y ultra traza, es necesario desarrollar métodos con límites de detección y cuantificación muy bajos, que se encuentren en el rango de los ng·L<sup>-1</sup> (Guedes-Alonso *et al.*, 2017).

- **El límite de detección (LD)**



El límite de detección (LD) representa la concentración más baja de la sustancia a ser analizada, que se puede detectar, pero no necesariamente cuantificar, utilizando un determinado procedimiento experimental (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 1996).

- **El límite de cuantificación (LC)**

Los límites de cuantificación para cada compuesto se pueden determinar utilizando el primer nivel de concentración de la sustancia bajo examen que se puede medir utilizando un procedimiento experimental dado (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 1996).

Según (Guedes *et al.* (2017) las definiciones en lo que respecta a “el límite de detección viene dado por la concentración al analito que genera una relación señal/ruido (signal/noise) igual a tres  $LOD = 3$ ” y “el límite de cuantificación viene dado por la concentración de analito que genera una relación señal / ruido igual a diez.  $LOQ = 10$ ”.

## **2.8. ESTUDIOS DE INVESTIGACIÓN DE HORMONAS ESTEROIDES**

Las hormonas son compuestos naturales y sintéticos que ahora se están detectando en el medio ambiente acuático importantes fuentes de agua que pueden verse afectadas por estos contaminantes emergentes, Los lagos son desagües y depósitos de cuencas hidrográficas que se ven alterados por el cambio en el uso del suelo y las condiciones ambientales (Sacdal *et al.*, 2020).

Las hormonas pueden llegar al medio a través de diferentes vías, siendo la fuente principal la descarga al medio de los efluentes de las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDARs), debido a la eliminación incompleta de estos compuestos que se produce en ellas (Raymond *et al.*, 2005).



El 17- $\alpha$ -etinilestradiol (EE2) pertenece a la creciente lista de sustancias químicas disruptoras endocrinas (EDC), capaces de interferir con el sistema endocrino tanto en vertebrados como en invertebrados. Independientemente de su gran dispersión en el medio, a la fecha aún se tiene poco conocimiento sobre sus mecanismos de acción y efectos nocivos en invertebrados (Bovier *et al.*, 2018).

La escorrentía de las granjas y los efluentes de las granjas y los afluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales se ven afectadas por estos contaminantes (Sacdal *et al.*, 2020) , y los lagos que recolectan descargas de las áreas urbanas se ven afectadas por este tipo de contaminantes, y su presencia provoca una alteración endocrina que puede afectar a los organismos acuáticos, como la inhibición del crecimiento gonadal y la supresión del espermatogénesis (Yang *et al.*, 2015), como también puede tener efectos adversos en el cuerpo humano como disruptor endocrino (Du *et al.*, 2013; Farré *et al.*, 2008; Ferrer *et al.*, 1997; Hernando *et al.*, 2006; Kuster *et al.*, 2004; López *et al.*, 2012) es por tanto importante determinar y monitorear estos contaminantes emergentes en los cuerpos de agua (Fent *et al.*, 2006; Gogoi *et al.*, 2018; Ismail *et al.*, 2019; Muñoz & Arroyave, 2017; Omar *et al.*, 2016)

En agua bruta de los ríos de Piracicaba SP, Brasil, se estudiaron las hormonas: el 17 alfa Etinilestradiol, 17 beta estradiol, y Estriol, El método se basó en la extracción en fase solida (SPE) determinación en la cromatografía líquida de alta eficiencia (N. H. Torres *et al.*, 2021).

Las hormonas se utilizan cada vez más en todo el mundo (N. H. Torres *et al.*, 2021) , como la hormona 17  $\alpha$ -Etinilestradiol (EE2), que es uno de los compuestos de las píldoras anticonceptivas que se utiliza como método anticonceptivo reversible más eficaz (González *et al.*, 2013), y ganadería; por tanto, son excretadas por humanos y



animales (Fent *et al.*, 2006), capaces de interferir con el sistema endocrino en vertebrados e invertebrados (Bovier *et al.*, 2018), mientras que hormonas como la Estrona (E1) y el estradiol (E2), son estrógenos endógenos catalizados por enzimas del citocromo P450 (CYP), que tienen actividad biológica en el hígado, los tejidos, las células diana extrahepáticas y las células diana extrahepáticas (Wang & Zhu, 2017; Zeng *et al.*, 2016; Zhu & Lee, 2005), produciendo metabolitos como la hidroxilación de estrógenos con una estructura similar pero con diferentes efectos fisiológicos después del metabolismo in vivo (Du *et al.*, 2013), todos estos compuestos se eliminan a través de la orina, heces humanas en diferentes cantidades, dependiendo de la edad, estado de salud, dieta, estado de gestación de la mujer y también a través del estiércol animal (González *et al.*, 2020).

Los estrógenos endógenos, 17-estradiol (E2) y Estrona (E1), experimentan un extenso metabolismo en animales y humanos, y un gran número de sus metabolitos hidroxilados y se han identificado en muestras biológicas. La formación de la mayoría de los metabolitos oxidativos de los estrógenos. es catalizada por las enzimas del citocromo P450 (CYP). Conocimiento preciso de la formación mediada por CYP de estos metabolitos, particularmente aquellos con actividades biológicas únicas (Zhu & Lee, 2005).

Las hormonas esteroides naturales y sintéticas, excretadas por humanos y animales de granja, se han considerado fuentes importantes de disruptores endocrinos ambientales. Se midió en el emisario de la planta de tratamiento de aguas residuales (EDAR) de la ciudad de Chascomús (provincia de Buenos Aires, Argentina), y aguas receptoras ubicadas aguas abajo y aguas arriba de la EDAR, utilizando extracción en fase sólida y líquido de alto rendimiento (Silva, Otero, & Esteves, 2012).



Asimismo, se están detectando hormonas de origen natural y sintético en el medio acuático (Sacdal *et al.*, 2020), como estrógenos en cuerpos de aguas continentales, afluentes y efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales (Deich *et al.*, 2021), debido a la ineficacia de tratamientos convencionales (N. H. Torres *et al.*, 2021); por lo tanto, lagunas que se originan en descargas de áreas urbanas se ven afectadas por este tipo de contaminantes, escorrentías de fincas y efluentes de aguas servidas y plantas de tratamiento de aguas servidas se ven afectados por este tipo de contaminante (Sacdal *et al.*, 2020), concentraciones de 85.15 ng L<sup>-1</sup>, 4.72 ng L<sup>-1</sup> y 64.24 ng L<sup>-1</sup> de E1, E2 y EE2, respectivamente, fueron encontrados en la planta de tratamiento de aguas residuales de la ciudad de Chascomús, Argentina (González *et al.*, 2020), y su presencia provoca disrupción endocrina que puede afectar a los organismos acuáticos como la inhibición del crecimiento gonadal y la supresión de la espermatogénesis (Wang *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2015), ya que también puede tener efectos adversos en el cuerpo humano como disruptor endocrino (Du *et al.*, 2013), importante para determinar y monitorear este tipo de contaminantes emergentes en cuerpos de agua (Kastelan & Korsic, 2007).

Así, se encontró que la presencia de hormonas en lagos como Laguna Lake, Filipinas era 0.03 y 0.30 ng L<sup>-1</sup> de E1 y 0.36 ng L<sup>-1</sup> de EE2 (Sta. Ana & Espino, 2020), en Buyukcekmece Lake, Estambul Turquía desde <0,5 ng L<sup>-1</sup> a 5,74 ng L<sup>-1</sup> de E1, <0,5 ng L<sup>-1</sup> a 10,2 ng L<sup>-1</sup> de E2 y <0,5 ng L<sup>-1</sup> a 11,7 ng L<sup>-1</sup> de EE2 (Aydin y Talinli *et al.*, 2013), mientras que en East Lake, Wuhan China, se encontraron nd a 9.62 ng L<sup>-1</sup> E1, nd a 17.26 ng L<sup>-1</sup> E2, y nd a 6.85 ng L<sup>-1</sup> EE2 se encontraron (Wang & Zhu, 2017; Wang *et al.*, 2018), también en Honghu Lake, China se encontró un promedio de 17.64 de E1, 7.26 ng L<sup>-1</sup> de E2 y 17.73 ng L<sup>-1</sup> respectivamente, así como en Dongting Lake, China un promedio de 5.63 de E1, 10.32 de E2, 3.04 de EE2, 3.04 ng L<sup>-1</sup> de EE2 (Yang *et al.*, 2015), por lo que existe preocupación por la contaminación emergente en muchos lagos,



que son fuentes importantes de agua, considerando que los lagos a veces son drenajes de cuencas y reservorios que se ven alterados por cambios en uso de la tierra y condiciones ambientales (Sacdal *et al.*, 2020). Por lo tanto, este estudio reporta la presencia de residuos de hormonas esteroideas en las aguas del interior de la bahía del lago Titicaca y agua potable en la ciudad de Puno.

La presencia de hormonas esteroideas en el medio ambiente, han sido catalogadas como “compuestos disruptores endocrinos” (EDCs), Las concentraciones de hormonas presentes en el medio acuático suelen ser del orden de  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ , por lo que se necesitan metodologías analíticas sensibles y selectivas para su determinación, La extracción en fase sólida, combinada con cromatografía líquida de alta o ultra resolución, cumple estas condiciones por lo que se ha elegido este proceso para realizar la extracción, preconcentración y determinación de estos compuestos en aguas residuales (Rayco *et al.*, 2017 b).

Los contaminantes emergentes son sustancias que tienen el potencial de dañar al ser humano, flora y fauna, y no están regulados por la legislación (Ramírez *et al.*, 2015).

El desarrollo y la optimización de un método analítico para la extracción simultánea, la determinación y la confirmación confiable de hormonas esteroideas naturales y sintéticas) en aguas ambientales y aguas residuales a niveles  $\text{ng L}^{-1}$ . Las muestras de agua se prepararon usando extracción en fase sólida y los extractos se analizaron mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem lineal con trampa de iones lineal, basado en el uso de una sola columna C8 y acetonitrilo como disolvente orgánico en la fase móvil (Jauković *et al.*, 2017).

Las aguas residuales porcinas (SW) son una fuente importante de antibióticos y hormonas (A&H) en el medio ambiente debido a su aplicación a gran escala en la



industria porcina, A&H en SW puede liberarse en el medio ambiente del agua a través de la descarga directa de SW, el efluente de las plantas de tratamiento de SW, y el escurrimiento y la lixiviación de tierras de cultivo contaminadas por desechos porcinos (Yang *et al.*, 2015).

La determinación de  $17\beta$ -estradiol en el afluente y efluente de una planta de tratamiento de agua residual de un hospital, la metodología incluye una extracción en fase sólida para la recuperación del analito en la muestra empleando el cartucho Oasis HLB, posteriormente la cuantificación de esta hormona por un método analítico desarrollado por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, utilizando la columna cromatográfica Symmetry C18 3,0×250 mm×5 $\mu$ m Waters con detección UV a 280 nm para lo cual se empleó una fase móvil compuesta por acetonitrilo: agua en proporción 60:40 con 0,1% de ácido fórmico, La calibración de  $17\beta$ -estradiol se realizó en un rango de 100 $\mu$ g/L-5000  $\mu$ g/L, mostrando una linealidad con un coeficiente de determinación igual a 0,9997, El límite de detección fue de 50  $\mu$ g/L y el límite de cuantificación de 100  $\mu$ g/L (Nieto, 2013).

Las hormonas en el agua del lago provienen de aguas de descarga en áreas urbanas, escorrentías agrícolas y efluentes de aguas residuales y plantas de tratamiento de aguas residuales. Se ha demostrado que la contaminación por hormonas en el agua afecta la reproducción y el crecimiento de ciertos organismos acuáticos. En esta revisión, se proporcionan antecedentes sobre la naturaleza química y las funciones fisiológicas de las hormonas y se describen los conocimientos existentes sobre la aparición y los impactos ecológicos de las hormonas en los lagos. Se describen los métodos analíticos disponibles para el muestreo, la extracción de analitos y el análisis instrumental. Esta descripción general proporciona información sobre las condiciones actuales de los lagos que pueden verse afectados por la contaminación hormonal (Sacdal *et al.*, 2020).



Sobre los efectos eco toxicológicos de las hormonas E3, E2 y EE2, se sabe poco acerca de su dispersión y daño ambiental en términos cuantitativos. Además, la biodegradación se convierte en el mecanismo principal de eliminación de los estrógenos esteroides en las plantas de tratamiento de aguas residuales, pero sigue siendo ineficiente, lo que muestra la importancia de estudiar procesos impulsados electroquímicamente como los Procesos Electroquímicos Avanzados de Oxidación (EAOP) y la electrocoagulación para la eliminación de micro contaminantes emergentes (N. H. Torres et al., 2021).

En las aguas superficiales de Laguna Lake, Filipinas. Laguna Lake es el lago más grande del país que tiene muchos usos, incluido el cultivo de peces y la fuente para la producción de agua potable. Las hormonas Estrona, 17-beta-estradiol, 17-alfa-etinilestradiol, progesterona y testosterona, así como el plastificante bisfenol A en el agua del lago, se determinaron mediante extracción en fase sólida y LC-MS / MS. El método de extracción exhibió buenas recuperaciones (75-90% en agua de lago enriquecida) mientras que el método instrumental de análisis tiene límites de detección bajos (0.01-0.24  $\mu\text{g} / \text{L}$ ) y buena respuesta lineal ( $> 99\%$  en el rango de concentración de 0-50  $\mu\text{g} / \text{L}$ ). En los nueve sitios de muestreo a lo largo del lago, se encontró Estrona en concentraciones entre 0.03 y 0.30  $\text{ng} / \text{L}$ . Se detectaron 17-beta-estradiol, testosterona y progesterona en algunos de los sitios en concentraciones de hasta 0,36, 0,22 y 2,05  $\text{ng} / \text{L}$ , respectivamente. Se detectó bisfenol A en todos los sitios en concentraciones más altas de 0,71 a 47,40  $\text{ng} / \text{L}$  (Sta. Ana & Espino, 2020).

Se investigó compuestos disruptores endocrinos (EDC) esteroides y fenólicos seleccionados en las aguas superficiales del río Bahe (China) utilizando espectrometría de masas por cromatografía de gases (GC-MS). Y su efecto sobre el salvaje *Hemiculter leucisculus*. Las concentraciones de 4-t-octilfenol, nonilfenol, bisfenol-A, estrona, 17  $\beta$ -



estradiol, 17  $\alpha$ -etinilestradiol y estriol fueron de hasta 126,0, 634,8, 1573,1, 55,9, 23,9, 31,5 y 5,2 ng L<sup>-1</sup> en el agua superficial y hasta 26,4, 103,5, 146,9, 14,2, 9,3, 13,8 y 1,3 ng g<sup>-1</sup> en el tejido muscular del pez, respectivamente (Hu *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2018; Zhu & Lee, 2005).

Zirena Vilca *et al.* (2021) estudiaron el impacto de los antibióticos sobre el agua potable, los tejidos de la trucha y el ecosistema acuático del lago. Se monitorizaron nueve antibióticos: tetraciclinas, sulfonamidas y fluoroquinolonas y se analizaron mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas y al sistema de extracción en fase sólida.



## CAPITULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. MATERIALES

- Lancha y equipos de Seguridad;
- GPS GARMIN Para ubicar los puntos de muestreo de agua
- Sonda multiparamétrica HORIBA;
- Botella, muestreador vertical NISKIN de 5 litros;
- Disco SECCI para medir la transparencia;
- Frascos de vidrio de 600 ml, color ámbar para guardar las muestras;
- Papel filtro Sartorius stedim grado 393;
- Cartuchos Strata TM -X 33 um Polymeric SPE Reversed Phase 500 mg/6 mL;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiencia (HPLC): modelo 1200 (Agilent Technologies) con arreglo de diodos (DAD)
- Orkstation (agilentn Chen Estation versión B,03,02) para integración;
- Columna Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (100 x 3 mm, 3,5  $\mu$ m) de 24 etapas
- Balanza analítica HA-202 m- and Company;
- Horno de columnas 1200 Series G1316A y válvula de 10 puertas;
- Cámara de vacío Visiprep DL TM, Supelco;
- Bomba binaria (bomba analítica) 1200 Series G1312A; inyector automático 1260 Infinity G1329A con adaptación para volumen hasta 900 pL;
- Desgasificador 1260 Infinity G4225A;
- Baño de ultrasonido Bandelin Sonorex RK5 10S
- Micropipetas de 10, 100, 200, 1000 uL; Balones volumétricos de 10 ml
- Otros materiales de laboratorio como bequer, probetas, pipetas tubos de ensayo



### 3.1.1. Solventes y reactivos

Los solventes y reactivos utilizados: metanol grado HPLC, agua ultrapura grado HPLC, nitrógeno.

### 3.1.2. Patrones analíticos

Los patrones utilizados fueron la estrona (E3), el  $17\alpha$ -etinilestradiol (EE2) y el  $17\beta$ -estradiol (E2), Las soluciones de estocaje de estos patrones fueron obtenidas a partir de la disolución de 10 mg del patrón en 10 ml de metanol, para la obtención de la concentración de 100 ug L-1, Los patrones de las hormonas y sus respectivos abastecedores están descritos en la Tabla 3,1.

**Tabla 3. 1** *Patrones de hormonas, Pureza, Abastecedor, Origen Formula molecular*

Hormona	Pureza	Abastecedor	Origen químico	Formula molecular
E3	99,0 %	Dr, Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Germany	Hormona natural	$C_{18}H_{24}O_3$
$17\alpha$ -EE2	98,5%	Dr, Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Germany	Hormona sintética	$C_{20}H_{24}O_2$
$17\beta$ - E2	99,0%	Dr, Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Germany	Hormona natural	$C_{12}H_{24}O_2$

Fuente (Torres et al 2014)

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1. Muestreo

El presente estudio considero nueve puntos de muestreo, los cuales fueron recolectados en marzo del 2020, en seis puntos ubicados en la bahía interior del lago Titicaca y tres puntos ubicados en la ciudad de Puno, abastecidas con agua potable y agua subterránea (pozo) (Figura 3.2; 3.3 y 3.4)

El muestreo se realizó con un muestreador de Teflon Niskin, el cual es apto para de agua del lago. Una vez tomada la muestra, se trasladó a un frasco de vidrio ámbar de 1L con tapa de rosca, la cual fue previamente esterilizadas; las muestras se muestras se mantuvieron a una temperatura inferior a 4°C, para evitar la degradación por fotolisis. Luego, las muestras se transportaron en cajas térmicas al mega laboratorio de la UNA-Puno., para proceder con el proceso de extracción.

En la Figura N° 3.3, se muestra los seis (6) puntos de la toma de muestra de agua ubicadas en Bahía interior del Lago Titicaca- Puno

- Para el área de estudio se definieron 6 puntos: (P1, P2, P3, P4, P5, P6) ubicados en la ruta laguna de oxidación Espinar- y la toma de agua (Chimú, distancia de 4 km), previamente analizados y discutido con especialistas del PELT-Puno. Los puntos se encuentran localizadas en la bahía interior del Lago Titicaca-Puno, como se muestran en la figura 3,3, y 3.4.
- Los puntos P1, P2, P3, P4, están ubicados en el canal de navío (Puno-Peru- Huaqui - Bolivia) siendo las distancias del P1 al P2 0.92 km, del punto P2 al punto P3 distancia de 1.670 km, y del punto P3 al punto P4 distancia de 0.48 km, del punto P4 al punto P5 distancia de 0.720 km, y del punto P5 al punto P6 de 0.520 km,, se



encuentran de la laguna de oxidación Espinar y la toma de agua Chimú, Punto P5, frente al hotel San Antonio, y punto P6 a 150 m del costado derecho de la laguna de Espinar.

- Los puntos P7, agua de consumo del Hospital del Seguro Social- Salcedo, punto P8, agua de consumo del Hospital Manuel Núñez Butron – Puno y punto P9, agua subterránea (pozo) de consumo de la ciudad universitaria – UNA- Puno,
- Las muestras P1 a P6 se tomaron el día 6 de marzo del 2020, desde las 10 de la mañana hasta las 14 horas del mismo día, Haciendo un recorrido de 10 km,
- Las muestras P7 a P9 se tomaron el día 7 de marzo del 2020, desde las 08 a 10 de la mañana del mismo día.
- Las muestras se tomaron según las normas de CETESB, ANA, 2011; y sugerencias del PELT -Puno, (Cetesb, 2011).

### **3.2.2. Determinación de parámetros físico -químicos de los puntos de muestreo**

Los parámetros físico químicos se muestran en la Tabla 4.4, se indican las coordenadas y los valores de los parámetros físico-químicos del agua, Temperatura, pH, Conductividad eléctrica, oxígeno disuelto, Solidos totales, salinidad, ORP, profundidad, transparencia y hora.

#### **3.2.2.1. Ubicación de los puntos de muestreo**

La ubicación de los 6 puntos de muestreo, en el lago Titicaca como la latitud y longitud se midió con GPS modelo EREX, vista HCx- Garmin. los datos se muestran en la Tabla 4.4. el equipo se muestra en la Figura N° 3.4

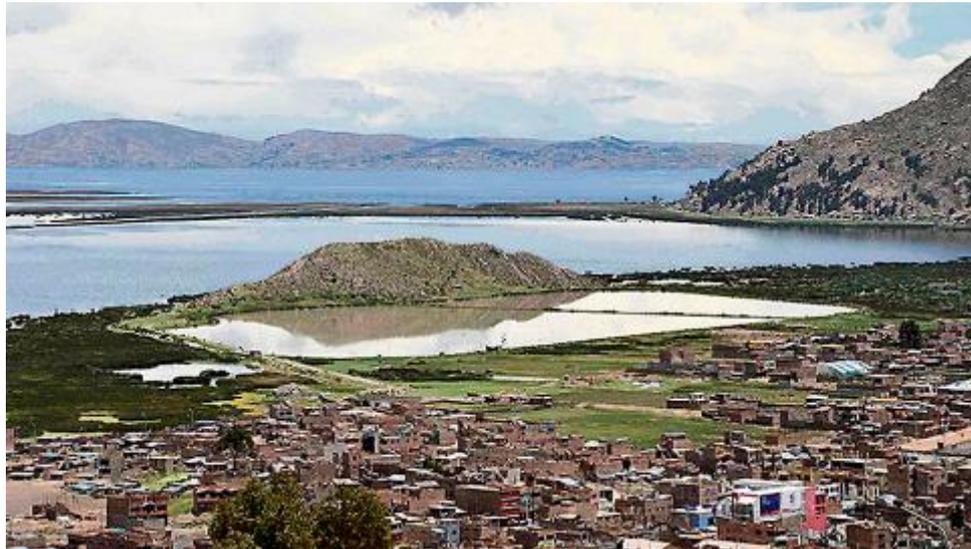


Para el agua potable de consumo de la ciudad de Puno se tomaron de tres lugares: P7, Hospital del Seguro Social – distrito de Salcedo-Puno, P8, Hospital Manuel Núñez Butrón – Puno y P9, agua subterránea (pozo) barrio Bellavista, esta es consumida en la ciudad universitaria-Puno.

**Tabla 3. 2** Datos de los puntos de muestreo, coordenadas de monitoreo, ubicación, profundidad y hora.

Código	Muestra	Coordenadas Del Monitoreo		Ubicación,	Profundidad Metros	Hora
		E	N			
<b>P1</b>	M1	397062	824735	Chimú	4,50	10,30
<b>P2</b>	M2	396217	824772	Canal Navio	5,20	11,00
<b>P3</b>	M3	394592	8248107	Punto medio	2,50	11,30
<b>P4</b>	M4	394186	8247850	Canal Navio	2,50	11,50
<b>P5</b>	M5	394186	8247850	Frente Hotel San Antonio	4,00	12,30
<b>P6</b>	M6	393934	8247078	150 m costado laguna Espinar	0,90	12,15
<b>P7</b>	M7	Hospital ESSALUD, Salcedo			9,20	8,00
<b>P8</b>	M8	Hospital, Manuel Núñez, B,			9,40	9,00
<b>P9</b>	M9	U.N.A.P. (pozo – Bellavista)			10,00	10,00

Fuente: Elaboración propia



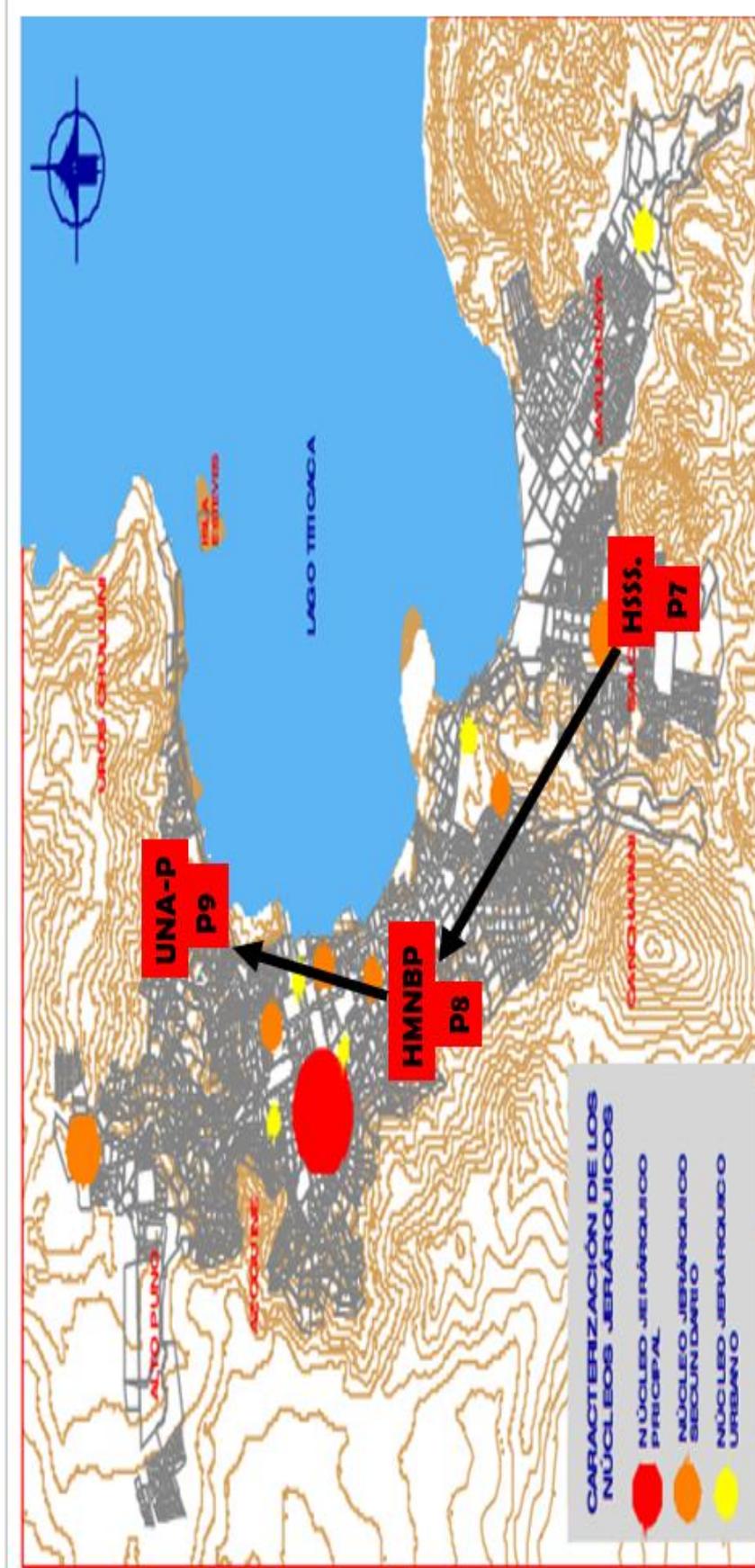
**Fuente:** Google, laguna de Espinar tratamiento de agua Puno.  
**Figura 3. 1** *Ubicación de la laguna de oxidación – Espinar- Puno*



**Fuente:** foto. Elaboración Propia  
**Figura 3. 2** *Toma de agua -Chimu ubicado a orillas del lago Titicaca - Puno*



**Fuente:** Elaboración Mapa Google – determinación de puntos de muestreo, Propia  
**Figura 3.3** Ubicación de los seis (6) Puntos, toma de muestras de agua de la Bahía interior del lago Titicaca- Puno



Fuente: Elaboración Mapa Google – Propia  
**Figura 3. 4** Ubicación de los tres (3) Puntos, toma de muestras de agua de la ciudad de Puno



**Figura 3.4 A.** *Equipo GPS Modelo EREX, Vista HCx- Garmin*



**Figura 3. 5** *Ecosonda FURUNO FCV-620*

### 3.2.2.2 Medida del pH

- Se midió el pH en los 9 puntos de muestreo, con el equipo Sonda multiparamétrica HORIBA (La Sonda Multiparamétrica para Análisis de Agua – Horiba U-50, mide y muestra hasta 11 parámetros de forma simultánea. Software intuitivo que asegura la facilidad de uso y la eficiencia en la operación). El equipo se muestra en la Figura N° 3.6, datos Cuadro N° 4,1.



**Figura 3. 6** *Equipo Sonda Multiparamétrica HORIBA*

### **3.2.2.3 Medida de la temperatura**

La temperatura en °C se midió en los 9 puntos de muestreo con el equipo Sonda multiparamétrica HORIBA Figura N° 3.6 y datos Cuadro N° 4,1 (Si bien este parámetro no tiene un valor límite establecido por la OMS y el Reglamento para Agua de Consumo Humano Reglamento de la Calidad de Agua para Consumo Humano D.S. N° 031-2010-S.A).

### **3.3.2.4 Medida de la corriente eléctrica CE**

La corriente eléctrica (CE) se midió en mS/m en los 9 puntos de muestreo con el equipo Sonda multiparamétrica HORIBA Figura N° 3.6, datos Cuadro N° 4,1 (De acuerdo al Reglamento de la Calidad de Agua para Consumo Humano D.S. N° 031-2010-S.A, el límite permisible de conductividad es 1500 uS; los valores medidos se encuentran por debajo del límite permisible.) El agua potable típica, se encuentra en un rango de 3,000 a 15,000  $\mu$ S/m,

### **3.2.2.5 Medida del oxígeno disuelto**

El oxígeno disuelto (OD) en mg L<sup>-1</sup>, % se midió en los 9 puntos de muestreo con el equipo la Sonda multiparamétrica HORIBA Figura N° 3.6, datos Cuadro N° 4,1 (Los valores normales varían entre los 7.0 y 8.0 mg/L.)



### **3.2.2.6. Medida del total de solidos disueltos (TDS)**

El TDS se expresa en gL-1 se midió en los 9 puntos de muestreo con la Sonda multiparamétrica HORIBA Figura N° 3, 6, datos Cuadro N° 4,1 (La agencia de protección ambiental (EPA) tiene un estándar de agua potable secundario para el TDS de no más de 500 mg/L).

### **3.2.2.7 Medida de la salinidad**

La salinidad en porcentaje, se midió en los 9 puntos de muestreo con la Sonda multiparamétrica HORIBA el equipo se muestra en la Figura N° 3.6, datos Cuadro N 4,1 (las aguas dulces, menor de 5 g L-1).

### **3.2.2.8 Medida de potencial redóx (ORP)**

El ORP en mili voltios, se midió en los 9 puntos de muestreo con el equipo Sonda multiparamétrica HORIBA Figura N° 3,6, datos Cuadro N 4,1 (Es decir el ORP indica si los microorganismos han sido destruidos independientemente de los niveles de pH o ppm del biocida.), el valor de 650 mV aceptable del agua. INTERNATIONAL STANDARDS FOR DRINKING WATER Ginebra, 1971.

### **3.2.2.9. Medida de la profundidad**

Se midió con el equipo Ecosonda FURUNO-FCV-620, con batería de 80 voltios el ecosonda se muestra en la Figura N° 3,5, y datos Cuadro N° 4,1.

### **3.2.2.10. Medida de la transparencia**

La transparencia en metros, en los 6 puntos de muestreo del lago con el DISCO SECCHI (Una medición de la turbidez puede ser usada para proporcionar una estimación

de la concentración de TSS (Sólidos Totales en Suspensión), lo que de otra forma es un parámetro tedioso y difícil de medir. Read more) .



**Figura 3. 7** *Medidor de turbidez disco SECCHI*

### **3.2.3 Extracción muestras de agua de la bahía interior del lago Titicaca–Puno**

Para la extracción de las muestras de agua a mitad de la profundidad de la superficie y fondo, se utilizó un muestreador vertical de Teflon Niskim de 5 litros, Figura N° 3.8.



**Figura 3. 8** *Muestreador Vertical de Teflon Niskym de 5L.*



**Figura 3. 9** *Toma de Muestra en Frasco de vidrio ámbar de 600 ml.*

- Frascos para guardar muestras de agua Para la colecta de las muestras de agua se utilizó frascos de vidrio de color ámbar con capacidad de 600 ml, los mismos que fueron lavados, y esterilizados, debidamente etiquetadas y colocadas en un cooler con hielo a temperatura de 4 °C, y se trasladaron al mega laboratorio de la Universidad Nacional del Altiplano -Puno, e inmediatamente filtradas.



**Figura 3. 10** *Frascos de Vidrio. Ámbar de 600 ml*



**Figura 3. 11** *Coolerd, para traslado de los frascos con muestras de agua*

- Se filtró en papel filtro Filter Discs (Quant) Grade 393 100 g/m<sup>2</sup>, usando un sistema de extracción al vacío, para sustracción de material particulado, como

se muestra en la Figura N°3,12; en la muestra del punto P5 se detectaron pulgas acuáticas en gran número, como se muestra Figura N° 3,13.



**Figura 3. 12** *Filtración para eliminar solidos suspendidos*



**Figura 3. 13** *Filtración – pulgas acuáticas punto P5 (frente Hotel San Antonio)*

#### **3.2.4. Preparación de la muestra**

Las se filtraron al vacío con un filtro de papel de tamaño de poro de 2,5, um para eliminar las partículas de la muestra para el proceso de extracción de hormonas, los cartuchos de extracción de fase solida STRATA Polymeric Reversed Phase 500 mg/ 6mL, Figura 3.14.



**Figura 3. 14** *Cartuchos de extracción solido liquido Strata Polymeric (SPE)*

Se acondicionaron previamente con 5 mL de agua ultrapura, seguido de 5 mL de metanol de grado HPLC, para cada muestra filtrada, usando un sistema de extracción al vacío, Figura N° 3,15.



**Figura 3. 15** *Acondicionamiento de los Cartuchos con Metanol HPLC y Agua Ultrapura*

- Las muestras de agua se pasan a través de los cartuchos SPE acondicionados, en una cantidad de 400 ml, logrando la adsorción de las hormonas, usando un sistema de extracción al vacío, para su posterior elución, la operación se muestra en la Figura N° 3,16



**Figura 3. 16** *Extracción Solido Liquido en Cartucho SPE. Extracción al Vacío*



**Figura 3. 17** Embalaje de los Cartuchos (SPE) para traslado (4°C)

- Los cartuchos SPE, conteniendo las hormonas adsorbidas, se embalan en papel aluminio y se guardan a 4°C, para ser trasladados hasta el Centro de Energía Nuclear para la Agricultura (CENA) en la Universidad de Piracicaba, USP-Brasil, tal como se muestra en la Figura N° 3,18.



**Figura 3. 18** Placa de la Universidad de Piracicaba - CENA-USP. Brasil

- La extracción de hormonas de los cartuchos SPE se realizó en el Laboratorio de Ecotoxicología – Centro de Energía Nuclear para la Agricultura (CENA) universidad de Piracicaba- USP- Brasil: Figura 3,19 sala de laboratorio.



**Figura 3. 19** Laboratorio de Ecotoxicologías donde está ubicado los HPLC

- Extracción de las hormonas adsorbidas en el SPE de los cartuchos. siguiendo los protocolos del laboratorio y uso de materiales del CENA.
- Primero. los cartuchos se enjuagaron con 5 mL de agua ultrapura calidad HPLC a un caudal de 1,5 mL min<sup>-1</sup>,
- El proceso de elución se desarrolló utilizando 10 mL de metanol de calidad HPLC y se colocaron en tubos de ensayo de punta.
- Posteriormente, las muestras se secaron en un turbo vapor a una temperatura de 40°C y con un flujo constante de nitrógeno a 12 PSI.
- Una vez que la muestra estuvo casi seca, se reconstituyo con 1 mL de metanol de grado HPLC al 50% y una solución de agua ultrapura al 50%.
- Se filtró y se transfirió a un vial para su posterior análisis por HPLC-DAD; este método de extracción fue validado previamente por Hortense Torres, (2014) en el laboratorio donde se realizaron los análisis del presente estudio, tal como se muestra en las Figuras N°.3.20



**Figura 3. 20** *Filtró de Fibra de Vidrio de 0,45  $\mu$ m. cámaras de vacío*



**Figura 3. 21** *Desgasificación. en Ultra – son BRANSON 25 10*

- Los cartuchos se lavaron 2 veces con 4 ml de agua ultrapura con un flujo de 1.5 mL min<sup>-1</sup> y el agua de lavado se desechó y se secó al vacío durante 30 min., se muestra en la Figura 3. 22 los cartuchos se colocan en el equipo de vacío.



**Figura 3. 22** *Equipo para el lavado de cartuchos con hormonas*



**Figura 3. 23** *Tubos con elución de las hormonas*



**Figura 3. 24** *Secado de solución eluida con flujo de N<sub>2</sub> a 30°C*



**Figura 3. 25** *Dilución del euliato con alcohol metílico grado HPLC*



**Figura 3. 26** *Soluciones eulidas de las muestras en viales para el HPLC*



### 3.2.5. Análisis cromatográficos por HPLC–DAD

- Los análisis de determinación y cuantificación de hormonas se realizaron en el laboratorio de Energía Nuclear para la Agricultura - ecotoxicología de CENA- de la Universidad de Piracicaba- USP-Brasil. Según:
- Los análisis cromatográficos se realizaron en un cromatógrafo HPLC-DAD en fase líquida (Agilent, modelo 1200), con una columna Agilent Zorbax Eclipse Plus C 18 (100 x 300 mm, 3,5,  $\mu\text{m}$ .) .
- Las Condiciones cromatográficas utilizadas se muestran en la Tabla 3,2. Para la cuantificación de las hormonas presentes en las muestras, se prepararon soluciones estándar de los patrones hormonales Estrona (E1),  $17\ \alpha$  etinilestradiol (EE2) y  $17\ \beta$ -estradiol (E2) por triplicado en concentraciones de 0.5, 1,3,6 y  $10\ \mu\text{gL}^{-1}$  respectivamente, estas soluciones fueron preparadas en metanol grado HPLC (Peng et al., 2008; Torres 2014).
- La fase móvil consistió en 20:80 (V7V) (A/B) (el agua ultra pura de la fase móvil A con 5 mmol de formiato de sodio y la fase móvil B era metanol de grado HPLC).
- Se utilizó en modo isocrático a un caudal de  $1\ \text{mL}^{-1}$  , con un volumen de inyección de  $10\ \mu\text{L}$  para todas las muestras y estándares.
-



**Figura 3. 27** *Muestras patrón de hormonas en estudios*



**Figura 3. 28** *Balanza analítica de 0.0001  $\mu$ g pesada de muestras patrón*



**Figura 3. 29** *Preparación de soluciones con hormonas patrón*



**Figura 3. 30** *Viales con soluciones preparadas para curva de validación*



**Figura 3. 31** Selección de Columna Optima. Para el HPLC



**Figura 3. 32** Columna Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (100 x 3 mm, 3,5  $\mu$ m) de 24 etapas.



**Tabla 3. 3** Condiciones Cromatográficas del HPLC -DAD para análisis de las hormonas en agua

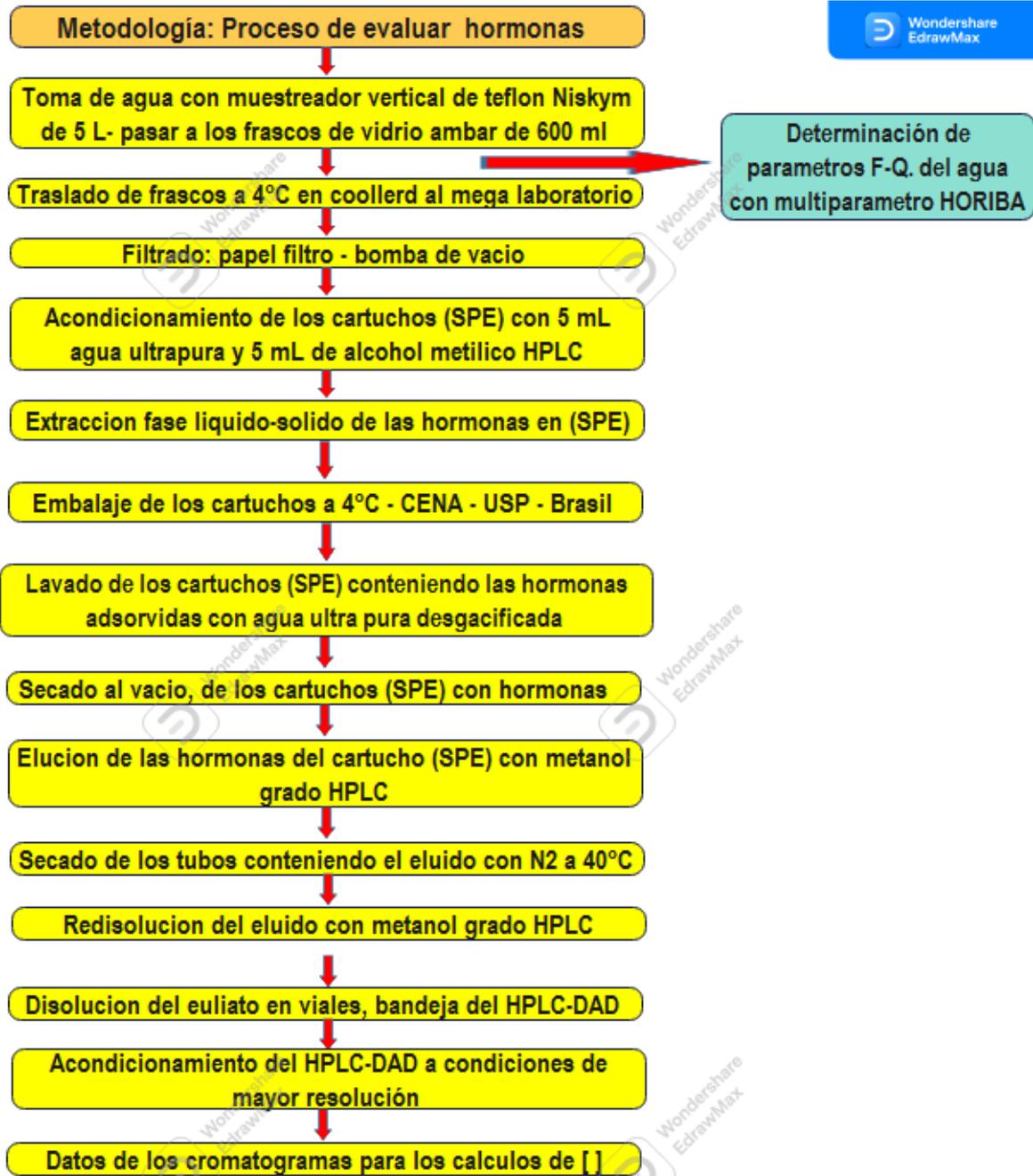
Condiciones	Columna Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (100 x 3 mm, 3,5 $\mu$ m) de 24 etapas
Flujo	1 mL min <sup>-1</sup>
Longitud de onda	282 nm
Tiempo de corrida total	15 minutos
Volumen de inyección	Loop de 10 $\mu$ L
Tiempos de corrida de cada hormona	17 $\beta$ -E2: 6.419 min; 17 $\alpha$ -EE2: 7.525 min; E1: 8.620 min
Temperatura de la columna	30°C
Detector	Arreglo de Diodos (DAD)

**Fuente: Elaboración Propia**

### 3.2.6. ANÁLISIS CUALITATIVA Y CUANTITATIVA

Según (Esteves et al., 2009) los análisis cualitativa y cuantitativa de las hormonas fueran maximizadas utilizando los cromatogramas con los patrones en concentraciones diferentes.

- Las concentraciones de 0,5, 1,0; 3,0; 6,0 y 10  $\mu$ g L<sup>-1</sup>, para determinar la selectividad, la linealidad, la precisión y la exactitud, para moléculas de las hormonas Estrona E1; 17  $\beta$ -estradiol E2 y 17  $\alpha$ -etinilestradiol EE1, que presentan mejor respuesta, se presentan en las Figuras 3.35 y Anexos respectivamente.



Fuente: Elaboración propia

**Figura 3. 33** *Flujograma de evaluación las hormonas esteroides*

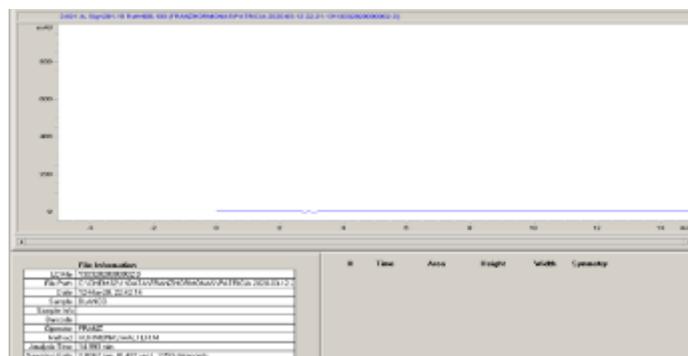
### 3.3. METODOLOGÍA DE LA DETERMINACIÓN DE HORMONAS ESTEROIDES EN AGUA DEL LAGO TITICACA – PUNO Y AGUA POTABLE DE LA CIUDAD DE PUNO

#### 3.3.1. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

##### 3.3.1.1. Selectividad

Siguiendo el protocolo de Torres & Valdemar, 2009, CENA. Se utilizó el HPLC con Detector con Arreglo de Diodos, y se tiene los estudios de selectividad:

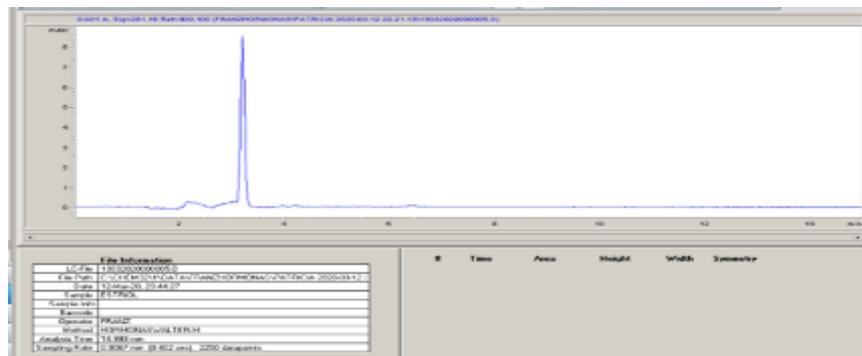
Para la evaluación de la selectividad, se realizó una muestra en blanco el cual el cromatograma da una línea recta, siendo en ese caso, no presenta ninguna interferencia para los tiempos de corrida como se muestra en la Figura N° 4.1 cromatograma de muestra en blanco y así se tiene los cromatogramas de las hormonas patrón en estudio y su tiempo de corrida y estas se muestran bien separadas como se muestran en las: Figura N° 3.35. cromatograma del 17  $\beta$ - estradiol E2, con un tiempo de recorrido de 6.419 minutos. Figura N° 3.36. cromatograma del 17  $\alpha$ -etinilestradiol EE2, con un tiempo de recorrido de 7.525 minutos y la Figura N° 3.37. cromatograma de la estrona E2, con su tiempo de corrida de 8.616 minutos la respectivamente siguiendo los ítems 3.3.8.4.



Fuente Elaboración propia

**Figura 3. 34** Cromatograma de corrida de solución en Blanco

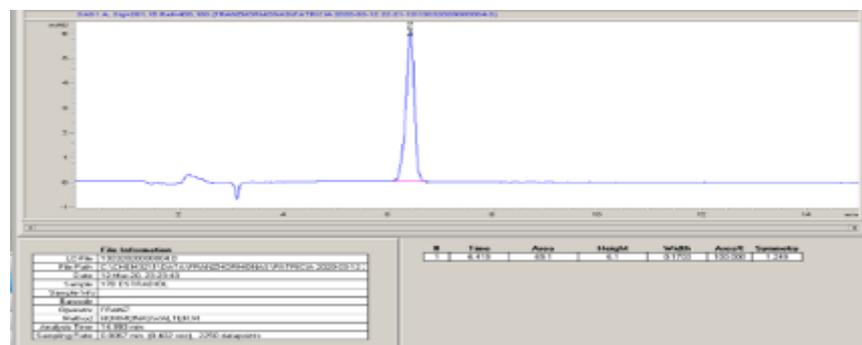
Este cromatograma muestra, que la fase móvil no contiene ningún tipo de sustancias, que causen alteración por tanto es una línea recta en todo el tiempo de corrida.



Fuente Elaboración propia

**Figura 3. 35** Cromatograma de corrida solución hormona patrón.  $17\beta$ -estradiol E2

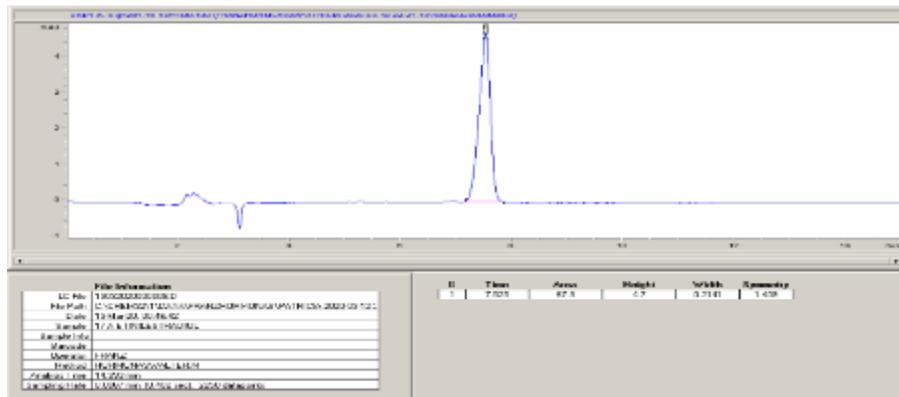
Este cromatograma muestra el pico del  $17\beta$ -estradiol (E2) , patrón, en forma nítida y bien definida, el tiempo de recorrido. En el cuadro de file information, muestra el nombre del investigador, el método y condiciones.



Fuente Elaboración propia

**Figura 3. 36** Cromatograma de corrida solución hormona patrón  $17\alpha$ -etinilestradiol (EE2)

Este cromatograma muestra el pico del  $17\alpha$ -etinilestradiol (EE2), patrón, en forma nítida y bien definida, el tiempo de recorrido. En el cuadro de file information, muestra el nombre del investigador, el método y condiciones.



Fuente Elaboración propia

**Figura 3. 37** Cromatograma de corrida de solución hormona patrón estrona E2

Este cromatograma muestra el pico de la estrona (E2), patrón, en forma nítida y bien definida, el tiempo de recorrido. En el cuadro de file information, muestra el nombre del investigador, el método y condiciones.

La validación de un método analítico consiste en asegurar que sea exacto, específico y reproducible dentro de un rango de concentración de interés en el cual se va a analizar uno o varios analitos.

El método cromatográfico empleado fue considerado selectivo.

### 3.3.1.2. Linealidad

La linealidad del sistema cromatográfico para las hormonas estrona (E1), 17  $\beta$ -estriol (E2) 17  $\alpha$ - etinilestradiol (EE2).

Las ecuaciones de recta y los valores de los coeficientes de correlación ( $r^2$ ) se presentan en la Tabla N° 4.2, para el método cromatográfico aplicado a la estrona (E1), 17  $\beta$ - estradiol – (E2) , 17  $\alpha$ - etinilestradiol – (EE2) , se utilizó 5 puntos con inyecciones en triplicado para cada punto de la curva de calibración, así como (Esteves et al., 2009; Peng et al., 2008).

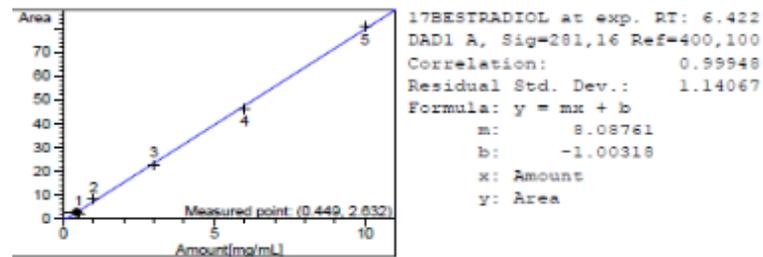
**Tabla 3. 4** Coeficientes de correlación ( $r^2$ ) cromatográfico de : (E1) , 17  $\beta$ - (E2) , 17  $\alpha$ - (EE3)

Hormona	Coefficiente de correlación ( $r^2$ )	Ecuación de recta
Blanco	1.0000	$y = mx \pm b$
estrona E1	0.99935	$y = 7.88716x - 1.16059$
17 $\beta$ - estradiol - E2	0.99948	$y = 8.08761x - 1.00318$
17 $\alpha$ - etinilestradiol – EE2	0.99952	$y = 7.54504x - 0.885263$

Fuente: elaboración propia

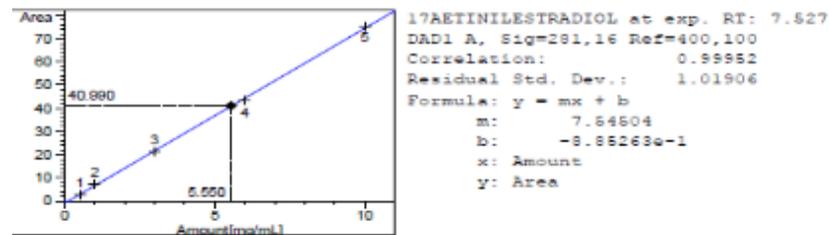
La linealidad fue observada en la concentración hecha de 0.5 1,3,6, y 10  $\mu\text{L}^{-1}$  para el método analítico, esta fue obtenida a través de la curva patrón.

Los resultados del estudio de linealidad para las hormonas estrona, (E1) ; 17  $\beta$ - estradiol – (E2) , 17  $\alpha$ - etinilestradiol – (EE2) , se presentan en la Figura 3.39 , 3.40 y 3.41 en los cuales se muestran los valores de los coeficientes de correlación de Pearson al cuadrado ( $r^2$ ), Siendo, Estrona (E1) = 0,99935, 17  $\beta$ - estradiol – (E2) = 0.99948, y 17  $\alpha$ - etinilestradiol – (EE2) = 0.99952, respectivamente, se ha determinado que los coeficientes de determinación sean superiores a  $r^2 \geq 0,99$ : que indica la bibliografía, así se muestra que:  $0,99935 > 0,99$ ;  $0.99948 > 0,99$ ;  $0.99952 > 0,99$ , los cuales cumplen con los criterios de aceptación de acuerdo a Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), 2005.



**Figura 3. 38** Curva de calibración de la 17  $\beta$ - estradiol – (E2)

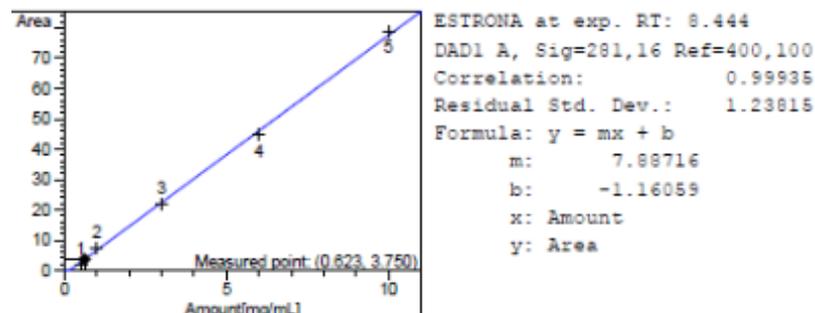
La linealidad de la 17  $\beta$ - estradiol – (E2) fue observada en la concentración hecha de 0.5 1,3,6, y 10  $\mu\text{L}^{-1}$  nos da 5 puntos, para el método analítico, esta fue obtenida a través de la curva patrón, y de esta se deduce la correlación  $r^2$ .



**Figura 3. 39** Curva de calibración de la 17  $\alpha$ - etinilestradiol – (EE2)

Obtenida por la Inyección de 5 Puntos

La linealidad de Calibración de la 17  $\alpha$ - etinilestradiol – (EE2) fue observada en la concentración hecha de 0.5 1,3,6, y 10  $\mu\text{L}^{-1}$  nos da 5 puntos, para el método analítico, esta fue obtenida a través de la curva patrón, y de esta se deduce la correlación  $r^2$ .



**Figura 3. 40** Curva de calibración de la estrona (E1)



La linealidad de la estrona (E1) fue observada en la concentración hecha de 0.5 1,3,6, y 10  $\mu\text{L}^{-1}$  nos da 5 puntos, para el método analítico, esta fue obtenida a través de la curva patrón, y de esta se deduce la correlación  $r^2$ .

### 3.3.1.3. Precisión

Todo método analítico cuantitativo debe ser preciso a la hora de calcular una determinada concentración y la precisión de este debe calcularse en condiciones de repetitiva y reproducibilidad. Para ello se calcula la desviación estándar relativa y nos da los siguientes valores.

*Tabla 3. 5 Desviación estándar de las hormonas esteroide en estudio*

Hormona	Desviación estándar
estrona E1	1.23815
17 $\beta$ - estradiol - E2	1.140667
17 $\alpha$ - etinilestradiol – EE2	1.01906

Los valores de los coeficientes de desviación estándar varían entre 1, 01906 y 1,2381 presentando baja dispersión de los datos.



## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### **4.1. EVALUACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS HORMONAS ESTEROIDES EN MUESTRAS DE AGUA DEL LAGO TITICA Y DE AGUA POTABLE DE LA CIUDAD DE PUNO**

Para la determinación y cuantificación de las hormonas estudiadas se realizaron en base a los ítems: 2.7, 2.7.2, 2.7.3, 3.1.2., 3.2.1., 3.2.3., 3.2.4., 3.2.5, 3.3 señalados, y su validación basada en los estudios de (Torres et al., 2020)

##### **4.1.1. Resultados de concentración en ng L-1 de las hormonas estudiadas E2, EE1 y E1**

En la en la Tabla N° 4.1 se muestran la concentración de hormonas esteroides expresado en ngL-1 en los nueve (9) puntos de muestreo

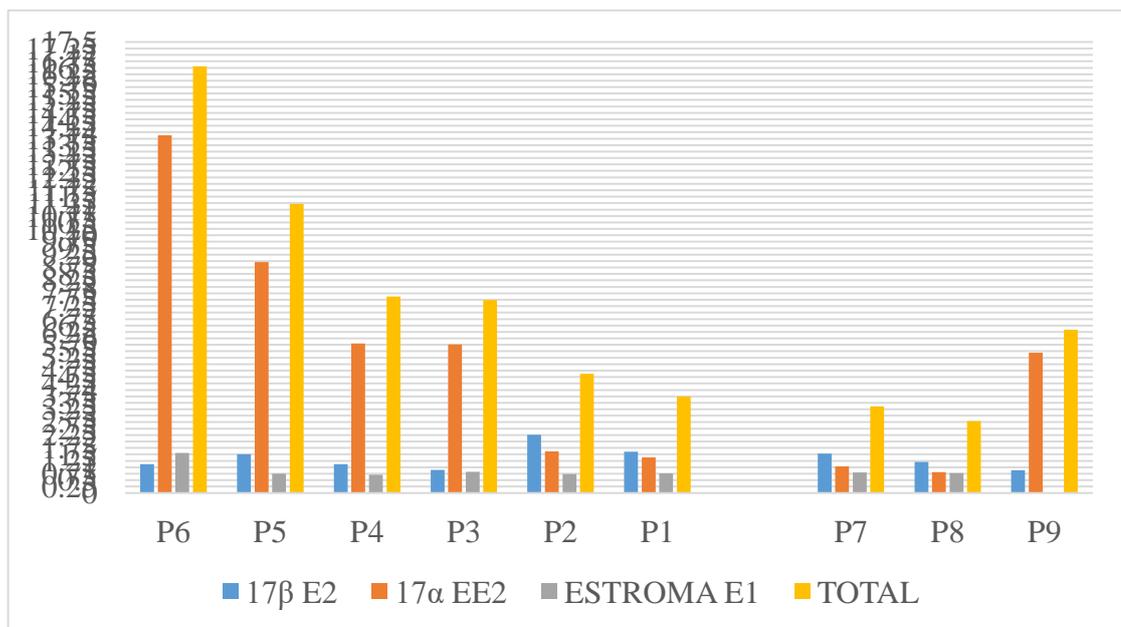
**Tabla 4. 1** Concentración de hormonas esteroideas en ngL-1 de los nueve (9) puntos de muestreo

Hormonas	P6	P5	P4	P3	P2	P1	P7	P8	P9
<b>17 β-estradiol E2</b>	1,12373	1,49946	1,115818	0,89627	2,26543	1,60628	1,53055	1,20884	0,8835
<b>17 α-etinilestradiol EE2</b>	13,87503	8,96513	5,7982	5,7643	1,62066	1,384	1,0295	0,81464	5,4493
<b>Estrona E1</b>	1,55646	0,74785	0,71553	0,82663	0,74205	0,76067	0,79838	0,77392	0,0000
<b>Total</b>	16,55521	11,21244	7,62955	7,48719	4,62814	3,75095	3,35839	2,7974	6,3328

Fuente: Elaboración propia

**P6**, Laguna de Espinar; **P5**, Frente hotel San Antonio; **P4**, Canal de navío; **P3**, Canal de navío,  
**P2**, Canal de navío; **P1**, Chimu toma de agua; **P7**, Hospital del Seguro Social – Salcedo- Puno  
**P8**, Hospital Manuel Nuñez Butron - Puno **P9** . Pozo subterráneo – Barrio Bella vista – Puno  
**P9**, Ciudad Universitaria (poso de Bellavista

Los resultados de la Tabla 4.1. evidencia la existencia de residuos de hormonas en los puntos considerados en este estudio. Esta presencia podría atribuirse a la descarga de aguas residuales domesticas a la laguna de oxidación-Espinar, la cual es ineficiente en la degradación y/o remoción de residuos hormonales, y los PTARs no cumplen esta función, (Torres et al., 2021) Así, en el punto P6 , el principal punto de salida (laguna de oxidación) presenta concentraciones de 17  $\alpha$ -etinilestradiol (EE2) , de 13,88 ngL-1 y estrona (E1) 1,56 ngL-1, así como 17  $\beta$ -estradiol (E2) 1.12 ngL-1 y a medida que recorre hasta llegar al punto P1-Chimu –(toma de agua para PTAP.) estas concentraciones disminuyen como se muestra en la Figura 4.1.



Fuente Elaboración propia

**Figura 4. 1** Representación gráfica, concentración de hormonas Vs puntos de estudios P6 a P1 agua del lago y P7 a P9 agua de consumo–Puno.

Esta cuantificación expresada en nanogramos por litro (ngL-1) se obtienen de los resultados dados por el cromatograma del HPLC-DAD. ¡Así como ejemplo tomamos los valores del cromatograma del punto P6, costado de la laguna de oxidación – Espinar que es la parte más contaminada y disminuyendo sus valores en el recorrido hasta el punto P1

y los datos del cromatograma del punto P9 que es agua subterránea (pozo) que va a la ciudad universitaria para consumo que no presenta residuos de la hormona Estrona.

**Tabla 4. 2.** valores dados por el cromatograma del punto P6

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/mL]	Grp	Name
6.358	VV T	2.63213	1.70771e-1	4.49491e-1		17BESTRADIOL
7.209	BV R	40.98977	1.35400e-1	5.55001		17AETINILESTRADIOL
8.616	VB T	3.74982	1.66030e-1	6.22582e-1		ESTRONA
Totals :				6.62208		

Fuente: Resultado del HPLC – CENA- 2020

**Tabla 4. 3** valores dados por el cromatograma del punto P9.

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/mL]	Grp	Name
6.430	BV R	1.85503	1.90512e-1	3.53406e-1		17BESTRADIOL
6.832	VB	15.56115	1.40077e-1	2.17977		17AETINILESTRADIOL
8.444		-	-	-		ESTRONA
Totals :				2.53317		

Fuente: Resultado del HPLC – CENA-2020

El resto de los cromatogramas indicando el área, valores de las hormonas en estudio y sus curvas de validación se adjunta en los anexos ANEXO B. Cromatograma del P5, ANEXO C. Cromatograma del P4, ANEXO D. Cromatograma del P3, ANEXO E Cromatograma del P2. ANEXO F. Cromatograma del P1 (Chimu). ANEXO G. Cromatograma del P7 Hospital del Seguro Social – Salcedo. . ANEXO 8. Cromatograma del P8 Hospital Manuel Núñez Butron – Puno

Como no hay en la legislación peruana límites establecidos para las hormonas E1, E2, EE2, en agua tratada, los niveles de hormonas en las muestras analizadas no pueden



ser clasificadas adecuadamente, en lo que concierne a los límites permitidos para consumo humano. Con base en estas informaciones, Reglamento de la calidad del agua para consumo humano. Ministerio de Salud Perú. Necesita establecer urgentemente valores máximos permisibles para estos compuestos en aguas de abastecimiento público.

#### **4.1.2. Comparacion y discusion de resultados de las hormonas estudiadas**

En este recorrido de aproximadamente de 5 km desde el punto P6 laguna de oxidación- Espinar hasta la toma de muestra el punto P1- Chimu. La suma de las tres hormonas que es la concentración total de 16,5552 ng L<sup>-1</sup> disminuye a 3,35839 ng L<sup>-1</sup> y que estos valores del punto P1 con los valores de los puntos P7 y P8 que son agua potable de consumo no hay diferencia significativa y ahí el problema de la salud de la población. Esto se debe a su dispersión en agua la distancia y movimiento de las aguas, profundidad y transparencia y radiación solar

Referente al punto P9 que es agua subterránea (pozo), agua que sirve a la ciudad universitaria esta agua contiene 5,4493 ngL<sup>-1</sup> de EE2, aproximadamente igual al punto P4 del agua del lago de 5,7982 ng L<sup>-1</sup>, esta agua subterránea no contiene estrona. La existencia de esta cantidad de EE2, se debe a la existencia de desagües clandestinos y a que la gente micciona en la via pública .. concentración total, la suma de las tres (3) hormonas en estudio del 17  $\alpha$ -etinilestradiol (EE2) disminuye a 1,384 ngL<sup>-1</sup>.

Considerando que estos compuestos químicos tienen propiedades lipofílicas (Langenbach, 2003-9) , baja presión de vapor entre 2.3 x 10<sup>-10</sup> y 6.7. x 10<sup>-15</sup> mm Hg, y también presentan valores de log Kow de los esteroides de 2.81 para estriol y 3.94 para 17  $\beta$ -estradiol (E2) mientras que el esteroide 17  $\alpha$ -etinilestradiol (EE2) tiene un valor de Log Kow de 4,15 . Una característica de estos compuestos que les permite no ser solubles en agua por lo que se espera que sedimentos y es causa de concentraciones reducidas en



la fase acuosa (Adeel et al., 2017), así como el efecto de la exposición solar que produce una foto transformación de (E2) y (EE2) con un rendimiento de 0.06 mol de einstein<sup>-1</sup> a una irradiación de 254 nm. (Mazellier et al., 2008).

La concentración de 17  $\beta$ -estradiol E2 en el punto 1 fue de 1,61 ng L<sup>-1</sup>, esto es menor que la encontrada en Lake Luoma, China, que osciló entre 2,52 ng L<sup>-1</sup> y 21,82 ng L<sup>-1</sup>, con una concentración media de 9,41 ng L<sup>-1</sup> (Dan Liu et al., 2017), y similar al encontrado en el lago Buyukcekmece, Estambul (Turquía) que osciló entre <0.5-10.2 ng L<sup>-1</sup> (Aydin y Talinli, 2013) estos valores están relacionados con densidad de población. La presencia de estos compuestos en el ecosistema de la bahía interior del lago podría tener efectos toxicológicos sobre las especies endémicas que habitan este ecosistema. El 17  $\beta$ -estradiol (E2) es capaz de producir la oxidación de macromoléculas, generando la formación del anión radical superóxido (Cavaliere et al., 2000), que provoca la pérdida de propiedades fisicoquímicas que pueden resultar en la muerte celular por exposición prolongada, por lo que a 2  $\mu$ g L<sup>-1</sup> de 17  $\beta$ -estradiol afecta varios procesos fisiológicos, incluidos el espliceosoma, la fototransducción, el metabolismo del aminoazúcar y el azúcar nuclear, el metabolismo de la hipotaurina y el sistema renina-angiotensina. Se evidenció que la exposición de juveniles de *O. curvinotus* a concentraciones crecientes de 17  $\beta$ -estradiol (2 ng L<sup>-1</sup>, 20 ng L<sup>-1</sup>, 200 ng L<sup>-1</sup> y 2  $\mu$ g L<sup>-1</sup>) conduce a un aumento significativo en la Expresión de ARNm de vitelogeninas (VTGS) y coriogeninas (CHGS) (Dong et al., 2020).

La concentración de 17  $\alpha$ -etinilestradiol EE2 en el punto 1 fue 1.38 ng L<sup>-1</sup>, que es menor que la encontrada en Lake Luoma, China (4.25 ng L<sup>-1</sup> a 12.85 ng L<sup>-1</sup>; concentración media de 7.97 ng L<sup>-1</sup>) (Dan Liu et al., 2017). Sin embargo, en el punto 6 (vertido) fue de 13,88 ng L<sup>-1</sup>, menor que el encontrado en las aguas residuales y revertir



a la laguna Chascomús, Argentina de 64,24 ng L-1 y 47,55 ng L-1 (a 200 m). (González et al., 2020), esta diferencia podría atribuirse a la densidad poblacional que genera aguas residuales domésticas, efluentes cloacales, acuicultura, escorrentías de ganadería (Zhou et al., 2016), aguas industriales (Jia et al., 2019). Asimismo, el 17- $\alpha$ -etinilestradiol es un inhibidor no translocante y no competitivo de los aminoácidos acoplados a protones (Nielsen et al., 2021) siendo capaz de inducir alteraciones en el sistema endocrino en organismos vivos a concentraciones en el agua por debajo de 1 ng L-1 (Hansen et al., 1998; Purdom et al., 1994).

La presencia de estrona E1 en el punto 1 fue de 0,76 y es superior a la reportada en aguas superficiales de Laguna Lake, Filipinas (0,03 y 0,30 ng L-1) que se utiliza para la producción de agua potable (Katrina y Espino, 2020) y el Langat. El río también se usa como fuente de agua potable en Malasia (0.09-0.18 ng L-1; media de 0.12 ng L-1  $\pm$  0.04) (Wee et al., 2019). En el punto 6 fue 1.12 ng L-1, menor a lo reportado en aguas residuales y revertió a la laguna Chascomús, Argentina de 85.15 ng L-1, 56.11 ng L-1 y 1.54 (a 300 m aguas arriba) (González et al., 2020). La estrona se convierte en estriol por procesos naturales en las aguas superficiales (Aydin y Talinli, 2013) mientras que las altas concentraciones de E1 (> 10 mg L-1) disminuyen significativamente la productividad de las sustancias poliméricas extracelulares y la actividad metabólica (Zhang et al., 2021).

Varios estudios han demostrado un desarrollo anormal de peces en agua con residuos de hormonas, como la feminización de peces machos, que afecta la reproducción e induce la producción de vitelogenina (Torres et al., 2021), el crecimiento de ciertos organismos acuáticos (Sacdal et al., 2020), Por tanto, es importante considerar las concentraciones de toxicidad en la vida de los peces, teniendo en cuenta la naturaleza lipofílica de las hormonas que colaboran con la bioacumulación; en el pez *Carrasius*



auratus después de 72 horas de exposición dietética que contenía 100 ng g<sup>-1</sup> de EE2, la concentración fue de 1,7 ng g<sup>-1</sup> ± 0,29 (Al-Ansari et al., 2011).

Sin embargo, la presencia de residuos de hormonas en los puntos 7 y 8 (agua potable) genera preocupaciones sobre la posible exposición humana a compuestos disruptores endocrinos a través de la ingesta dietética de alimentos y especialmente el suministro de agua potable. (Wee et al., 2019). Los residuos de hormonas estaban dentro del rango encontrado en aguas tratadas en las regiones norte, centro y sur de Taiwán E1 ND - 2.3 ng L<sup>-1</sup>, E2 ND - 4.8ng L<sup>-1</sup>, y EE2 ND - 3.8 ng L<sup>-1</sup> (Pai et al., 2020); Los estrógenos 17-β-estradiol (E2) y 17-α-etinilestradiol (EE2) se consideran agentes altamente disruptores endocrinos y se han incluido en la lista de seguimiento de la UE sobre contaminantes acuáticos emergentes debido a su presencia en tejidos y fluidos animales (Barreiros et al., 2016).

El punto P9 es agua subterránea de pozo que consumen en la ciudad universitaria. Según los estudios realizados en aguas subterráneas por los autores: (Pasquet & Vulliet, 2011) Francia la concentración de El 17 α-etinilestradiol EE2, es 0,7 ngL<sup>-1</sup>, (Worrall et al., 2002) EEUU valor de 73. ngL<sup>-1</sup>; (Pál et al., 2010) Norteamérica varía de 2 a 46,7 ng L<sup>-1</sup> y la concentración del punto P9 que es de pozo su concentración está dentro de esos valores.

Los autores: (Aydin & Talinli, 2013; Blair et al., 2013; Dan Liu et al., 2017; Isobe et al., 2003; Lu et al., 2011; Peng et al., 2008; Wang & Zhu, 2017; Yang et al., 2015). Identificaron la presencia de hormonas esteroides en aguas de lago con concentraciones diferentes expresadas en ngL<sup>-1</sup>, como se muestra en la Tabla 2,5. Indican que algunos países en desarrollo de Asia carecen de tecnologías avanzadas disponibles en países como los de Europa y EEUU. Monitorear las hormonas en lagos puede ser un desafío porque



estos contaminantes también pueden provenir de fuentes no puntuales, como escorrentías agrícolas, ganaderas o urbanas. Las hormonas pueden descargarse de fuentes difusas más rápidas de lo que se degradan.

(Zhou et al., 2016) determinó la aparición de hormonas esteroides en el norte del lago Taihu, China en un periodo de dos temporadas, las concentraciones promedio de las hormonas fueron de E1, 2,76 ngL<sup>-1</sup>; E2 1,03ngL<sup>-1</sup>, provenientes de los desechos domésticos, aguas residuales de ganado son los principales contribuyentes a la contaminación hormonal en el lago. (Du et al., 2013) , determinó la ocurrencia de E1, 17B E2, E3, y 17 A, EE2, en 10 sitios de muestreo del Lago Dianchi, China. Durante su investigación de dos años, las concentraciones de hormonas en el agua del lago fueron de 22,7 ngL<sup>-1</sup>

(Wang & Zhu, 2017) analizaron muestras del agua de 5 lagos de East Lake, China, las concentraciones medias totales de E1, 17AEE2 y 17B E2 en los 5 lagos oscilaron entre 8,91 a 35,68 ngL<sup>-1</sup>. Estas hormonas provienen principalmente de las aguas residuales domésticas e industriales, así como de las escorrentías de tierras agrícolas fertilizadas con estiércol animal.

(Du et al., 2013)) encontraron que los efluentes de 8 plantas de tratamiento de aguas residuales ubicadas en el área de captación del lago Dianchi, en Kunming, China la concentración de E1 62,5 ngL<sup>-1</sup>; E2, 23,8; EE2 26,0 ngL<sup>-1</sup> respectivamente. En comparación, las concentraciones máximas fueron E1 18,5 ngL<sup>-1</sup>, E2 5,9 ngL<sup>-1</sup>, EE2 4,4 ngL<sup>-1</sup> E3 4,8 ngL<sup>-1</sup> respectivamente.

(Dan Liu et al., 2017; Lambeth et al., 2016; Yang et al., 2015; Z. Zhang et al., 2009) en el lago Luoma China fueron E2 21, a 82 ngL<sup>-1</sup>.



En esta investigación se tiene la presencia de hormonas esteroides entre los rangos de concentraciones determinados por los autores mencionados y para la comparación tenemos los valores mínimos y máximos de hormonas esteroides en lagos se muestra en la Tabla N° 2.6

La atenuación de las concentraciones en las muestras tomadas del punto P6 al punto P1, se puede atribuir a los siguientes factores adsorción, fotólisis y biodegradación. A través de la adsorción, los sedimentos pueden servir como sumideros de hormonas y otros compuestos hidrófobos en el agua. La luz solar natural degrada las hormonas en las aguas superficiales mediante la fotólisis. Hay pocos estudios sobre la fotólisis de hormonas en sistemas lacustres.

En un estudio se determinó que el EE2 en el agua del lago filtrada, tiene una vida media de 23 horas después de la exposición a la luz solar. Según su estudio de hormonas en el lago Quinsigamond en EEUU, la presencia de materia en suspensión en el agua puede interferir con la fotólisis en el entorno natural. Aunque existe incertidumbre sobre la contribución de la luz solar natural en la atenuación de hormonas en el lago, el principio de la fotodegradación se utiliza en plantas de tratamiento. La luz ultravioleta se utiliza para degradar los contaminantes orgánicos y desinfectar el agua. Las hormonas que no se eliminan en el tratamiento secundario de las plantas de tratamiento de aguas residuales, se degradan completamente expuestas a la luz ultravioleta (Grammel & Hang, 2013).

Estas moléculas pueden causar daños ambientales y a la salud humana y sus efectos se pueden evidenciar en cualquier nivel de jerarquía biológica: célula, órgano, organismo, población y ecosistemas (D. M. Bila & Dezotti, 2003; Esteves et al., 2009).

De acuerdo con (Jorgensen & Halling-Sorensen, 2000), algunos de estos efectos se pueden observar en el agua en el orden de ngL-1, que puede ser una reducción en la



producción de esperma y un aumento en la incidencia de algunos tipos de cáncer, (D. Bila et al., 2007; Esteves et al., 2009).

La solubilidad en agua hace que las hormonas compuestas sean más movibles y, por lo tanto, pueden contaminar la hidrosfera y amenazar el agua subterránea. la lipofilia de las hormonas colaboran con la bioacumulación y se acumulan en los sedimentos (Jorgensen & Halling-Sorensen, 2000).

El 17  $\alpha$ -etinilestradiol es una hormona sintética utilizado principalmente en medicamentos anticonceptivos. en el cuerpo humano solo el 15% de la sustancia se metaboliza mientras que el resto se elimina en el agua residual, por lo tanto, esta hormona también se considera un indicador de contaminación fecal, (Gingras et al., 2007) .

El residuo de este compuesto en agua tratada es indeseable y se tiene la preocupación en minimizar la exposición de posibles consumidores susceptibles, como los niños. Con todo la concentración de la exposición al EE2 via agua potable (1-2 ng dia-1) puede ser comparada con la dosis diaria de esteroides, la cual es de 0,1 mg dia-1 (Fritsche & Steinhart, 1999; Hartmann, 1998; Silva et al., 2012).

Particularmente se ha observado la feminización de los peces machos que entran en contacto prologando con el etinilestradiol, principio activo más común de las píldoras anticonceptivas, causando una disminución importante en la reproducción de las especies afectadas. (Atkinson et al., 2012).

El 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2) es una de las formas más comunes y potentes de estrógenos naturales, ampliamente detectado en el medio acuático, así como en las fuentes de agua potable (Yan et al., 2015), Uno de los efectos adversos del E2 sobre el medio ambiente es la alteración reproductiva en peces incluso a concentraciones de sub



nanogramos por litro (ng/L) ((Alan et al., 2008) . El descubrimiento de que el etinilestradiol (EE2) estaba contribuyendo a la feminización de los peces machos en ríos. (Desbrow et al., 1998; Jobling et al., 1998).

Estrona (E1), 17  $\beta$ -estradiol (E2) y el sintético, 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2), se encuentran comúnmente en las aguas residuales (Racz & Goel, 2010), representan un riesgo ambiental debido a su alto potencial de persistir en los ecosistemas, y producir acumulación y toxicidad para los seres vivos (IM Ramírez-Sánchez et al., 2015; Silva et al., 2012).

La presencia de importantes niveles de estrógenos en los ríos, lagos, etc, puede ser un riesgo potencial para el ambiente y en el futuro para los seres humanos, debido a los efectos sinérgicos (Gañán-Calvo et al., 2013). Se ha estimado que más del 99% de la actividad estrogénica en los efluentes de agua residual y agua superficial puede atribuirse a la presencia de 17 $\beta$ -estradiol (E2) y 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2) en un intervalo de concentraciones de ng/L-1,

Uno de los estrógenos más potentes encontrado en aguas superficiales es el 17 $\alpha$ etinilestradiol, este compuesto como otros estrógenos naturales se encuentra presente en las aguas residuales hasta en concentraciones de 27 nanogramos por litro (Estrada-Arriaga et al., 2012) y puede provocar el exterminio de poblaciones de peces en concentraciones trazas menores a seis nanogramos por litro (Kidd et al., 2007).

Sin embargo, en Perú, la base de datos de contaminaciones por estos compuestos en aguas superficiales y otros compartimentos aún es escasa, por lo que no hay datos para realizar comparaciones efectivas con los datos recolectados en este trabajo, ya que hasta la fecha no se había realizado ningún estudio en agua del lago Titicaca y en los ríos y agua tratada en las ciudades, en relación a la contaminación por hormonas.



## **4.2. RESULTADOS DE LOS PARÁMETROS FÍSICO- QUÍMICOS DEL AGUA DEL LAGO TITICACA Y DE CONSUMO DE LA CIUDAD DE PUNO DE LOS 9 PUNTOS DE ESTUDIO**

Se midieron los siguientes parámetros: pH, Temperatura del agua, Contenido de oxígeno, Transparencia, Profundidad, ORP, Alcalinidad, Corriente eléctrica, sus valores se muestran en la Tabla 4.4

### **4.2.1. MEDIDA DEL pH**

Los valores del pH, mostrado en la Tabla 4,1, fluctuaron entre pH= 9,06 punto P1 toma de agua (Chimú) y pH = 8,59 punto P6, costado de la laguna de Espinar, ligeramente alcalinos, con una diferencia de 0,47; lo que indica el punto P6 costado de laguna Espinar existe actividad fotosintética, con referencia a los antecedentes, los valores promedios fueron 9,43 del año 2015 y 8,55 del año 1997, No hay diferencia significativa, Los valores de pH medidos están fuera del rango (6,5 - 8,5) establecido en los Estándares de Calidad Ambiental según la Categoría 4: (Ministerio del Ambiente—MINAM, 2015)el pH bajo tiene relación directa con un bajo contenido de oxígeno disuelto (Yee et al., 2012).

### **4.2.2. MEDIDA DE LA TEMPERATURA**

Los valores de temperatura del agua en la bahía interior de Puno se dan en la Tabla 4,1, Se encontraron en el rango de 15,40 C, punto P1 (Chimu), y 18,02 °C, punto P5 frente al Hotel San Antonio (punto donde se encuentran las pulgas acuáticas), referente a la temperatura del agua de consumo varia de 15,40 °C a 13,70 °C, de la ciudad universitaria punto P9. con los antecedentes Lazzaro & Gamarra (2014) Ambos autores señalan que la temperatura del agua del Lago osciló entre 10,9 °C (julio 2007) y 17,3 °C (diciembre 2012).

**Tabla 4. 4 Coordenadas, Ubicación, hora y Parámetros físico químicos:**

**Medida de la Conductividad Eléctrica en  $\mu\text{S}/\text{cm}$**

CODIGO	COORDENADAS DEL MONITOREO		UBICA,	HR	PARAMETROS FISICO QUIMICOS (MULTIPARAMETROS)										
	E	N			Temp,	pH		C,E,	O,D,	TDS	Salinid,	ORP	OBSERVACIONES		
					°C	pH	mV	mS/cm	mg/L	%	g/L	%	Profun,	Transp,	
P1	397062	824735	Chimú	11,00	15,09	9,06	-140	1,54	8,99	87	1,02	0,08	100	4,50 m	4 m
P2	396217	824772	Canal Nav	11,15	15,10	9,05	-139	1,66	8,74	88	1,06	0,08	101	5,20 m	3,8 m
P3	394592	8248107	Punto medio	11,26	16,00	8,85	-128	1,85	7,83	82,6	1,18	0,09	144	2,50 m	1,3 m
P4	394186	8247850		11,33	15,72	8,81	-130	1,82	7,79	79,2	1,17	0-09	138	2,50 m	1,5 m
P5	393934	8247078	Frente Hotel, 150 m. la,	11,55	15,32	8,59	-114	1,79	6,85	70,8	1,15	0-09	153	4,00 m	1,2 m
P6	394186	8247154		11,44	18,02	8,72	-112	1,86	5,32	59,4	1,19	0,09	134	0,90 m	0,3 m
P7	Hospital ESSALUD, Salcedo			9,20	14,02	8,56	-112	1,67	8,31	83,7	1,07	0,08	547	-----	-----
P8	Hospital, Manuel	Núñez, B,		9,40	15,40	8,50	-110	1,63	8,22	86,5	1-07	0,09	289	-----	-----
P9	U.N.A., (pozo – Bellavista)			10,00	13,70	7,95	-81	1,21	8,11	80,6	0,773	0,06	263	-----	---

Fuente: Elaboración propia

#### 4.2.3. Medida del oxígeno disuelto.

Los valores de OD se muestran en la Tabla 4,1, varían de 0,99 mgL<sup>-1</sup> o 87% en el punto P1 Toma de agua (Chimu), a 5,32 mgL<sup>-1</sup> en el punto P6, Costado de laguna de Espinar, Los valores de OD se encuentran dentro de lo establecido por el (ECA -2017 ) para agua en el Perú, el valor de 5,32 mgL<sup>-1</sup> el OD se debe a la presencia de compuestos orgánicos, donde el flujo continuo de nutrientes en el lago (Cahui Galarza, 2018; Misra et al., 2019), reporto 5,2 mgL<sup>-1</sup> a 6,1mgL<sup>-1</sup> y según, comisión multisectorial para la prevención y recuperación ambiental del lago Titicaca y sus afluentes D,S,N° 075-2013-pcm, estado de la calidad ambiental de la cuenca del lago Titicaca ámbito peruano 2014, Presentaron valores inferiores a 5,0 mg/L, están por debajo del límite establecido en los Estándares de Calidad Ambiental según la Categoría 4: Los valores de OD indican el grado de contaminación en cuerpos de agua (Amankwaah, et al., 2014), El OD es necesario para la descomposición de la materia orgánica



#### **4.2.4. Medida de sólidos totales disueltos**

Los valores de sólidos totales disueltos (STD) se muestran en la tabla 4,1, varia de 1,02 gL-1 en el punto P1 a 1,19 gL-1 en el punto P6, y en el agua de consumo varia de 1,07gL-1 hospital del Seguro Salcedo punto P7 a 0,777 gL-1 de la ciudad universitaria punto P9 y comparados con los valores de (Cahui Galarza, 2018) de 885,5 mgL-1 a 1732 mgL-1 estos valores están por encima de lo señalado en el ECA para el agua correspondiente a lagos que es menor o igual a 25 mgL-

#### **4.2.5. Medida de la salinidad**

Los valores hallados en los 6 puntos de estudio de las muestras de agua varían de 0,08 % punto P1 a 0,09 % punto P6 con una diferencia de 0.01%, esta diferencia se debe a que el P6 está cerca de la laguna de Espinar y hay mayor concentración de salinidad, referente a estudios como de (Cahui Galarza, 2018) sus valores son de 0,9 y 0.6 no existe diferencia permanece constante, los valores obtenidos muestran una concentración baja de salinidad. Referente al agua de consumo 0.09 en el P7 (hospital del Seguro Salcedo) y de 0.06 de la ciudad universitaria, esta diferencia se debe a que el agua de la ciudad universitaria es agua subterránea (pozo).

#### **4.2.6. Medida de ORP**

Los valores del potencial de oxidación reducción (ORP), se muestra en la Tabla 4,1 en el punto P1 su valor es de 100 y en el punto P6 su valor es de 153, valores que se deben a la presencia de sustancias reductoras que se originan por la descomposición anaeróbica de residuos (ORGANIZATION, n.d.; K. Zhang et al., 2016), estableció un valor de 650 mV como valor adecuado para el agua potable, La Organización Mundial de la Salud adoptó en 1972 la medida del POTENCIAL REDOX como la medida más fiable para medir la calidad sanitaria del agua potable, La medición vale independientemente



del tipo de biocida que se utilice pues todos actúan como oxidantes,, (Cahui Galarza, 2018), reporto 95,9 y 67,5 mV.

#### **4.2.7. Medida de la profundidad**

Los valores de la profundidad varia de 0,90 m al costado de la laguna Espinar punto P6, a 5,20 m en el canal de Chimu punto P2, Según (Loza-Del-Carpio et al., 2016), La profundidad referente a la bahía interior del lago Titicaca, Puno máxima se presentó en el año 1975 con 7,40 m y la menor en el 2012 con 7,19 m, Es notoria la conexión entre la cubeta profunda con la bahía exterior mediante un canal de 6 m de profundidad (canal Chimu), Sus mayores áreas están ocupadas por profundidades menores a 1 m y los mayores volúmenes en las profundidades de 3 a 4 m, Estos valores reiteran la disminución de las profundidades de la BIP, principalmente por el incremento de sedimentos en el lecho

#### **4.2.8. Medida de la transparencia**

Los valores se dan en la Tabla 4,1 Lo cual varia de 4m en el punto P1 toma de agua (Chimu) a 0,90 m en el punto P6 costado de la laguna de Espinar, comparado con los valores de 2,5 m a 0,37 m dados por (Diana et al, 2011), Existe una diferencia entre la transparencia de Diana 2011 y el actual 4 m. la diferencia se debe a que los autores tomaron datos de lugares diferentes



## V. CONCLUSIONES

- Las aguas del interior de la bahía del lago Titicaca y el agua potable cuya principal fuente proviene de esta bahía, presentan concentraciones de hormonas esteroides: Estrona (E1) 1.56, 17  $\beta$ -estradiol (E2) 2.27, 17  $\alpha$ -etinilestradiol (EE2) 13. 88 ng L<sup>-1</sup> respectivamente, estas concentraciones varían en los diferentes puntos de monitoreo a medida que se alejan del punto principal de emisión (laguna de oxidación);
- La presencia de estos contaminantes podría ocasionar efectos ecotoxicológicos a la biota acuática endémica que habita este lago; y al mismo tiempo estaría afectando la salud de la población alrededor del lago ya que consumen agua de este lago.
- La metodología para la determinación de hormonas esteroides, se constituye en un método implantado e optimizado, demostrando que el método con extracción en fase solida (SPE) tiene potencial para la aplicación en los análisis de rutina de hormonas E1, E2, EE2 en muestras de agua superficial, subterránea y tratada.
- Los parámetros físico-químicos: de las aguas del lago Titicaca no tienen diferencia significativa de los estudios realizados.



## VI. RECOMENDACIONES

- Se ha observado que los esteroides y las hormonas sintéticas son difíciles de eliminar por completo del agua, por lo cual es imperativo diseñar métodos de eliminación de estos compuestos y por supuesto métodos sensibles de identificación que logren discriminar entre muchos compuestos diferentes.
- Realizar monitoreo de preferencia trimestrales en las demás zonas del Lago Titicaca con la finalidad de conocer la dinámica de la presencia de los compuestos de hormonas esteroides disruptores endocrinos,
- Realizar análisis de hormonas esteroides en otras matrices tales aguas del lago grande, aguas de poso, peces, aves para evaluar y conocer la presencia de estos compuestos y con esto puedan realizar propuestas que eviten mayor daño al ecosistema del lago que influyen en la salud de los habitantes de la cuenca del Titicaca,
- Coordinar acciones urgentes con organismos gubernamentales de la legislación existente e imponer límites máximos permitidos para estos compuestos en diferentes matrices ambientales
- Es necesario establecer y realizar actividades de investigación y monitoreo para evaluar adecuadamente los riesgos ambientales y a la salud asociados a los contaminantes orgánicos persistentes en Puno-Perú, verificar la reducción en los niveles de estas.



## VII. REFERENCIAS

- A. Lukowski, M., S. Daniel, A., Meng, F., Forticaux, A., Li, L., & Jin, S. (2013). Enhanced Hydrogen Evolution Catalysis from Chemically Exfoliated Metallic MoS<sub>2</sub> Nanosheets. *Journal of the American Chemical Society*, 135(28), 10274–10277. <https://doi.org/10.1021/ja404523s>
- Amankwaah, D., Cobbina, S. J., Tiwaa, Y. A., Bakobie, N., & Millicent, E. A. B. (2014). Assessment of pond effluent effect on water quality of the Asuofia Stream, Ghana. *African Journal of Environmental Science and Technology*, 8(5), 306–311. <https://doi.org/10.5897/AJEST2014.1665>
- ANA. (2018). *Metodología para la determinación del índice de calidad de agua Ica-PE, aplicado a los cuerpos de agua continentales superficiales*. Lima: Autoridad Nacional del Agua. Recuperado de <https://repositorio.ana.gob.pe/handle/20.500.12543/2440>
- Atkinson, S. K., Marlatt, V. L., Kimpe, L. E., Lean, D. R. S., Trudeau, V. L., & Blais, J. M. (2012). The occurrence of steroidal estrogens in south-eastern Ontario wastewater treatment plants. *Science of The Total Environment*, 430, 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.04.069>
- Auriol, E., & Blanc, A. (2009). Capture and corruption in public utilities: The cases of water and electricity in Sub-Saharan Africa. *Utilities Policy*, 17(2), 203–216. <https://doi.org/10.1016/j.jup.2008.07.005>
- Aydin, E., & Talinli, I. (2013). Analysis, occurrence and fate of commonly used pharmaceuticals and hormones in the Buyukcekmece Watershed, Turkey. *Chemosphere*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.10.074>
- Baronti, C., Curini, R., D'Ascenzo, G., Di Corcia, A., Gentili, A., & Samperi, R. (2000). Monitoring Natural and Synthetic Estrogens at Activated Sludge Sewage



- Treatment Plants and in a Receiving River Water. *Environmental Science & Technology*, 34(24), 5059–5066. <https://doi.org/10.1021/es001359q>
- Belfroid, A. ., van Drunen, M., Beek, M. ., Schrap, S. ., van Gestel, C. A. ., & van Hattum, B. (1998). Relative risks of transformation products of pesticides for aquatic ecosystems. *Science of The Total Environment*, 222(3), 167–183. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(98\)00298-8](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(98)00298-8)
- Beltrán, D. F., Palomino, R. P., Moreno, E. G., Peralta, C. G., & Montesinos, D. B. (2015). Calidad de agua de la bahía interior de Puno, lago Titicaca durante el verano del 2011. *Revista Peruana de Biología*, 22(3), 335. <https://doi.org/10.15381/rpb.v22i3.11440>
- Bila, D. M., & Dezotti, M. (2003). Fármacos no meio ambiente. *Química Nova*, 26(4), 523–530. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000400015>
- Bila, D., Montalvão, A. F., Azevedo, D. de A., & Dezotti, M. (2007). Estrogenic activity removal of 17 $\beta$ -estradiol by ozonation and identification of by-products. *Chemosphere*, 69(5), 736–746. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.05.016>
- Blair, B. D., Crago, J. P., Hedman, C. J., & Klaper, R. D. (2013). Pharmaceuticals and personal care products found in the Great Lakes above concentrations of environmental concern. *Chemosphere*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.07.057>
- Bodzek, M., & Dudziak, M. (2006). Elimination of steroidal sex hormones by conventional water treatment and membrane processes. *Desalination*, 198(1–3), 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2006.09.005>
- Bovier, T. F., Rossi, S., Mita, D. G., & Digilio, F. A. (2018). Effects of the synthetic estrogen 17- $\alpha$ -ethinylestradiol on *Drosophila melanogaster*: Dose and gender



- dependence. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 162, 625–632.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.020>
- Brown, R. P., Greer, R. D., Mihaich, E. M., & Guiney, P. D. (2001). A Critical Review of the Scientific Literature on Potential Endocrine-Mediated Effects in Fish and Wildlife. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 49(1), 17–25.  
<https://doi.org/10.1006/eesa.2000.2015>
- Bruciatelli, L., Clegg, P., De Donatis, M., Domingos, F., & Jones, R. (2014). Agua Y Energia Datos Y Estadísticas. *Informe de las Naciones Unidas sobre el desarrollo de los Recursos Hídricos en el Mundo*, 4, 59–62.
- Buchmeiser, M. R., Atzl, N., & Bonn, G. K. (1997). Ring-Opening-Metathesis Polymerization for the Preparation of Carboxylic-Acid-Functionalized, High-Capacity Polymers for Use in Separation Techniques. *Journal of the American Chemical Society*, 119(39), 9166–9174. <https://doi.org/10.1021/ja970359w>
- Cahui Galarza, N. (2018). *Detección y cuantificación de residuos de antibióticos de uso veterinario en muestras de sedimento en zonas productoras de trucha (Oncorhynchus mykiss) y en agua potable de la zona sur de la ciudad de Puno. (Tesis de doctorado)* (Universidad Nacional del Altiplano de Puno). Universidad Nacional del Altiplano de Puno, Puno, Perú. Recuperado de <http://repositorio.unap.edu.pe/handle/UNAP/12271>
- Caldwell, D. J., Mastrocco, F., Anderson, P. D., Länge, R., & Sumpter, J. P. (2012). Predicted-no-effect concentrations for the steroid estrogens estrone, 17 $\beta$ -estradiol, estriol, and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(6), 1396–1406. <https://doi.org/10.1002/etc.1825>
- Choi, M. Y., Douberly, G. E., Falconer, T. M., Lewis, W. K., Lindsay, C. M., Merritt, J. M., ... Miller, R. E. (2006). Infrared spectroscopy of helium nanodroplets: novel



- methods for physics and chemistry. *International Reviews in Physical Chemistry*, 25(1–2), 15–75. <https://doi.org/10.1080/01442350600625092>
- Chowdhury, R. R., Charpentier, P. A., & Ray, M. B. (2011). Photodegradation of 17 $\beta$ -estradiol in aquatic solution under solar irradiation: Kinetics and influencing water parameters. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 219(1), 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2011.01.019>
- Christiansen, L. B. (2002). Feminisation of fish. *Environmental project*, (729). Recuperado de <https://www2.mst.dk/udgiv/publications/2002/87-7972-305-5/pdf/87-7972-306-3.pdf>
- Christiansen, M. (2004). *Assessment of Competence. The Ultimate Frontier for Improving Professional Competence*.
- Costanzo, M., Baryshnikova, A., Bellay, J., Kim, Y., Spear, E. D., Sevier, C. S., ... Boone, C. (2010). The Genetic Landscape of a Cell. *Science*, 327(5964), 425–431. <https://doi.org/10.1126/science.1180823>
- Dan Liu, Wu, S., Xu, H., Zhang, Q., Zhang, S., Shi, L., ... Cheng, J. (2017). Distribution and bioaccumulation of endocrine disrupting chemicals in water, sediment and fishes in a shallow Chinese freshwater lake: Implications for ecological and human health risks. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.02.045>
- Deich, C., Frazão, H. C., Appelt, J.-S., Li, W., Pohlmann, T., & Waniek, J. J. (2021). Occurrence and distribution of estrogenic substances in the northern South China Sea. *Science of The Total Environment*, 770, 145239. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145239>
- Dejoux, C., & Iltis, A. (1992). *El lago Titicaca. Síntesis del conocimiento limnológico actual*. La Paz: ORSTOM/HISBOL. Recuperado de



[http://casadelcorregidor.pe/biblioteca/\\_biblio\\_Dejoux.php](http://casadelcorregidor.pe/biblioteca/_biblio_Dejoux.php)

- Desbrow, C., Routledge, E. J., Brighty, G. C., Sumpter, J. P., & Waldock, M. (1998). Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 1. Chemical Fractionation and in Vitro Biological Screening. *Environmental Science & Technology*, 32(11), 1549–1558. <https://doi.org/10.1021/es9707973>
- Díaz-Torres, E., Gibson, R., González-Farías, F., Zarco-Arista, A. E., & Mazari-Hiriart, M. (2013). Endocrine disruptors in the Xochimilco Wetland, Mexico City. *Water, Air, and Soil Pollution*. <https://doi.org/10.1007/s11270-013-1586-1>
- Diniz, M. S., Maurício, R., Petrovic, M., De Alda, M. J. L., Amaral, L., Peres, I., ... Santana, F. (2010). Assessing the estrogenic potency in a Portuguese wastewater treatment plant using an integrated approach. *Journal of Environmental Sciences*, 22(10), 1613–1622. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(09\)60297-7](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(09)60297-7)
- Du, G., Hu, J., Huang, H., Qin, Y., Han, X., Wu, D., ... Wang, X. (2013). Perfluorooctane sulfonate (PFOS) affects hormone receptor activity, steroidogenesis, and expression of endocrine-related genes in vitro and in vivo. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(2), 353–360. <https://doi.org/10.1002/etc.2034>
- Eggen, T., Moeder, M., & Arukwe, A. (2010). Municipal landfill leachates: A significant source for new and emerging pollutants. *Science of The Total Environment*, 408(21), 5147–5157. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.07.049>
- EPA. (2010). *Chemstar Products Company - 503 West Hayes, McPherson, Kansas 67460, CAA-07-2010-0013*.
- Esteves, V. I., Otero, M., & Duarte, A. C. (2009). Comparative characterization of humic substances from the open ocean, estuarine water and fresh water. *Organic Geochemistry*, 40(9), 942–950. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2009.06.006>



- European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. (1996). Note for Guidance on Virus Validation Studies : the Design , Contribution and Interpretation of Studies Validating the Inactivation and Removal of Viruses Cpmp/Bwp/268/95. *Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP)*, 0(0), 1–13. Recuperado de [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/09/WC500003684.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003684.pdf)
- Farré, M. la, Pérez, S., Kantiani, L., & Barceló, D. (2008). Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 27(11), 991–1007. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.09.010>
- Fent, K., Weston, A., & Caminada, D. (2006). Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, 76(2), 122–159. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.09.009>
- Ferrer, I., Hennion, M.-C., & Barceló, D. (1997). Immunosorbents Coupled On-Line with Liquid Chromatography/Atmospheric Pressure Chemical Ionization/Mass Spectrometry for the Part per Trillion Level Determination of Pesticides in Sediments and Natural Waters Using Low Preconcentration Volumes. *Analytical Chemistry*, 69(22), 4508–4514. <https://doi.org/10.1021/ac970843h>
- Gadzała-Kopciuch, R., Ričanyová, J., & Buszewski, B. (2009). Isolation and detection of steroids from human urine by molecularly imprinted solid-phase extraction and liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 877(11–12), 1177–1184. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.03.008>
- Ganter, B., Tugendreich, S., Pearson, C. I., Ayanoglu, E., Baumhueter, S., Bostian, K. A., ... Jarnagin, K. (2005). Development of a large-scale chemogenomics database to



- improve drug candidate selection and to understand mechanisms of chemical toxicity and action. *Journal of Biotechnology*, 119(3), 219–244. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.03.022>
- García-Galán, M. J., Villagrasa, M., Díaz-Cruz, M. S., & Barceló, D. (2010). LC-QqLIT MS analysis of nine sulfonamides and one of their acetylated metabolites in the Llobregat River basin. Quantitative determination and qualitative evaluation by IDA experiments. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(3), 1325–1334. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3630-y>
- Ghiselli, G., & Jardim, W. F. (2007). Interferentes endócrinos no ambiente. *Química Nova*, 30(3), 695–706. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000300032>
- Giger, W. (2009). The Rhine red, the fish dead—the 1986 Schweizerhalle disaster, a retrospect and long-term impact assessment. *Environmental Science and Pollution Research*, 16(S1), 98–111. <https://doi.org/10.1007/s11356-009-0156-y>
- Gogoi, A., Mazumder, P., Tyagi, V. K., Tushara Chaminda, G. G., An, A. K., & Kumar, M. (2018). Occurrence and fate of emerging contaminants in water environment: A review. *Groundwater for Sustainable Development*, 6, 169–180. <https://doi.org/10.1016/j.gsd.2017.12.009>
- González-Hernando, C., Souza-de Almeida, M., Martín-Villamor, P., Cao-Torija, M. J., & Castro-Alija, M. J. (2013). La píldora anticonceptiva a debate. *Enfermería Universitaria*, 10(3), 98–104. [https://doi.org/10.1016/S1665-7063\(13\)72635-6](https://doi.org/10.1016/S1665-7063(13)72635-6)
- González, A., Kroll, K. J., Silva-Sanchez, C., Carriquiriborde, P., Fernandino, J. I., Denslow, N. D., & Somoza, G. M. (2020). Steroid hormones and estrogenic activity in the wastewater outfall and receiving waters of the Chascomús chained shallow lakes system (Argentina). *Science of The Total Environment*, 743, 140401. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140401>



- Goodman, T. M. (2012). International standards for colour. *Colour Design: Theories and Applications: Second Edition*, 417–452. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101270-3.00018-7>
- Górak, A., & Hoffmann, A. (2001). Catalytic distillation in structured packings: Methyl acetate synthesis. *AIChE Journal*, 47(5), 1067–1076. <https://doi.org/10.1002/aic.690470513>
- Guedes-Alonso, R., Sosa-Ferrera, Z., & Santana-Rodríguez, J. J. (2017). Determination of steroid hormones in fish tissues by microwave-assisted extraction coupled to ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 237, 1012–1020. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.065>
- Guedes, R., Sosa, Z., & Santana, J. J. (2017). Determination of steroid hormones in fish tissues by microwave-assisted extraction coupled to ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 237, 1012–1020. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.065>
- Gupta, A., Dec, S. F., Koh, C. A., & Sloan, E. D. (2007). NMR Investigation of Methane Hydrate Dissociation. *The Journal of Physical Chemistry C*, 111(5), 2341–2346. <https://doi.org/10.1021/jp066536+>
- Henry, J. G., & Heinke, G. W. (1999). *Tratamiento y eliminación de lixiviados. Ingeniería Ambiental*. Mexico D.F.: Prentice Hall Hispanoamericana, S.A.
- Hernando, M., Mezcua, M., Fernandezalba, A., & Barcelo, D. (2006). Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta*, 69(2), 334–342. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.09.037>
- Hu, Y., Chen, Y., Douglas, L., & Li, S. (2009).  $\beta$ -Catenin is essential for survival of leukemic stem cells insensitive to kinase inhibition in mice with BCR-ABL-induced chronic myeloid leukemia. *Leukemia*, 23(1), 109–116.



<https://doi.org/10.1038/leu.2008.262>

- INEI. (2017). *Compendio Estadístico Perú 2017*. Lima: Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI).
- INEI. (2019). Perú: Indicadores de Resultados de los Programas Presupuestales, Primer Semestre - ENDES. *Instituto Nacional de Estadística e Informática*, 144–145.
- Ismail, A. M., Menazea, A. A., Kabary, H. A., El-Sherbiny, A. E., & Samy, A. (2019). The influence of calcination temperature on structural and antimicrobial characteristics of zinc oxide nanoparticles synthesized by Sol–Gel method. *Journal of Molecular Structure*, *1196*, 332–337.  
<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.06.084>
- Isobe, T., Shiraishi, H., Yasuda, M., Shinoda, A., Suzuki, H., & Morita, M. (2003). Determination of estrogens and their conjugates in water using solid-phase extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01851-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01851-4)
- Jara, J. A., Garea, A., & Irabien, J. A. (2005). *Simulation of o-xylene oxidation into phthalic anhydride: Rigorous multitubular catalytic reactor modelling and exportation into the process flowsheet*. [https://doi.org/10.1016/S1570-7946\(05\)80164-6](https://doi.org/10.1016/S1570-7946(05)80164-6)
- Jauković, Z. D., Grujić, S. D., Matic Bujagić, I. V., & Laušević, M. D. (2017). Determination of sterols and steroid hormones in surface water and wastewater using liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. *Microchemical Journal*, *135*, 39–47.  
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.07.011>
- Jelić, A., Petrović, M., & Barceló, D. (2009). Multi-residue method for trace level determination of pharmaceuticals in solid samples using pressurized liquid



- extraction followed by liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry. *Talanta*, 80(1), 363–371.  
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.06.077>
- Johnson, A. C., Jürgens, M. D., Williams, R. J., Kümmerer, K., Kortenkamp, A., & Sumpter, J. P. (2008). Do cytotoxic chemotherapy drugs discharged into rivers pose a risk to the environment and human health? An overview and UK case study. *Journal of Hydrology*, 348(1–2), 167–175.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2007.09.054>
- Jurado, A., Vázquez-Suñé, E., Carrera, J., López de Alda, M., Pujades, E., & Barceló, D. (2012). Emerging organic contaminants in groundwater in Spain: A review of sources, recent occurrence and fate in a European context. *Science of The Total Environment*, 440, 82–94. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.08.029>
- Kastelan, D., & Korsic, M. (2007). High prevalence rate of pituitary incidentaloma: Is it associated with the age-related decline of the sex hormones levels? *Medical Hypotheses*, 69(2), 307–309. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2006.11.044>
- Kim, S. D., Cho, J., Kim, I. S., Vanderford, B. J., & Snyder, S. A. (2007). Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters. *Water Research*.  
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.06.034>
- Kocher, O., Yesilaltay, A., Cirovic, C., Pal, R., Rigotti, A., & Krieger, M. (2003). Targeted Disruption of the PDZK1 Gene in Mice Causes Tissue-specific Depletion of the High Density Lipoprotein Receptor Scavenger Receptor Class B Type I and Altered Lipoprotein Metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 278(52), 52820–52825. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310482200>
- Kümmerer, K. (2001). Drugs in the environment: Emission of drugs, diagnostic aids and



- disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources - A review. *Chemosphere*. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00144-8](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00144-8)
- Kuster, M., Azevedo, D. A., López de Alda, M. J., Aquino Neto, F. R., & Barceló, D. (2009). Analysis of phytoestrogens, progestogens and estrogens in environmental waters from Rio de Janeiro (Brazil). *Environment International*, 35(7), 997–1003. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.04.006>
- Kuster, Marina, José López de Alda, M., & Barceló, D. (2004). Analysis and distribution of estrogens and progestogens in sewage sludge, soils and sediments. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 23(10–11), 790–798. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.08.007>
- Laganà, A., Bacaloni, A., De Leva, I., Faberi, A., Fago, G., & Marino, A. (2004). Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural waters. *Analytica Chimica Acta*, 501(1), 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2003.09.020>
- Lai, K. M., Scrimshaw, M. D., & Lester, J. N. (2002). Prediction of the bioaccumulation factors and body burden of natural and synthetic estrogens in aquatic organisms in the river systems. *Science of The Total Environment*, 289(1–3), 159–168. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(01\)01036-1](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(01)01036-1)
- Lancas, F. (1994). Uso De Técnicas Cromatográficas Para a Avaliação De Propriedades Físico-Químicas De Pesticidas Em Solo. Iii. Determinação Da Biodegradação. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, Vol. 4. <https://doi.org/10.5380/pes.v4i0.39438>
- Larsson, D. G. ., Adolfsson-Erici, M., Parkkonen, J., Pettersson, M., Berg, A. ., Olsson, P.-E., & Förlin, L. (1999). Ethinyloestradiol — an undesired fish contraceptive? *Aquatic Toxicology*, 45(2–3), 91–97. <https://doi.org/10.1016/S0166->



445X(98)00112-X

- Lednicer, D. (2011). *Steroid Chemistry at a Glance*. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Ley N° 28611. (2005). *Ley General del Ambiente*. Lima: Ministerio de Ambiente.
- Liu, R., & Zhou, X. (2013). Selective transformations of cyclopentadienyl ligands of transition-metal and rare-earth metal complexes. *Chemical Communications*, 49(31), 3171. <https://doi.org/10.1039/c2cc35637f>
- Liu, Z., Kanjo, Y., & Mizutani, S. (2009). Urinary excretion rates of natural estrogens and androgens from humans, and their occurrence and fate in the environment: A review. *Science of The Total Environment*, 407(18), 4975–4985. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.06.001>
- López de Alda, M. J., & Barceló, D. (2001). 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*, 911(2), 203–210. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)00517-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00517-9)
- López, R., Petrović, M., & Barceló, D. (2012). Occurrence and distribution of multi-class pharmaceuticals and their active metabolites and transformation products in the Ebro River basin (NE Spain). *Science of The Total Environment*, 440, 280–289. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.06.027>
- Loza-Del-Carpio, A., Gamarra-Peralta, C., & Condori-Aliaga, N. (2016). Caracterización morfobatimétrica y estimación de sedimentos de la bahía interior de Puno, lago Titicaca, mediante tecnología SIG. *Revista de Investigaciones Altoandinas - Journal of High Andean Research*, 18(2). <https://doi.org/10.18271/ria.2016.205>
- Lu, G., Yan, Z., Wang, Y., & Chen, W. (2011). Assessment of estrogenic contamination and biological effects in Lake Taihu. *Ecotoxicology*.



<https://doi.org/10.1007/s10646-011-0660-y>

Luo, Y., Guo, W., Ngo, H. H., Nghiem, L. D., Hai, F. I., Zhang, J., ... Wang, X. C. (2014).

A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Science of The Total Environment*, 473–474, 619–641. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.065>

Mallick, P., & Kuster, B. (2010). Proteomics: a pragmatic perspective. *Nature Biotechnology*, 28(7), 695–709. <https://doi.org/10.1038/nbt.1658>

Matsumoto, E. (2001). *Estudo da contaminação ambiental atmosférica e de águas superficiais, empregando a fluorescência de raios X dispersiva em energia (EDXRF) e reflexão total (TXRF)*. (Tesis de doctorado) (Universidade Estadual de Campinas). Universidade Estadual de Campinas, Sao Paulo, Brazil. Recuperado de <https://bv.fapesp.br/pt/bolsas/94058/estudo-da-contaminacao-ambiental-atmosferica-e-de-aguas-superficiais-empregando-a-fluorescencia-de-r/>

Mazellier, P., Méité, L., & Laat, J. De. (2008). Photodegradation of the steroid hormones 17 $\beta$ -estradiol (E2) and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2) in dilute aqueous solution. *Chemosphere*, 73(8), 1216–1223. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.07.046>

Monroy, M., Maceda-Veiga, A., & de Sostoa, A. (2014). Metal concentration in water, sediment and four fish species from Lake Titicaca reveals a large-scale environmental concern. *Science of The Total Environment*, 487, 233–244. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.03.134>

Moreno Terrazas, E., Goyzueta Camacho, G., Gamarra Peralta, C., Aparicio Saavedra, M., Atencio Limache, S., Alfaro Tapia, R., ... Vallenás Gaona, M. (2021). *Limnología y Ecotoxicología de la Bahía Interior de Puno, Lago Titicaca, Perú*.



Puno: EL Altiplano S.R.Ltda.

- Muñoz, L. A., & Arroyave, O. (2017). Percepción del riesgo y apego al lugar en población expuesta a inundación: un estudio comparativo. *Pensamiento Psicológico*, 15(2), 22–28. <https://doi.org/10.11144/Javerianacali.PPSI15-2.pral>
- Nieto, A. (2013). *Cuantificación de 17 $\beta$ -Estradiol Proveniente de efluentes Hospitalarios mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución y determinación de Cinética de Degradación. (Tesis de maestría)* (Universidad Autónoma del Estado de México). Universidad Autónoma del Estado de México, México, México. Recuperado de <http://ri.uaemex.mx/handle/123456789/14953>
- Northcote, P. T., Blunt, J. W., & Munro, M. H. G. (1991). Pateamine: a potent cytotoxin from the New Zealand Marine sponge, mycale sp. *Tetrahedron Letters*, 32(44), 6411–6414. [https://doi.org/10.1016/0040-4039\(91\)80182-6](https://doi.org/10.1016/0040-4039(91)80182-6)
- Novakova-Jiresova, A., van Gameren, M. M., Coppes, R. P., Kampinga, H. H., & Groen, H. J. M. (2004). Transforming growth factor- $\beta$  plasma dynamics and post-irradiation lung injury in lung cancer patients. *Radiotherapy and Oncology*, 71(2), 183–189. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2004.01.019>
- Omar, T. F. T., Ahmad, A., Aris, A. Z., & Yusoff, F. M. (2016). Endocrine disrupting compounds (EDCs) in environmental matrices: Review of analytical strategies for pharmaceuticals, estrogenic hormones, and alkylphenol compounds. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 85, 241–259. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.08.004>
- OMS. (2013). *Estadísticas sanitarias mundiales 2013: una mina de información sobre salud pública mundial*. Ginebra: Organización Mundial de la Salud. Recuperado de <https://apps.who.int/iris/handle/10665/82062>
- Papoutsakis, S., Miralles-Cuevas, S., Gondrexon, N., Baup, S., Malato, S., & Pulgarin, C. (2015). Coupling between high-frequency ultrasound and solar photo-Fenton



- at pilot scale for the treatment of organic contaminants: An initial approach. *Ultrasonics Sonochemistry*, 22, 527–534. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.05.003>
- PCM. (2014). *Estado de la calidad Ambiental de la Cuenca del lago Titicaca ambito Peruano*. Recuperado de <https://www.minam.gob.pe/puno/wp-content/uploads/sites/55/2014/02/ESTUDIO-DEL-ESTADO-DE-LA-CALIDAD-AMBIENTAL-CUENCA-DEL-TITICACA..pdf>
- Peñalver, A., Pocurull, E., Borrull, F., & Marcé, R. . (2002). Method based on solid-phase microextraction–high-performance liquid chromatography with UV and electrochemical detection to determine estrogenic compounds in water samples. *Journal of Chromatography A*, 964(1–2), 153–160. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00694-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00694-5)
- Peng, X., Yu, Y., Tang, C., Tan, J., Huang, Q., & Wang, Z. (2008). 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*, 397(1–3), 158–166. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.02.059>
- Pereira, H., Barreira, L., Mozes, A., Florindo, C., Polo, C., Duarte, C. V, ... Varela, J. (2011). Microplate-based high throughput screening procedure for the isolation of lipid-rich marine microalgae. *Biotechnology for Biofuels*, 4(1), 61. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-61>
- Pichon, V., Chen, L., Hennion, M.-C., Daniel, R., Martel, A., Le Goffic, F., ... Barcelo, D. (1995). Preparation and Evaluation of Immunosorbents for Selective Trace Enrichment of Phenylurea and Triazine Herbicides in Environmental Waters. *Analytical Chemistry*, 67(14), 2451–2460. <https://doi.org/10.1021/ac00110a021>



- Quintana, J. B., & Reemtsma, T. (2004). Sensitive determination of acidic drugs and triclosan in surface and wastewater by ion-pair reverse-phase liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 18(7), 765–774. <https://doi.org/10.1002/rcm.1403>
- Ramírez-Sánchez, I. M., Martínez-Austria, P., Quiroz-Alfaro, M. A., & Bandala, E. R. (2015). Tecnología y Ciencias del Agua. *Tecnología y ciencias del agua*, 6(5), 31–42. Recuperado de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-24222015000500003&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-24222015000500003&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- Raymond, J., Varney, C., Parkinson, L. A., & Gruzelier, J. H. (2005). The effects of alpha/theta neurofeedback on personality and mood. *Cognitive Brain Research*, 23(2–3), 287–292. <https://doi.org/10.1016/j.cogbrainres.2004.10.023>
- Ribani, M., Bottoli, C. B. G., Collins, C. H., Jardim, I. C. S. F., & Melo, L. F. C. (2004). Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, 27(5), 771–780. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000500017>
- Runnalls, T. J., Margiotta-Casaluci, L., Kugathas, S., & Sumpter, J. P. (2010). Pharmaceuticals in the Aquatic Environment: Steroids and Anti-Steroids as High Priorities for Research. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 16(6), 1318–1338. <https://doi.org/10.1080/10807039.2010.526503>
- Sacdal, R., Madriaga, J., & Espino, M. P. (2020). Overview of the analysis, occurrence and ecological effects of hormones in lake waters in Asia. *Environmental Research*, 182, 109–191. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.109091>
- Scaglia, H. E., & Chichizola, C. (2007). Disruptores endocrinos y función testicular. *Revista Internacional de Andrología*, 5(2), 181–192. [https://doi.org/10.1016/S1698-031X\(07\)74052-9](https://doi.org/10.1016/S1698-031X(07)74052-9)



- Silva, C. P., Otero, M., & Esteves, V. (2012). Processes for the elimination of estrogenic steroid hormones from water: A review. *Environmental Pollution*, *165*, 38–58.  
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.02.002>
- Sta. Ana, K. M., & Espino, M. P. (2020). Occurrence and distribution of hormones and bisphenol A in Laguna Lake, Philippines. *Chemosphere*, *256*, 127122.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127122>
- Stuart, M., Lapworth, D., Crane, E., & Hart, A. (2012). Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater. *Science of The Total Environment*, *416*, 1–21. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.11.072>
- Swartz, J. (2006). Developing cell-free biology for industrial applications. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, *33*(7), 476–485.  
<https://doi.org/10.1007/s10295-006-0127-y>
- Ternes, T. ., Stumpf, M., Mueller, J., Haberer, K., Wilken, R.-D., & Servos, M. (1999). Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants — I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Science of The Total Environment*, *225*(1–2), 81–90. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(98\)00334-9](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(98)00334-9)
- Thorpe, S. R., & Baynes, J. W. (2003). Maillard reaction products in tissue proteins: New products and new perspectives. *Amino Acids*, *25*(3–4), 275–281.  
<https://doi.org/10.1007/s00726-003-0017-9>
- Topalian, S. L., Hodi, F. S., Brahmer, J. R., Gettinger, S. N., Smith, D. C., McDermott, D. F., ... Sznol, M. (2012). Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *New England Journal of Medicine*, *366*(26), 2443–2454.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1200690>
- Torres, N. H., Santos, G. de O. S., Romanholo Ferreira, L. F., Américo-Pinheiro, J. H. P., Eguiluz, K. I. B., & Salazar-Banda, G. R. (2021). Environmental aspects of



- hormones estriol,  $17\beta$ -estradiol and  $17\alpha$ -ethinylestradiol: Electrochemical processes as next-generation technologies for their removal in water matrices. *Chemosphere*, 267, 128888. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128888>
- Torres, R. del P. (2018). *A propósito del principio de gradualidad : análisis del proceso de adecuación de los estándares nacionales de calidad ambiental para agua (ECA - agua) en la actividad de la gran y mediana minería en curso, desde el año 2008 al 2016 . (Tesis de maestría)* (Pontificia Universidad Católica del Perú). Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima, Perú. Recuperado de <https://tesis.pucp.edu.pe/repositorio/handle/20.500.12404/9874?show=full>
- Vargatu, I. (2016). Williams Textbook of Endocrinology. *Acta Endocrinologica (Bucharest)*, 12(1), 113–113. <https://doi.org/10.4183/aeb.2016.113>
- Vessman, J., Stefan, R. I., van Staden, J. F., Danzer, K., Lindner, W., Burns, D. T., ... Müller, H. (2001). Selectivity in analytical chemistry (IUPAC Recommendations 2001). *Pure and Applied Chemistry*, 73(8), 1381–1386. <https://doi.org/10.1351/pac200173081381>
- Vine, E. (2005). An international survey of the energy service company (ESCO) industry. *Energy Policy*, 33(5), 691–704. <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2003.09.014>
- Wang, J., & Zhu, Y. (2017). Occurrence and risk assessment of estrogenic compounds in the East Lake, China. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.03.018>
- Wang, S., Zhu, Z., He, J., Yue, X., Pan, J., & Wang, Z. (2018). Steroidal and phenolic endocrine disrupting chemicals (EDCs) in surface water of Bahe River, China: Distribution, bioaccumulation, risk assessment and estrogenic effect on *Hemiculter leucisculus*. *Environmental Pollution*, 243, 103–114. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.08.063>



- Weber, M., Davies, J. J., Wittig, D., Oakeley, E. J., Haase, M., Lam, W. L., & Schübeler, D. (2005). Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nature Genetics*, 37(8), 853–862. <https://doi.org/10.1038/ng1598>
- Weigl, M., Cieza, A., Andersen, C., Kollerits, B., Amann, E., & Stucki, G. (2004). Identification of relevant ICF categories in patients with chronic health conditions: a Delphi exercise. *Journal of Rehabilitation Medicine*, 36, 12–21. <https://doi.org/10.1080/16501960410015443>
- Winkler, P., Novoszad, M., Gerzabek, M. H., Haberhauer, G., Tunega, D., & Lischka, H. (2007). Interaction of naphthalene derivatives with soil: an experimental and theoretical case study. *European Journal of Soil Science*, 58(4), 967–977. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2007.00935.x>
- Worrall, F., Besien, T., & Kolpin, D. W. (2002). Groundwater vulnerability: interactions of chemical and site properties. *Science of The Total Environment*, 299(1–3), 131–143. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(02\)00270-X](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(02)00270-X)
- Xu, S., Sun, J., Zhang, Y., Ji, J., & Sun, X. (2021). Opposite estrogen effects of estrone and 2-hydroxyestrone on MCF-7 sensitivity to the cytotoxic action of cell growth, oxidative stress and inflammation activity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 209, 111754. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111754>
- Yang, Y., Cao, X., Zhang, M., & Wang, J. (2015). Occurrence and distribution of endocrine-disrupting compounds in the Honghu Lake and East Dongting Lake along the Central Yangtze River, China. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4980-y>
- Ying, G.-G., Kookana, R. S., & Ru, Y.-J. (2002). Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environment International*, 28(6), 545–551.



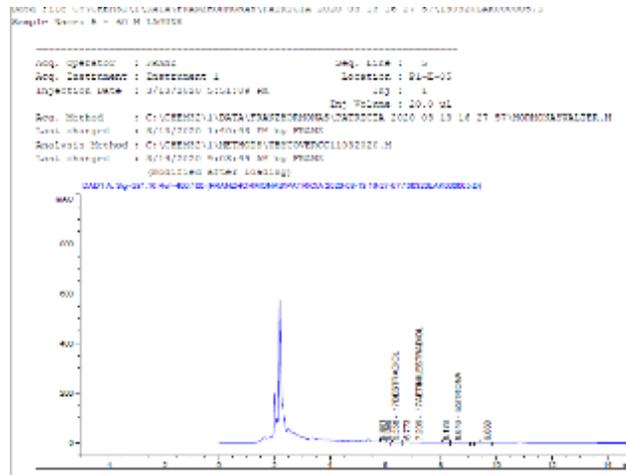
[https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(02\)00075-2](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(02)00075-2)

- Zeng, C., Niu, D., Li, H., Zhou, T., & Zhao, Y. (2016). Public perceptions and economic values of source-separated collection of rural solid waste: A pilot study in China. *Resources, Conservation and Recycling*, 107, 166–173. <https://doi.org/http://doi.org/10.1016/j.resconrec.2015.12.010>
- Zhu, B. T., & Lee, A. J. (2005). NADPH-dependent metabolism of 17 $\beta$ -estradiol and estrone to polar and nonpolar metabolites by human tissues and cytochrome P450 isoforms. *Steroids*, 70(4), 225–244. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2005.01.002>
- Zirena Vilca, F., Cahui Galarza, N., Tejedo, J. R., Zamalloa Cuba, W. A., Campos Quiróz, C. N., & Valdemar Tornisielo, L. (2021). Occurrence of residues of veterinary antibiotics in water, sediment and trout tissue (*Oncorhynchus mykiss*) in the southern area of Lake Titicaca, Peru. *Journal of Great Lakes Research*, 47(4), 1219–1227. <https://doi.org/10.1016/j.jglr.2021.04.012>

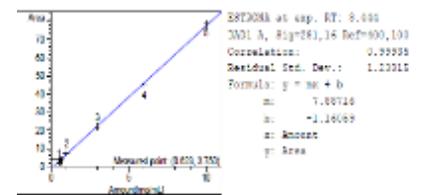
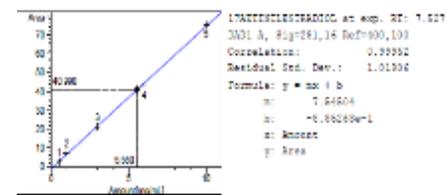
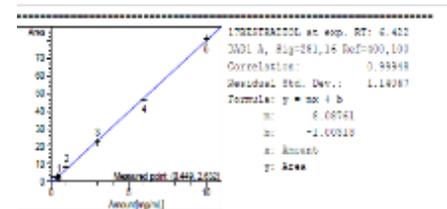


## ANEXOS

### ANEXO A Cromatograma, Áreas, Curvas de Validación Punto 6 agua costado de la laguna de Espinar

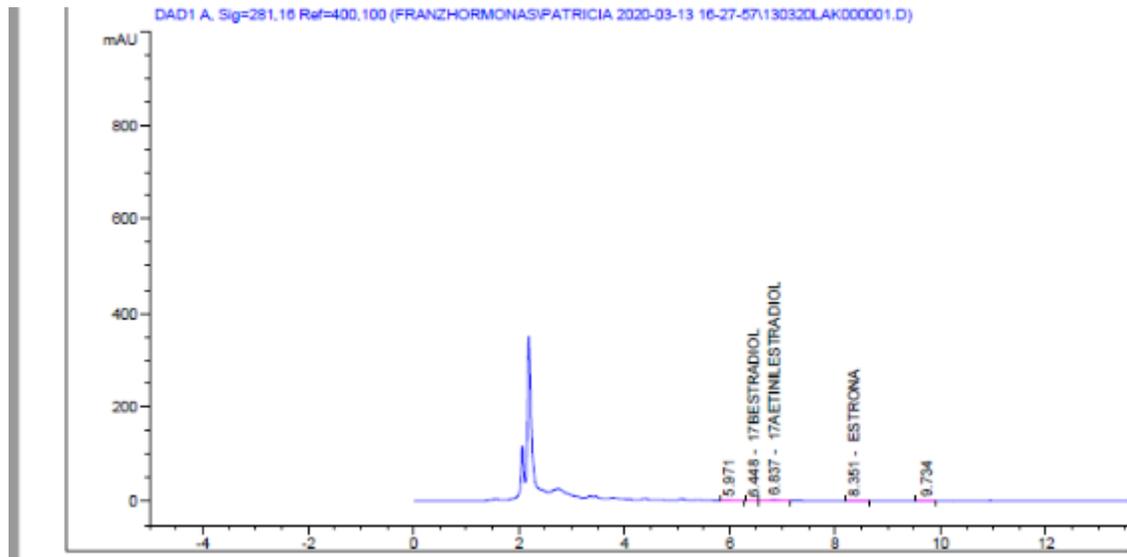


Retention Time (min)	Type	Area (mU's)	Ant/Area	Amount (mg/mL)	Exp Name
6.350	vs T	2.62213	1.70771e-1	4.49491e-1	17β-ESTRADIOL
7.208	vs R	40.98977	1.32400e-1	5.55001	17α-ESTRADIOL
8.616	vs T	3.74982	1.66030e-1	6.22582e-1	ESTRONE
Total:				8.82200	

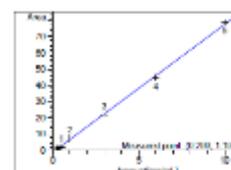
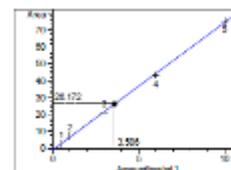
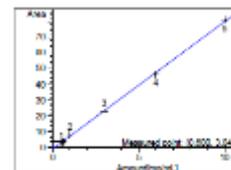




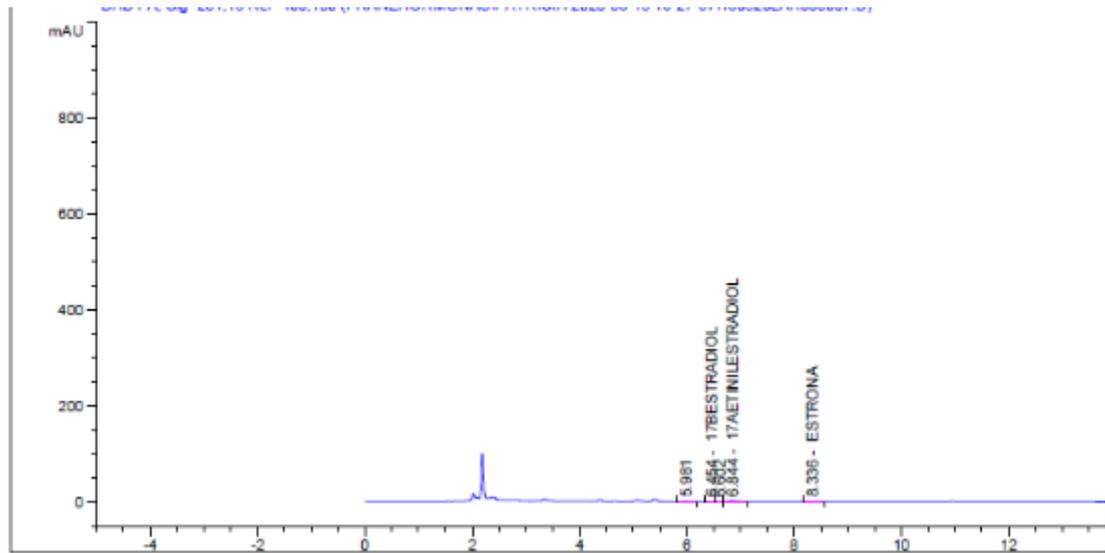
ANEXO B Cromatograma del Punto 5, (Muestra Frente Al Hotel San Antonio)



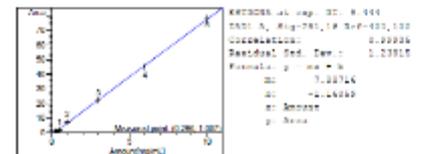
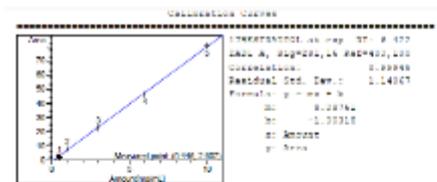
RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Ant/Area	Amount [ng/mL]	Grp	Name
6.448	BV	3.84768	1.55882e-1	5.99788e-1		17BETRADIOL
6.637	VS	26.17159	1.37021e-1	3.58605		17AETINILESTRADIOL
8.351	D2	1.19005	2.49528e-1	2.99149e-1		ESTRONA
Totals :				4.48499		



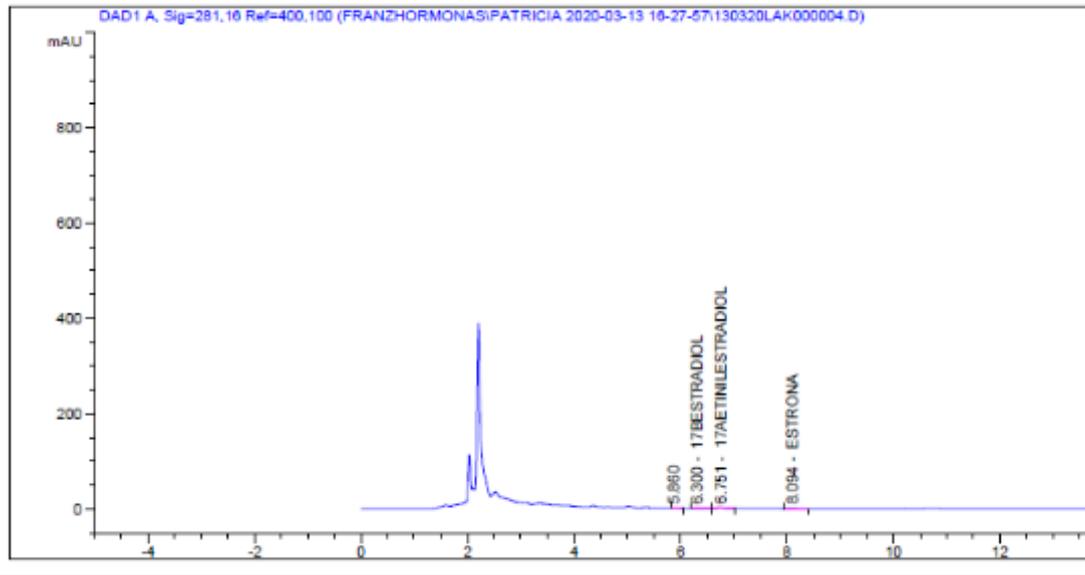
### ANEXO C Cromatograma del Punto 4 (Via Canal)



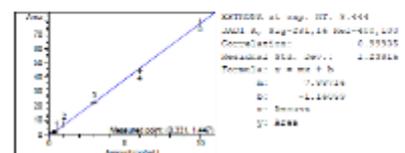
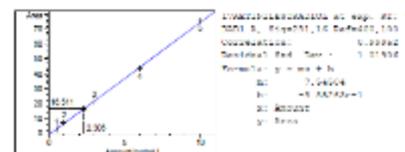
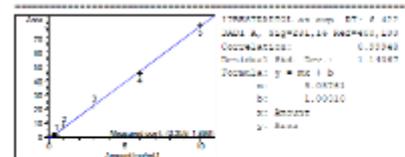
RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Ant/Area	Amount [ng/mL]	Grp	Name
6.454	EV K	2.60654	1.71234e-1	4.46327e-1		17BETRASTADIOL
8.844	VM	16.61361	1.36600e-1	2.31628		17ALFAETINILESTRADIOL
8.336	BB	1.09681	2.60949e-1	2.86211e-1		ESTRONA
Totals :				3.05182		



### ANEXO D Cromatograma del Punto 3 Canal de Navío

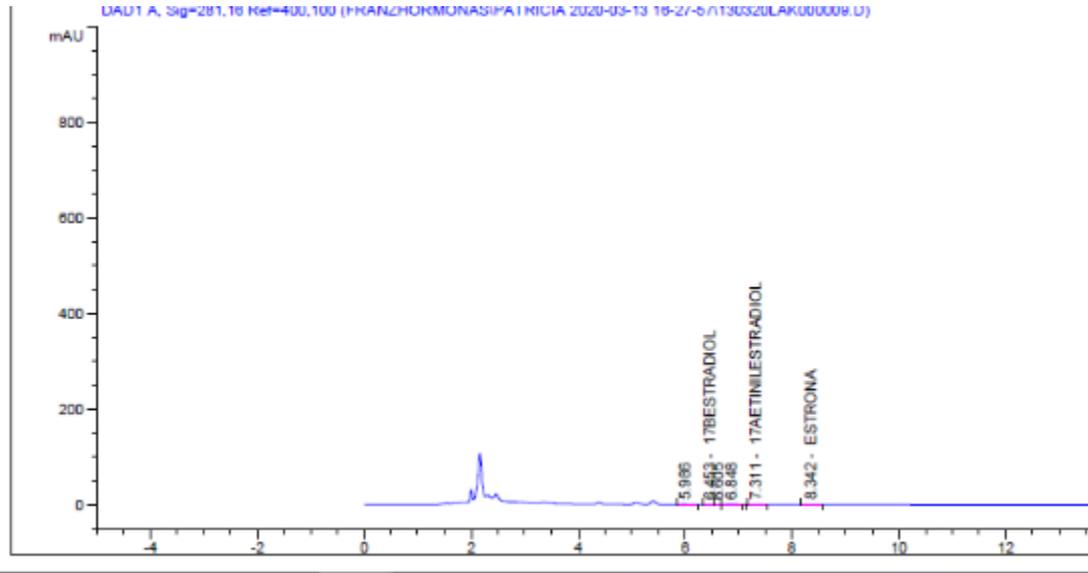


RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [ng/mL]	Grp	Name
6.300	BV	1.89629	1.89057e-1	3.58507e-1		17BESTRADIOL
6.751	VB	16.51144	1.39643e-1	2.30572		17AETINILEST
8.094	BB	1.44733	2.29457e-1	3.20653e-1		ESTRONA
Totals :				3.99488		

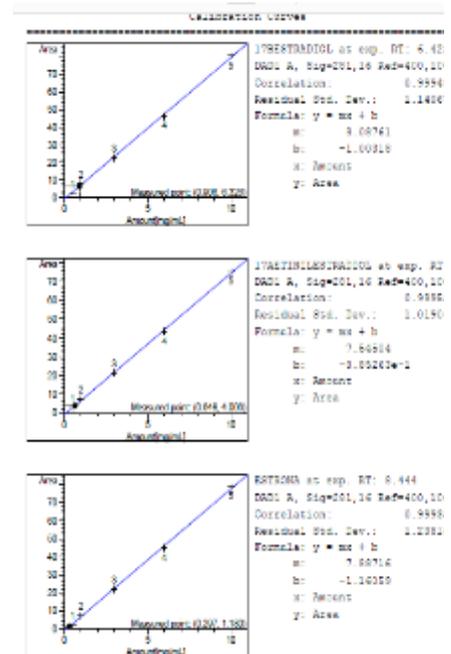




## ANEXO E Cromatograma del Punto 2 Vía Navío y Valores del Área y Curvas de Validación.

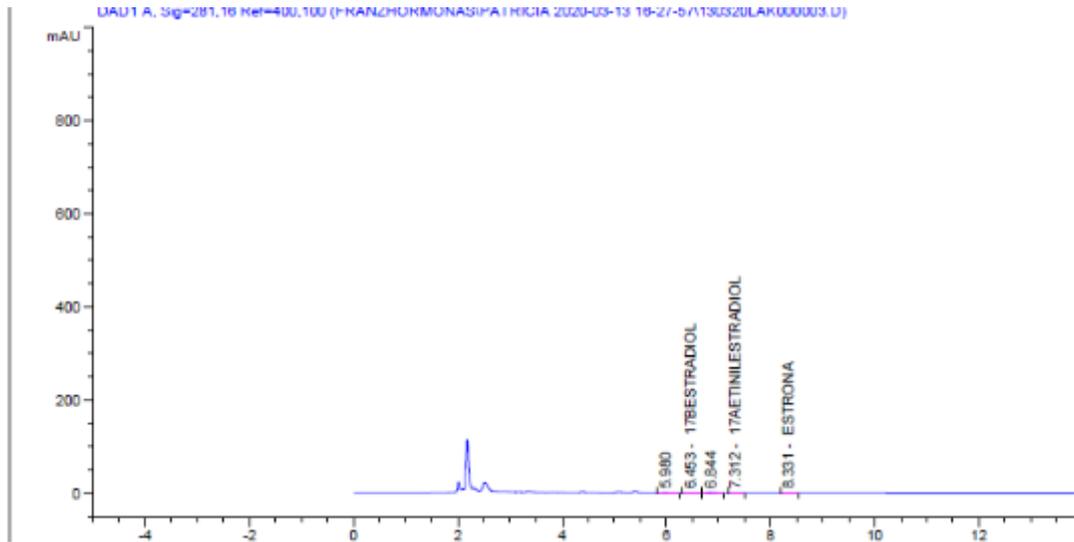


RetTime [min]	type	Area [mAU*s]	Ant/Area	Amount [ng/mL]	grp	Name
6.453	UV	6.33556	1.43355e-1	6.06173e-1		17BETESTRADIOL
7.311	BB	4.00550	1.61827e-1	6.48263e-1		17AETINILESTRADIOL
8.342	DD	1.10040	2.51446e-1	2.96019e-1		ESTRONA
Totals :				1.85125		

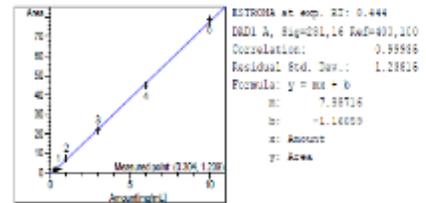
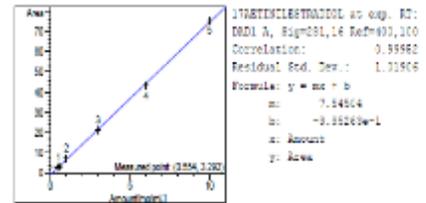
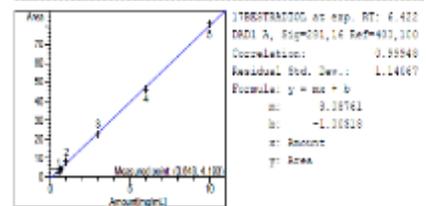




### ANEXO F Cromatograma del Punto 1 Toma de Agua Chimú.

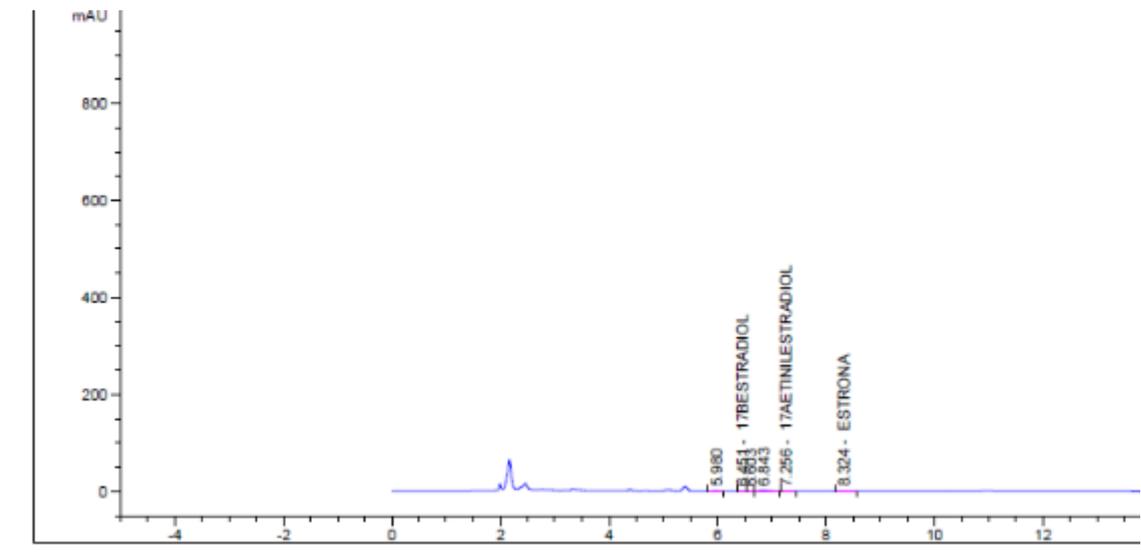


RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Ant/Area	Amount [ng/mL]	Comp	Name
6.453	BB	4.19319	1.53227e-1	6.42510e-1		17BESTRADIOL
7.312	BB	3.29171	1.68192e-1	5.52605e-1		17AETINILESTRADIOL
8.331	BB	1.23923	2.45530e-1	3.04269e-1		ESTRONA
Totals :				1.50030		

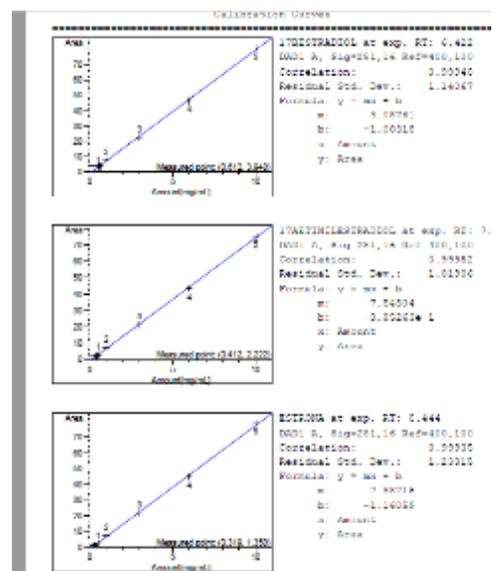




### ANEXO G Cromatograma Punto 6 Salcedo.

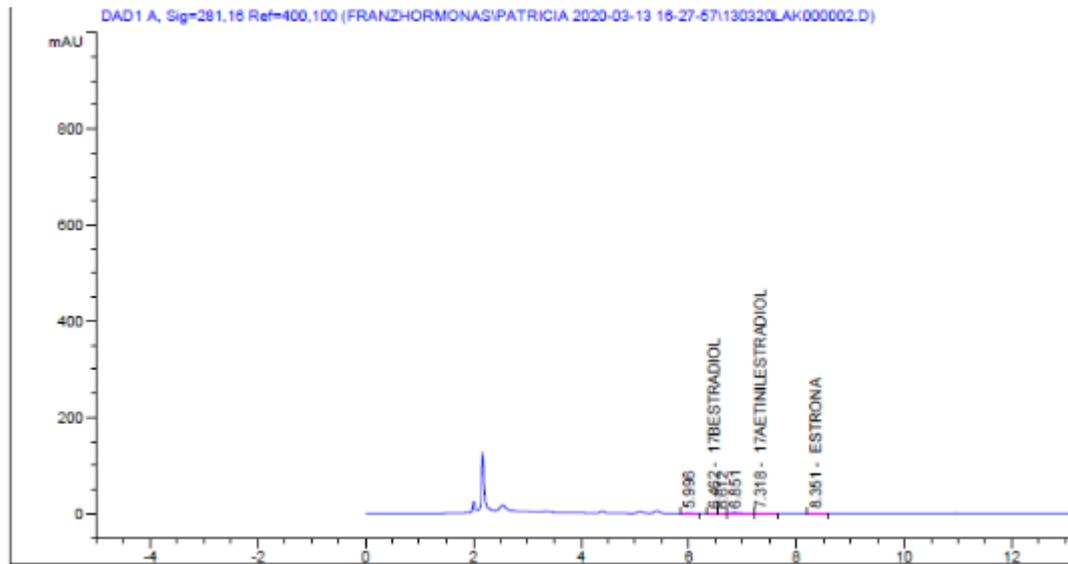


Ret. Time [min]	Type	Area [mAU*s]	Ant./Area	Amount [ng/mL]	Grp	Name
6.451	BV R	3.94812	1.55063e-1	6.12207e-1		17BETRAIODIOL
7.256	BB	2.22102	1.95398e-1	9.11906e-1		17AETINILESTRADIOL
8.324	BB	1.35825	2.35125e-1	3.19359e-1		ESTRONA
Totals :				1.34337		

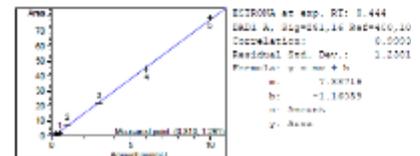
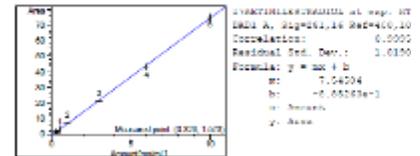
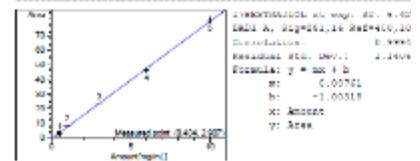




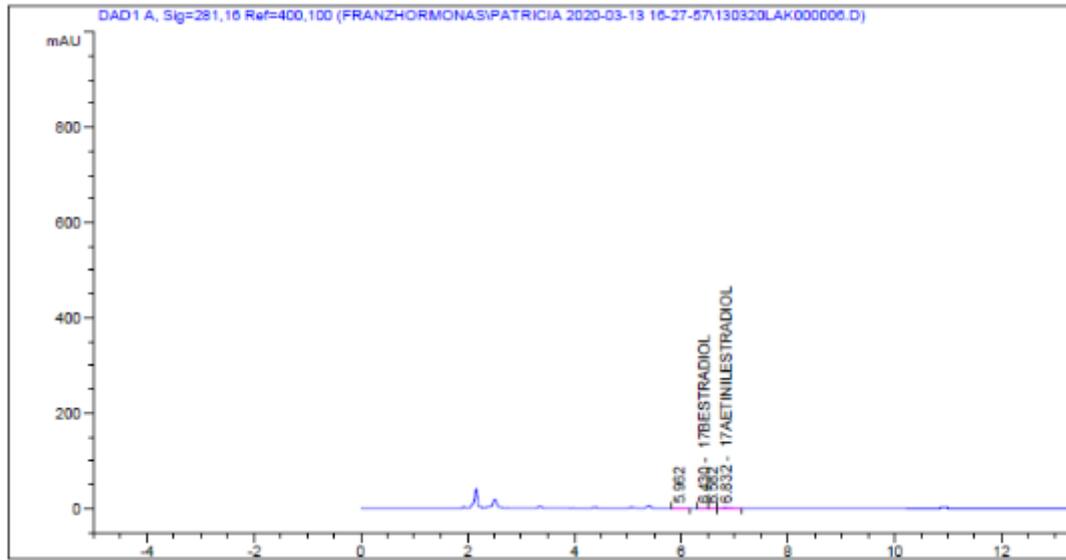
### ANEXO H Cromatograma, Punto 8 Hospital Manuel Nuñez Butro de Puno



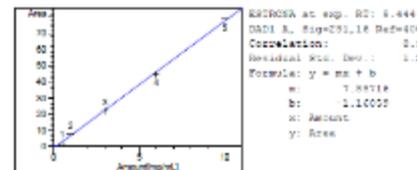
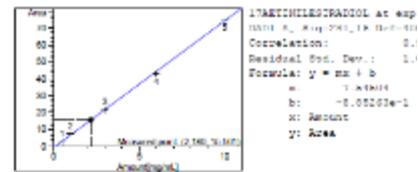
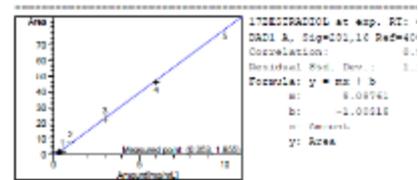
RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Ant/Area	Amount [mg/mL]	Grp	Name
6.462	BV R	2.90748	1.66308e-1	4.82537e-1		17BESTRADI
7.318	BS	1.57330	2.07114e-1	3.25851e-1		17AETINILE
8.351	BS	1.28101	2.41658e-1	3.06566e-1		ESTRONA
Totals :				1.11895		



## ANEXO I Cromatograma del agua de pozo de la UNA-Puno

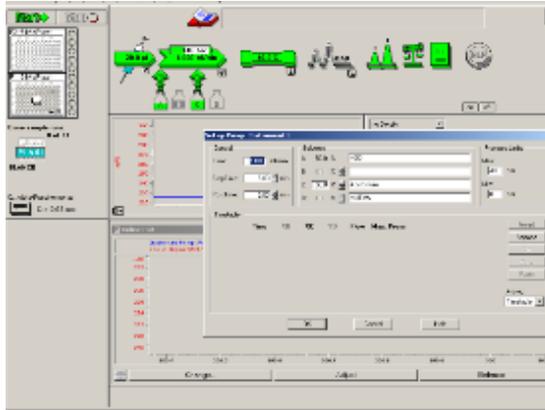


RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [ng/mL]	Grp Name
6.430	DV R	1.05503	1.90512e-1	3.53406e-1	17BETSTR
6.832	VR	15.56115	1.40077e-1	2.17977	17ARTIN
6.444	-	-	-	-	ESTRONE
Totals :				2.53317	



## ANEXO J Acondicionamientos de HPLC-DAD

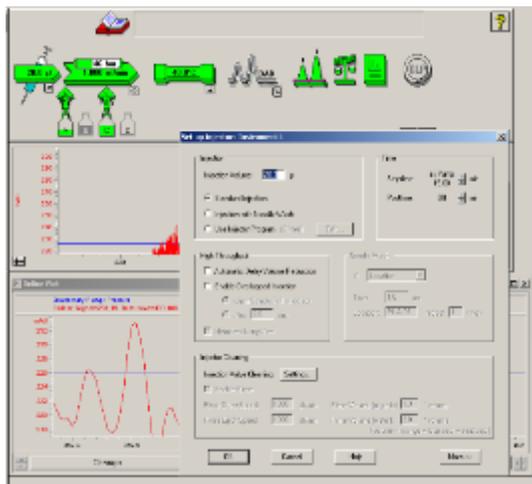
Determinación de la temperatura



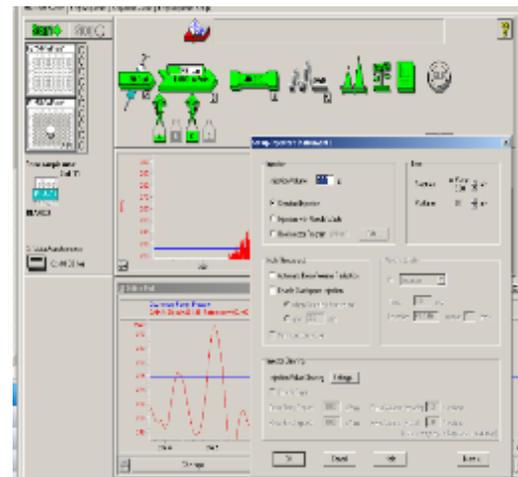
Determinación del flujo de fase móvil



Determinación de tiempo de corrida



Determinación de tamaño de pico



## ANEXO K Operaciones de la metodología del trabajo



Embarcación para toma de muestras de agua del lago Titicaca



Probando equipo Multiparámetro



Extracción de hormonas en los cartuchos



Hoja de rura



Filtrando agua ultrapura por fibra de vidrio



Manifold Supelco Visiprep, para elusion de hormonas



Preparando soluciones para el HPLC



Llenando los viales con muestras



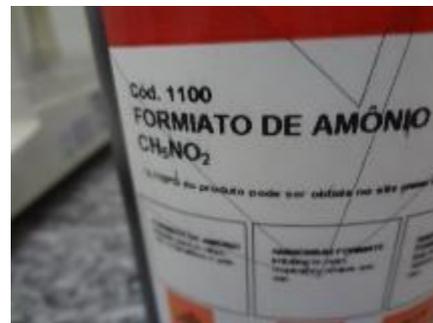
Acondicionamiento de cartuchos



Tipos de columnas cromatográficas



Alcohol grado HPLC io



Formiato de amonio