



**Universidad
de La Laguna**

Trabajo de Fin de Grado

**Evaluación del contenido de estrógenos en productos
lácteos**

Evaluation of estrogen content in dairy products

Carlota Beneito Fernández

Grado en Farmacia

Curso 2018/2019

Tutores:

Dra. Bárbara Socas Rodríguez

Graduado Álvaro Santana Mayor

Departamento de Química

Área de Química Analítica

Dña. BÁRBARA SOCAS RODRÍGUEZ, CONTRATADA LABORAL INTERINA Y D. ÁLVARO SANTANA MAYOR, DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

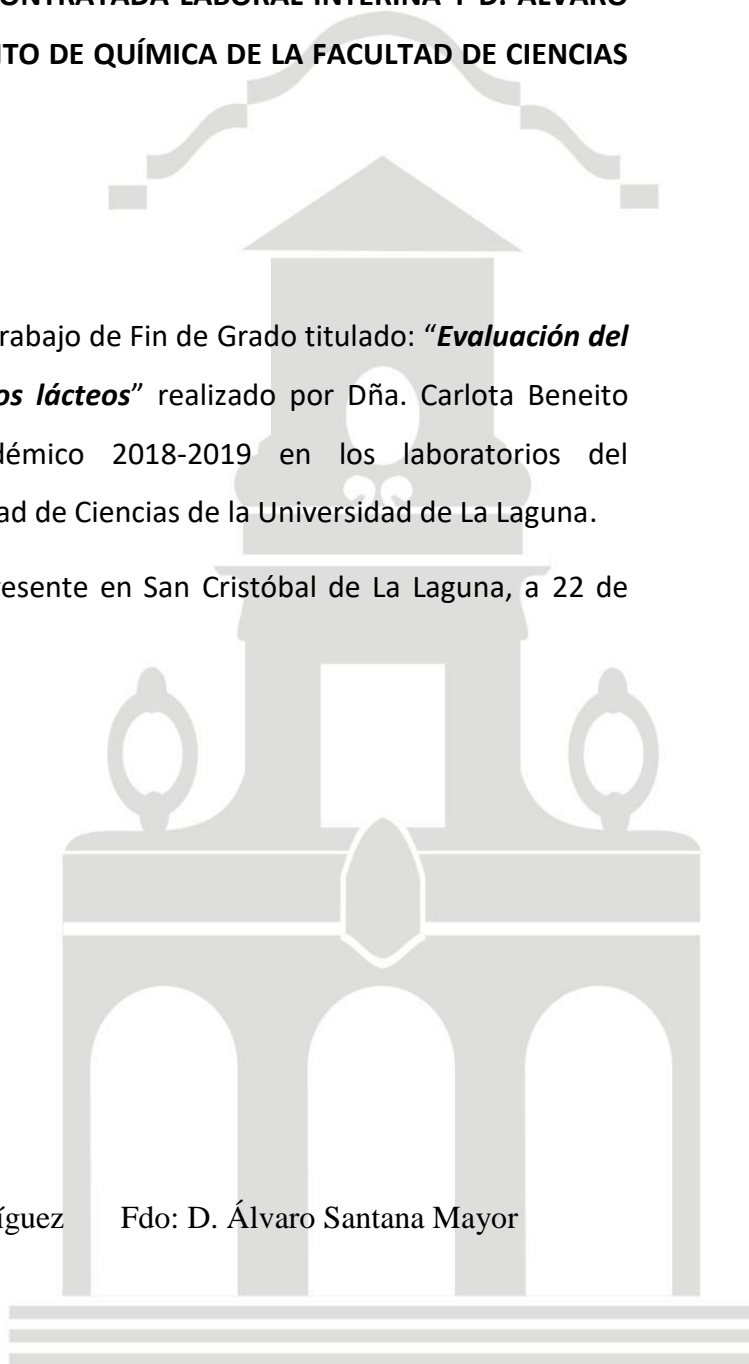
AUTORIZAN:

La presentación y defensa del Trabajo de Fin de Grado titulado: ***“Evaluación del contenido de estrógenos en productos lácteos”*** realizado por Dña. Carlota Beneito Fernández, durante el curso académico 2018-2019 en los laboratorios del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad de La Laguna.

Y para que así conste, firmamos la presente en San Cristóbal de La Laguna, a 22 de mayo de 2018.

Fdo: Dña. Bárbara Socas Rodríguez

Fdo: D. Álvaro Santana Mayor



Abstract

Estrogens are sexual hormones involved in the development of the secondary sex characters of females. However, the over-exposition to these compounds can produce important hormonal disorders and even cancer on the population.

In this work, the partial validation and application of an analytical method have been carried out for the evaluation of oestrogenic compounds in milk derivatives using the QuEChERS method as extraction and pre-concentration procedure and the ultra-high performance liquid chromatography hyphenated with mass spectrometry in tandem as separation and determination techniques.

The evaluated samples, including different kinds of milk, cheese, kefir and infant products were obtained from different markets in Tenerife with the aim of carrying out an initial assessment exposition to such substances of the alimentary Canary Islands population.

Keywords: QuEChERS, estrogens, dairy products, ultra-high performance liquid chromatography, mass spectrometry.

Resumen

Los estrógenos son un conjunto de hormonas sexuales implicadas en el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios femeninos. Sin embargo, una sobreexposición a estos compuestos por parte de la población puede generar importantes desórdenes hormonales e incluso el desarrollo de cáncer.

En este trabajo se ha llevado a cabo la validación parcial y aplicación de un método analítico para el análisis de compuestos con actividad estrogénica en diferentes productos lácteos utilizando el método QuEChERS como procedimiento de extracción y preconcentración y la cromatografía líquida de ultra-alta eficacia acoplada a la espectrometría de masas en tándem como técnicas de separación y determinación.

Las muestras evaluadas, entre las que se incluyen distintos tipos de leches, quesos, yogures, kéfir y productos lácteos destinados a la población infantil, fueron obtenidos en distintos supermercados de la isla de Tenerife con el fin de llevar a cabo una evaluación inicial de la exposición que la población canaria tiene a este tipo de compuestos a través de la ingesta alimentaria.

Palabras clave: QuEChERS, estrógenos, productos lácteos, cromatografía líquida de ultra-alta eficacia, espectrometría de masas.

Índice

1.- Introducción	6
2.- Objetivo del trabajo	10
3.- Parte Experimental	11
3.1.- Patrones, disolventes, reactivos y disoluciones:.....	11
3.2.- Materiales	11
3.3.- Equipos.....	12
3.3.1.- Instrumentos.....	12
3.3.2.- Aparatos.....	12
3.3.3.- Columnas cromatográficas	12
3.3.4.- Programas informáticos.....	12
3.4.- Muestras	13
3.5.- Procedimientos experimentales	13
3.5.1.- Separación cromatográfica.....	13
3.5.2.- Pretratamiento aplicado a los productos lácteos.....	14
3.5.3.- Validación de la metodología	15
4.- Resultados y discusión	16
5.- Conclusiones	21
6.- Bibliografía	22

1.- Introducción

Las hormonas esteroideas son compuestos derivados del colesterol. Poseen una estructura química constituida por un núcleo de ciclopentanofenantreno, también llamado gonano, formado por cuatro anillos de átomos de carbono con insaturaciones, sustituyentes y cadenas laterales diferentes. Podemos diferenciar tres tipos de hormonas esteroideas:

- Progestágenos, esteroides con 21 átomos de carbono (C_{21}): son los encargados de preparar el endometrio para el embarazo y participan en la síntesis del resto de hormonas esteroideas.
- Andrógenos y corticosteroides, esteroides con 19 átomos de carbono (C_{19}): controlan las características sexuales secundarias masculinas.
- Estrógenos, esteroides con 18 átomos de carbono (C_{18}): controlan las características sexuales secundarias femeninas, el desarrollo de los órganos femeninos, la inducción de enzimas responsables del metabolismo de carbohidratos y lípidos, la motilidad intestinal, la coagulación sanguínea y la retención de sodio (Na^+) y agua (Nelson y Cox, 2013; King, 2019).

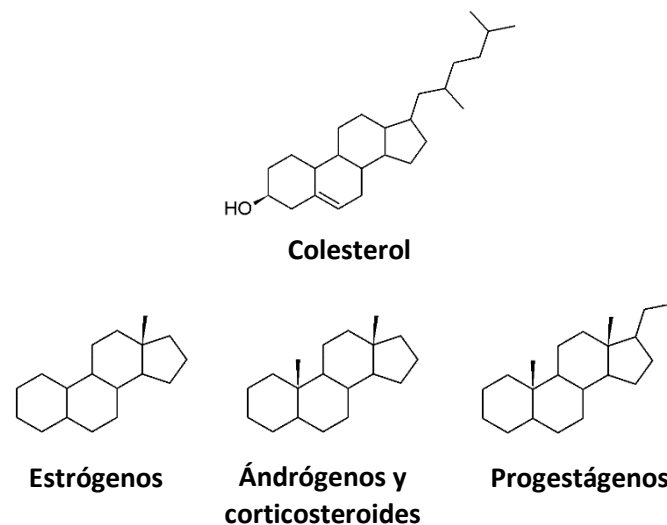


Figura 1.1.- Estructuras de los principales esteroides.

Los estrógenos, a su vez, se clasifican en dos grupos: endoestrógenos y exoestrógenos, pudiendo ser naturales o sintéticos.

Como endoestrógenos tenemos la estrona (E_1), el 17α -estradiol (17α - E_2), el 17β -estradiol (17β - E_2) y el estriol (E_3) que son sintetizados por el organismo. El 17β - E_2 se considera el más importante ya que es el que presenta mayor capacidad estrogénica seguido por la E_1 . Por otra

parte, el E_3 posee una capacidad intermedia mientras que el $17\alpha-E_2$ es el que menor capacidad estrogénica tiene. (Tapiero y cols., 2002; Socas-Rodríguez y cols., 2013).

Los exoestrógenos son compuestos ajenos al organismo. Estos a su vez pueden ser obtenidos de forma natural (fito- y micoestrógenos) o sintética. Entre estos últimos cabe destacar el etinilestradiol (EE_2), debido a su uso como medicamento, y los estilbenos dietilestilbestrol (DES), dienestrol (DS) y hexestrol (HEX), los cuales se utilizan de forma ilegal para estimular el crecimiento del ganado. Por otra parte, los micoestrógenos zearalenona (ZEN), zearalanona (ZAN), α -zearalanol (α -ZAL), β -zearalanol (β -ZAL), α -zearalenol (α -ZEL) y β -zearalenol (β -ZEL), son metabolitos secundarios de especies de hongos del género *Fusarium* comúnmente empleados para el engorde de ganado. (Jarošová y cols., 2015). Finalmente, dentro de los exoestrógenos también se encuentran los fitoestrógenos, compuestos no esteroideos que son producidos por diferentes tipos de plantas. Incluyen isoflavonas como biochanin A, daidzeína, genisteína, gliciteína, formononetina y prunetina, las cuales están presentes en plantas comestibles, especialmente en soja y leguminosas, y lignanos como el enterodiol y la enterolactona, que provienen de semillas. Estos estrógenos no son biológicamente activos, pero cuando llegan al intestino humano, se transforman en su forma activa libre mediante la acción de sulfatasas y glucuronidasas bacterianas presentes en la flora intestinal, dando lugar a diversos trastornos endocrinos o incluso al desarrollo de ciertos tipos de cánceres (Socas-Rodríguez y cols., 2013).

Además, estos compuestos pueden estar presentes en leches y derivados lácteos a partir del tratamiento veterinario del ganado, por la ingesta de alimentos ricos en fito- y micoestrógenos, como por ejemplo piensos y cultivos de cereales, o incluso debido a factores medioambientales. También, debido al consumo de alimentos y aguas contaminados por parte del ganado, ya sea por fuentes naturales o por la transferencia desde envases de plástico, entre otros. (Serrano y cols., 2001).

Por otro lado, la principal fuente de ingesta de estrógenos es la dieta, no solo de productos lácteos, sino también de carnes, huevos, alimentos de origen vegetal y fúngico, los cuales son una vía importante de exposición de fito- y micoestrógenos. (Kuhnle y cols., 2008).

Los niveles más altos de estas hormonas los encontramos en la leche. Esto se debe a que actualmente las prácticas llevadas a cabo por los ganaderos consisten en ordeñar el ganado en el último periodo del embarazo, donde los niveles de E_1 son especialmente elevados, ya que su concentración aumenta durante el pre-parto y, también, durante los primeros días de lactancia (Jouan y cols., 2006). Un ejemplo es el caso de las vacas Holstein, originarias de Alemania y los

Países Bajos. Estas se inseminan artificialmente tres meses después del parto, permitiendo que los animales sigan lactando durante casi todo el período de embarazo. Es decir, 305 días al año en lugar de 150 días como en las prácticas convencionales (Ganmaa y cols., 2012). También, como ya se ha indicado anteriormente, el empleo de algunos esteroides anabólicos para el aumento de la masa corporal del ganado ha tenido mucha influencia en los niveles de estrógenos en la leche ya que, aunque su utilización está prohibida en la mayoría de los países, sigue existiendo un mercado “negro” para su uso ilegal (Noppe y cols., 2008).

Los niveles a los que se encuentran estos compuestos en los productos lácteos son muy bajos. Sin embargo, dicho contenido puede ser perjudicial para la salud. A pesar de ello, no existen límites máximos de residuos establecidos para estos analitos en las muestras evaluadas (García y Romano, 2016), aunque distintas organizaciones, como la EFSA (European Food Safety Authority), han limitado su uso con fines veterinarios (RD 2178/2004). Por todo ello, es muy importante el desarrollo de metodologías analíticas, altamente selectivas y sensibles que permitan su identificación y cuantificación de forma eficaz. En este sentido, el método QuEChERS (de las siglas en inglés, *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*) ha sido ampliamente utilizado, así como las técnicas cromatografías acopladas a detectores de espectrometría de masas (MS, acrónimo del inglés *mass spectrometry*) que permiten la identificación inequívoca de estos compuestos (Perestrelo y cols., 2019).

Este método fue desarrollado inicialmente por Michelangelo Anastassiades y Steven J. Lehotay en el año 2003 para la determinación de residuos de plaguicidas en frutas y hortalizas (Anastassiades y cols., 2003). El procedimiento se basa en una primera etapa de extracción con de acetonitrilo (ACN) y sales, y una segunda de limpieza de la muestra utilizando la extracción en fase sólida dispersiva (dSPE, acrónimo del inglés *dispersive solid phase extraction*). Sin embargo, la enorme versatilidad de la metodología, así como los buenos resultados obtenidos en términos de eficacia de extracción y selectividad han permitido su aplicación para la evaluación de un gran número de compuestos en variedad de matrices complejas incluyendo el análisis de estrógenos en leches y derivados lácteos (Perestrelo y cols., 2019).

En lo que respecta a las técnicas cromatográficas utilizadas en el análisis de este tipo de compuestos, existe un gran número de trabajos en los que se han aplicado tanto la cromatografía líquida (LC, acrónimo del inglés *liquid chromatography*) como la cromatografía de gases, aunque otras técnicas como la electroforesis también han sido aplicadas. Estas se han acoplado a detectores convencionales como el ultravioleta, de diodos en serie y detector de ionización de llama. Sin embargo, el uso de técnicas como la MS son cada vez más utilizadas ya

que permiten el análisis de estos compuestos a niveles de concentración muy bajos, presentando una alta sensibilidad y, además, permiten su determinación de forma inequívoca, aspecto de vital importancia en muestras alimentarias altamente consumidas por la población como son las leches y derivados lácteos (Ehling y cols., 2013).

2.- Objetivo del trabajo

El objetivo principal de este Trabajo de Fin de Grado es la determinación de estrógenos en productos lácteos ampliamente consumidos por la población utilizando una metodología analítica altamente novedosa y un sistema de separación y detección de última generación.

Para llevar a cabo este objetivo, se han establecido los siguientes objetivos específicos:

- Llevar a cabo una revisión bibliográfica exhaustiva de las diferentes metodologías analíticas utilizadas para la determinación de estrógenos en productos lácteos.
- Seleccionar un grupo de estrógenos naturales, sintéticos, micoestrógenos y fitoestrógenos teniendo en cuenta su posible presencia en productos lácteos.
- Aplicar el método QuEChERS para llevar a cabo la extracción de los analitos de las muestras de interés.
- Determinar el grupo de compuestos seleccionado utilizando la cromatografía líquida de ultra-alta eficacia (UHPLC, acrónimo del inglés *ultra-high-performance liquid chromatography*) acoplada a un espectrómetro de masas como sistema de detección.
- Presentar adecuadamente los datos obtenidos y realizar un análisis de los resultados.
- Exponer las conclusiones obtenidas de interés para los consumidores de las muestras evaluadas.

3.- Parte Experimental

3.1.- Patrones, disolventes, reactivos y disoluciones

- Estándares internos: 17 β -estradiol-2,4,16,17-d₅ (17 β -E₂d₅) (Sigma-Aldrich Chemie) y β -zeralanol-10,10,11,12,12-d₅ (β -ZAL-d₅) (Witega Laboratorien Berlin-Adlershof GmbH).
- Estándares analíticos: E₁, 17 α -E₂, 17 β -E₂, E₃, EE₂, DES, DS, HEX, ZEN, ZAN, α -ZAL, α -ZEL, β -ZAL, β -ZEL, biochanin A, daidzeína, genisteína, gliciteína, formonnetina, prunetina, enterolactona y enterodiol (Sigma-Aldrich Chemie). Se prepararon disoluciones estándar de cada uno de los analitos a una concentración de 100 mg/L en metanol (MeOH).
- Disolventes: ACN y MeOH grado LC-MS (Merck) y disolución de hidróxido de amonio (25 %, v/v) (Fluka).
- Agua Milli-Q (conductividad 18,2 μ S/cm a 25 °C) obtenida de un equipo Milli-Q Gradient A10 (Millipore).
- Sales: sulfato de magnesio anhidro (MgSO₄), pureza del 97 % (Panreac Quimica SA), cloruro sódico (NaCl), pureza del 99,5 % (Sigma-Aldrich Chemie) y octadecilsilano (C₁₈) (Macherey-Nagel).

3.2.- Materiales

Tabla 3.1. Materiales empleados.

Material	Casa comercial
Vasos de precipitado de vidrio de 25, 50, 100 y 250 mL	DURAN
Matraces Erlenmeyer de vidrio de 50 ml	Witeg
Tubos de centrifuga de polipropileno (PP) de 50 mL	VWR International
Puntas desechables para pipetas automáticas de distintos volúmenes	Gilson
Jeringa de plástico de 10 mL	Becton Dickinson
Filtros Chromafil® PET-20/15 MS	Macherey-Nagel
Viales de vidrio de 2 mL para LC-MS	Waters Chromatography
Viales de inserción de vidrio de 300 μ L	Sigma-Aldrich Chemie

3.3.- Equipos

3.3.1.- Instrumentos

Tabla 3.2.- Instrumentos empleados.

Instrumento	Casa comercial
Balanza analítica de precisión 0,1 mg	Sartorius
Balanza granatario de precisión 0,01 g	Sartorius
Micropipetas automáticas	Brand
Cromatógrafo de líquidos Acquity UPLC H-Class	Waters Chromatography
MS Xevo QqQ	Waters Chromatography

3.3.2.- Aparatos

Tabla 3.3.- Aparatos empleados.

Aparato	Casa comercial
Agitador vórtex	Scientific Industries, Inc.
Sistema de purificación de agua modelo Milli-Q gradient A-10	Millipore
Centrífuga modelo 5810 R	Eppendorf
Rotavapor	Büchi Labortechnik
Baño de ultrasonidos 3510-MT	Branson

3.3.3.- Columnas cromatográficas

Tabla 3.4.- Columnas cromatográficas empleadas.

Columna	Casa comercial
Columna Acquity UPLC BEH C ₁₈ (50 mm x 2,1 mm, 1,7 µm)	Waters Chromatography
Precolumna Acquity UPLC BEH C ₁₈ (5 mm x 2,1 mm, 1,7 µm)	

3.3.4.- Programas informáticos

- Software MassLynx™ 4.1 de Waters Chromatography para el control de los parámetros del espectrómetro de masas, visualización y tratamiento de los datos adquiridos.

- Programa Microsoft® Office Excel 2016 para la elaboración de las hojas de cálculo y tratamiento de los datos.
- Programa Microsoft® Word 2016 para la elaboración de la memoria.
- Programa Microsoft® PowerPoint 2016 para la representación de los cromatogramas obtenidos.

3.4.- Muestras

En el presente trabajo se analizaron los siguientes tipos de muestras obtenidas en varios supermercados locales:

Tabla 3.5.- Muestras evaluadas.

Tipo de muestra				
Leche		Yogur	Kéfir	Queso
Entera de vaca	Entera sin lactosa	Natural al estilo griego	Natural de vaca	Fresco de cabra
Semidesnatada de vaca	Desnatada de inicio para lactantes	Semidesnatada sin lactosa	Natural de cabra	Fresco de vaca
Desnatada de vaca	Desnatada de continuación	Natural de cabra	Entero de vaca sin lactosa	Fresco desnatado de vaca
Semidesnatada de cabra	Desnatada de crecimiento	Natural de oveja		
Desnatada de oveja				

3.5.- Procedimientos experimentales

3.5.1.- Separación cromatográfica

La separación del grupo de mico- y fitoestrógenos se obtuvo empleando MeOH como fase móvil A y agua como fase móvil B, mientras que para los estrógenos naturales y sintéticos se utilizó una mezcla MeOH/ACN (50/50, v/v) (A) y una disolución de hidróxido amónico 2 mM (B). En la Tabla 3.5. se describe el gradiente de elución aplicado para todo el grupo de compuestos. El volumen de inyección fue de 5 µL a 10 °C, mientras que la columna y pre-columna estaban termostalizadas a 40 °C.

Tabla 3.5.- Gradiente de elución aplicado.

Tiempo (min)	Fase móvil A (%)	Fase móvil B (%)	Flujo (mL/min)
Inicial	10,0	90,0	0,3
0,5	40,0	60,0	0,3
8,0	99,9	0,1	0,4
10,0	99,9	0,1	0,4
12,0	10,0	90,0	0,3

La detección y cuantificación de los analitos seleccionados se llevó a cabo mediante MS trabajando en modo de monitorización de reacción múltiple (MRM, acrónimo del inglés *Multiple Reaction Monitoring*), utilizando un ion precursor y dos iones productos. La presión del gas de colisión (argón) fue de 0,5 bar. En la Tabla 3.6 se muestran las condiciones con las que se obtuvo la máxima intensidad de los iones precursores.

La obtención de los espectros de MS/MS (espectrometría de masas en tándem) se llevó a cabo mediante la fragmentación de la molécula protonada $[M-H]^+$ o desprotonada $[M-H]^-$ dependiendo de cada compuesto, la cual fue seleccionada como ion precursor. Las transiciones de MRM, así como los valores de voltaje de cono y energía de colisión de los analitos de interés, se optimizaron automáticamente mediante la perfusión directa en el espectrómetro de masas, de cada uno de los estándares individuales de los estrógenos a una concentración de 2 mg/L en una mezcla de A/B (50/50, v/v).

Tabla 3.6.- Condiciones de trabajo de los diferentes parámetros de la fuente.

Parámetro	Valor
Voltaje del capilar	2,6 kV
Temperatura de la fuente	150 °C
Temperatura de desolvatación	150 °C
Flujo del gas cono (N ₂)	150 L/h
Flujo del gas de desolvatación (N ₂)	550 L/h

3.5.2.- Pretratamiento aplicado a los productos lácteos

Para llevar a cabo el método QuEChERS, inicialmente las muestras fueron homogeneizadas durante 3 min. En primer lugar, se pesaron 10 g de las muestras de yogurt, queso y Kéfir en un

tubo de centrifuga de PP de 50 mL, se añadieron 5 mL de agua Milli-Q y la mezcla se agitó durante 1 min utilizando un vórtex. En el caso de las muestras de leche, se tomaron 15 mL y se transfirieron a un tubo de centrifuga de PP de 50 mL. Luego, se añadieron 15 mL de ACN y la mezcla fue agitada manualmente durante 1 min. A continuación, se adicionaron 6 g de MgSO₄ anhidro, 1,5 g de NaCl, se agitaron nuevamente de forma manual durante 1 min, y se sometieron a ultrasonidos durante 5 min. Seguidamente, se centrifugaron durante 15 minutos a 5 °C y 4000 r.p.m. Una vez finalizada la centrifugación, se transfirieron 14 mL del sobrenadante a un nuevo tubo de centrifuga de PP de 50 mL que contenía 180 mg de C₁₈ y 1,8 g de MgSO₄ anhidro, se agitaron durante 1 min y centrifugaron de nuevo en las mismas condiciones. En el caso de las muestras de queso, se emplearon 500 mg de C₁₈ debido al mayor contenido graso de esta matriz. Después, se recogieron 8 mL del sobrenadante, y se evaporaron en el rotavapor a 40 °C y 165 mbar. Finalmente, el residuo se reconstituyó en 500 µL de una mezcla MeOH/H₂O (50/50, v/v), se filtró usando un filtro Chromafil® PET-20/15 y se inyectaron 5 µL en el sistema UHPLC-MS/MS.

3.5.3.- Validación de la metodología

Con el fin de verificar la validación de la metodología previamente desarrollada (Socas-Rodríguez y cols., 2017a; Socas-Rodríguez y cols., 2017b) se llevó a cabo un calibrado en la matriz en el rango de concentraciones de interés y un estudio de recuperaciones a un nivel intermedio de concentración en las matrices lácteas.

4.- Resultados y discusión

Para llevar a cabo el presente estudio se aplicó una metodología previamente desarrollada por Socas-Rodríguez y cols. (Socas-Rodríguez y cols., 2017a) y basada en la extracción mediante el método QuEChERS seguido para una separación y determinación mediante UHPLC-MS/MS. Con el objetivo de asegurar la fiabilidad de los resultados obtenidos se realizó una validación de la metodología mediante los correspondientes estudios de calibración y recuperaciones obteniendo resultados acordes a los presentados en el estudio inicial, con recuperaciones en el rango 80 - 120 % y límites de cuantificación (LOQs, acrónimo del inglés *limits of quantification*) entre 0,025 y 2,50 µg/kg. Los resultados de las recuperaciones se muestran en la Tabla 4.1, mientras que la separación cromatográfica de los compuestos evaluados se encuentra en la Figura 4.1.

Una vez validada la metodología se llevó a cabo la evaluación de las muestras seleccionadas, entre las que se incluyen 9 muestras de leche, 3 muestras de queso fresco, 3 muestras de kéfir y 4 yogures, que se compraron en diferentes supermercados de Tenerife. En la Tabla 4.2 se muestran los estrógenos determinados. Se encontraron 5 fitoestrógenos (daidzeína, gliciteína, enterolactona, genisteína y formononetin), sin embargo, no se hallaron endoestrógenos, estrógenos sintéticos ni micoestrógenos en ninguna de las muestras.

Los fitoestrógenos encontrados en mayor cantidad fueron la daidzeína y la genisteína con rangos de concentraciones entre 0,7 - 30,1 µg/kg y 21,3 - 50,1 µg/kg, respectivamente, fundamentalmente en leches infantiles. El fitoestrógeno hallado en mayor número de muestras, presente en 5 de las 19 analizadas, fue la enterolactona, con un rango de concentraciones de 1,5 - 5,6 µg/kg, siendo hallado en todos los yogures y en la leche de oveja. Estos datos son similares a los encontrados en otros trabajos previos en los que también se ha evaluado la presencia de este tipo de compuestos en leches y derivados lácteos de distinto origen. En dichos casos, se determinó la presencia de daidzeína, gliciteína y enterolactona entre 1,76 y 46,7 µg/kg en muestras también comercializadas en Canarias (Socas-Rodríguez y cols., 2017a; Socas-Rodríguez y cols., 2017b), y en el rango 11,7 - 30,5 µg/kg (Křížová y cols., 2011) para muestras procedentes de la República Checa. Sin embargo, otros estudios (Kuhnle y cols., 2008) han encontrado concentraciones superiores para ciertos analitos como la enterolactona, 30 - 230 µg/kg, en algunos de los productos comercializados en Reino Unido. Como indica Křížová y cols. (Křížová y cols., 2011), dichas diferencias pueden relacionarse con la variabilidad en las dietas del ganado, así como en los procesos de elaboración de los productos comercializados.

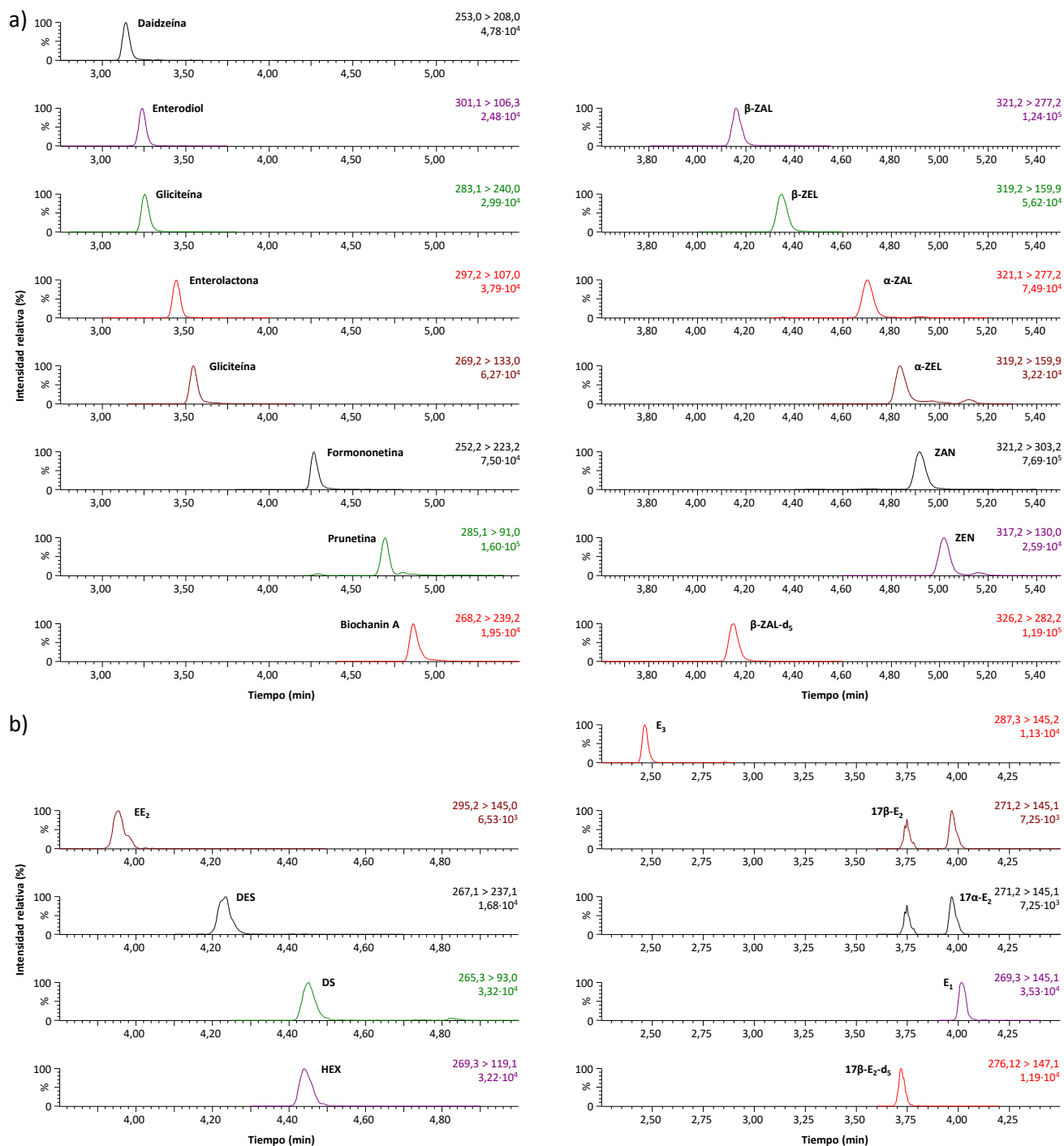


Figura 4.1. - a) Cromatogramas UHPLC–MS/MS para fitoestrógenos, microestrógenos y β -ZAL- d_5 (IS); b) Cromatogramas UHPLC–MS/MS para estrógenos naturales, sintéticos y 17β - E_2 - d_5 (IS) de una muestra láctea enriquecida tras aplicar el procedimiento QuEChERS. Volumen de inyección: 5 μ L. Reconstitución de la muestra en 500 μ L de una mezcla MeOH/H₂O (50/50, v/v). Temperatura de la columna: 40 °C. Concentración del IS y los analitos en la muestra: 25 μ g/kg y 17.5 μ g/kg, respectivamente.

En cuanto a la gliciteína y la formononetina, fueron halladas en menor cantidad, pero se encontraron junto con la daidzeína y la genisteína en leches infantiles, en concentraciones en torno a 3,5 - 5,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente. En la Figura 4.2. se muestran los cromatogramas obtenidos para una de las leches infantiles analizadas. Estos datos son bastante llamativos ya que, se trata de 4 de los 5 fitoestrógenos analizados los que se han hallado en dichas muestras y, además, en concentraciones muy elevadas como es el caso de dos de ellos, la daidzeína y la genisteína. Este hecho podría dar lugar al desarrollo de trastornos hormonales o incluso cáncer, como previamente se menciona en la introducción, en un sector de la población especialmente vulnerable como son los bebés recién nacidos y niños que consumen este tipo de productos, que además constituyen uno de los principales aportes nutricionales de su dieta. Por lo tanto, es un dato a tener en cuenta para que sea trasladado a nivel poblacional y al sector de la sanidad, y se puedan aplicar medidas para que se cumpla la ley en cuanto al uso de estrógenos sólo con fines veterinarios, así como que se lleve a cabo la correcta práctica de ordeño evitando las etapas pre-parto y de lactancia del ganado, y más, si se trata de alimentos infantiles.

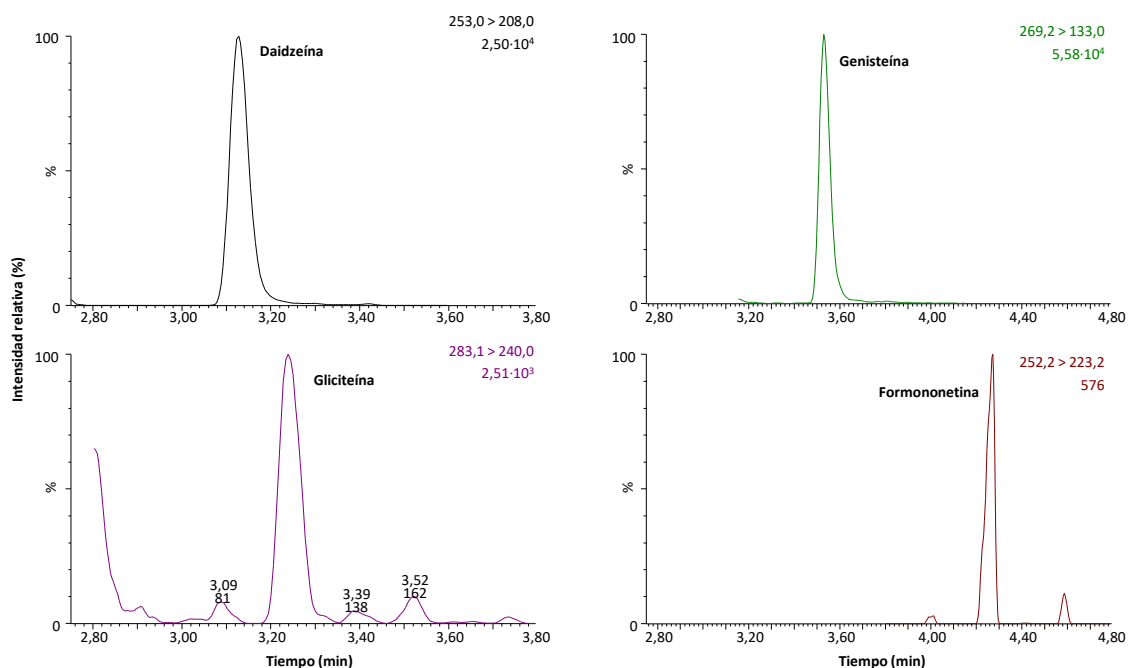


Figura 4.2.- Cromatogramas de los analitos encontrados en una muestra real de leche infantil tras aplicar la metodología QuEChERS-UHPLC-MS/MS. Volumen de inyección: 5 μL . Reconstitución de la muestra en 500 μL de una mezcla MeOH/H₂O (50/50, v/v). Temperatura de la columna: 40 °C.

Los datos obtenidos son de gran importancia ya que, la metodología empleada para el estudio posee una alta sensibilidad y especificidad, es decir, que se trata de un análisis inequívoco. Sin

embargo, este estudio constituye una primera aproximación, que, en vista de los resultados obtenidos, creemos que sería interesante ampliar el número de muestras para poder ofrecer una información de relevancia.

Tabla 4.1.- Resultados del estudio de recuperaciones (n = 3) del método QuEChERS-UHPLC-MS/MS para el grupo de estrógenos seleccionado.

Analito	Recuperación (%)
Daidzeína	102
Enterodiol	97
Gliciteína	103
Enterolactona	92
Genisteína	102
Formononetina	102
Prunetina	90
Biochanin A	80
β -ZAL	100
β -ZEL	96
α -ZAL	103
α -ZEL	108
ZAN	101
ZEN	99
EE ₂	114
DES	109
DS	107
HEX	109
E ₃	113
17 β -E ₂	103
17 α -E ₂	120
E ₁	110

Tabla 4.2.- Resultados obtenidos del análisis de diferentes productos lácteos usando el método QuEChERS-UHPLC-MS/MS.

Muestras	Concentración encontrada ($\mu\text{g}/\text{kg}$)				
	Daidzeína	Gliciteína	Enterolactona	Genisteína	Formononetina
Leche de vaca entera	n.d.	n.d.	< LOQ	n.d.	n.d.
Leche de vaca semidesnatada	n.d.	n.d.	< LOQ	n.d.	n.d.
Leche de vaca desnatada	n.d.	n.d.	< LOQ	n.d.	n.d.
Leche sin lactosa	n.d.	n.d.	< LOQ	n.d.	n.d.
Leche de cabra	< LOQ	< LOQ	< LOQ	n.d.	n.d.
Leche de oveja	< LOQ	n.d.	5,6 \pm 2,9	n.d.	n.d.
Leche infantil 1	24,3 \pm 0,4	4,6 \pm 1,2	< LOQ	33,1 \pm 0,7	1,0 \pm 0,8
Leche infantil 2	16,7 \pm 0,4	3,5 \pm 1,2	< LOQ	21,3 \pm 0,7	< LOQ
Leche infantil 3	30,1 \pm 0,4	5,2 \pm 1,2	n.d.	50,1 \pm 0,7	1,0 \pm 0,8
Queso fresco entero	n.d.	n.d.	< LOQ	n.d.	n.d.
Queso fresco desnatado	n.d.	n.d.	< LOQ	n.d.	n.d.
Queso fresco de cabra	0,7 \pm 0,4	n.d.	< LOQ	n.d.	n.d.
Kéfir cabra	< LOQ	n.d.	< LOQ	n.d.	n.d.
Kéfir vaca	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Kéfir vaca sin lactosa	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Yogur sin lactosa	n.d.	n.d.	2,0 \pm 1,1	n.d.	n.d.
Yogur griego	n.d.	n.d.	3,1 \pm 2,9	n.d.	n.d.
Yogur oveja	n.d.	n.d.	2,8 \pm 1,1	n.d.	n.d.
Yogur cabra	n.d.	n.d.	1,5 \pm 1,1	n.d.	n.d.

n.d.: no detectado; LOQ: límite de cuantificación.

5.- Conclusiones

De los resultados obtenidos en este Trabajo de Fin de Grado podemos establecer las siguientes conclusiones:

- Se ha realizado una búsqueda bibliográfica de las diferentes metodologías utilizadas para la determinación de estrógenos en productos lácteos, encontrándose que las técnicas cromatográficas y, en concreto, la LC acoplada a la MS como sistema de detección es una de las opciones más adecuada para la separación y determinación de estos compuestos.
- Se ha seleccionado un grupo de 4 endoestrógenos y 4 sintéticos, 6 microestrógenos y 8 fitoestrógenos, teniendo en cuenta su posible presencia en productos lácteos y se ha validado de forma parcial una metodología alternativa basada en los principios de la química verde para su determinación en matrices lácteas altamente consumidas por la población.
- Se ha aplicado correctamente el método QuEChERS para llevar a cabo la extracción y preconcentración de los analitos en las muestras de interés.
- Se ha empleado con éxito la UHPLC acoplada a un espectrómetro de masas para separar y determinar el grupo de estrógenos seleccionados.
- Se ha seleccionado un grupo de 19 muestras obtenidas en distintos supermercados de la isla de Tenerife para su posterior análisis, incluyendo 6 muestras de leche, 3 de queso, 4 de yogur, 3 de kéfir y 3 lácteos destinados a la población infantil.
- Se ha realizado un análisis de los resultados obtenidos, observando la presencia de varios de los fitoestrógenos seleccionados (daidzeína, gliciteína, enterolactona, genisteína y formononetina) en muestras de distinta naturaleza, especialmente en el caso de los productos infantiles, en los que se determinó un mayor número de analitos, así como las concentraciones más altas; mientras que ninguno de los microestrógenos ni los endoestrógenos o sintéticos fueron determinados en el estudio.

6.- Bibliografía

A

Anastassiades M, Lehotay SJ, Štajnbaher D, Schenck FJ. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *J. AOAC Int.* 2003;86:412-431.

E

Ehling S, Reddy TM. Liquid chromatography–mass spectrometry method for the quantitative determination of residues of selected veterinary hormones in powdered ingredients derived from bovine milk. *J. Agric. Food Chem.* 2013;61:11782-11791.

G

Ganmaa D, Cui X, Feskanich D, Hankinson SE, Willett WC. Milk, dairy intake and risk of endometrial cancer: a twenty six-year follow-up. *Int. J. Cancer.* 2012;130(11):2664-2671.

García K, Romano D. Directo a tus hormonas: guía de alimentos disruptores. Residuos de plaguicidas con capacidad de alterar el sistema endocrino en los alimentos españoles. 2016, 1-26. Disponible en: <https://www.ecologistasenaccion.org/wp-content/uploads/adjuntos-spip/pdf/informe-plaguicidas-2016.pdf>

González-Curbelo MÁ, Socas-Rodríguez B, Herrera-Herrera AV, González-Sálamo J, Hernández-Borges J, Rodríguez-Delgado MÁ. Evolution and applications of the QuEChERS method. *TrAC-Trend. Anal. Chem.* 2015; 71:169-185.

J

Jarošová B, Javůrek J, Adamovský O, Hilscherová K. Phytoestrogens and mycoestrogens in surface waters — Their sources, occurrence, and potential contribution to estrogenic activity. *Environ. Int.* 2015;81:26-44.

Jouan PN, Pouliot Y, Gauthier SF, Laforest JP. Hormones in bovine milk and milk products: A survey. *Int. Dairy J.* 2006;16:1408-1414.

K

King MW. themedicalbiochemistrypage.org [Sede Web]. [actualizado 12 de mayo de 2016; consultado 15 de febrero de 2019]. Disponible en: <https://themedicalbiochemistrypage.org/es/steroid-hormones-sp.php#intro>

Křížová L, Veselý A, Třináctý J, Schulzová V, Hurajová A, Hajšlová J, Kvasničková E, Havlíková Š. Changes in isoflavones concentrations in cheese during processing and ripening. *Acta Univ. Agric. Silvic.* 2011;59:153–162.

Kuhnle GGC, Dell'Aquila C, Aspinall SM, Runswick SA, Mulligan AA, Bingham SA. Phytoestrogen Content of Foods of Animal Origin: Dairy Products, Eggs, Meat, Fish, and Seafood. *J. Agric. Food Chem.* 2008;56(21):10099-10104.

N

Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Sixth ed. New York: Freeman & Company; 2013.

Noppe H, Le Bizec B, Verheyden, K, De Brabander HF. Novel analytical methods for the determination of steroid hormones in edible matrices. *Anal. Chim. Acta.* 2008;611:1-16.

P

Perestrelo R, Silva P, Porto-Figueira P, AM Pereira J, Silva C, Medina S, S Cámara J. QuEChERS - Fundamentals, relevant improvements, applications and future trends. *Anal. Chim. Acta.* (en prensa).

R

REAL DECRETO 2178/2004, de 12 de noviembre, por el que se prohíbe utilizar determinadas sustancias de efecto hormonal y tireostático y sustancias beta-agonistas de uso en la cría de ganado. *Boletín Oficial del Estado*, nº 274, (13-02-2004) [consultado 19 de marzo de 2019]. Disponible en: <https://www.boe.es/boe/dias/2004/11/13/pdfs/A37490-37494.pdf>.

S

Serrano NO, Fernández Cabrera MF, Martín Olmedo P. Disruptores endocrinos. El caso particular de los xenobióticos estrogénicos. I Estrógenos naturales. *Salud Ambient.* 2001;1:6-11.

Socas-Rodríguez B, Asensio-Ramos M, Hernández-Borges J, Herrera-Herrera AV, Rodríguez-Delgado MA. Chromatographic analysis of natural and synthetic estrogens in milk and dairy products. *TrAC-Trends. Anal. Chem.* 2013;44:58-77.

Socas-Rodríguez B, Herrera-Herrera AV, Hernández-Borges J, Rodríguez-Delgado MA. Multiresidue determination of estrogens in different dairy products by ultra-high-performance

liquid chromatography triple quadrupole mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 2017a;1496:58-67.

Socas-Rodríguez B, Lanková D, Urbancová K, Krtková V, Hernández-Borges J, Rodríguez-Delgado MA, Pulkrabová J, Hajšlová J. Multiclass analytical method for the determination of natural/synthetic steroid hormones, phytoestrogens, and mycoestrogens in milk and yogurt. *Anal. Bioanal. Chem.* 2017b;409:4467-4477.

T

Tapiero H, Nguyen G, Tew KD. Estrogens and environmental estrogens. *Biomed. Pharmacother.* 2002;56:36-44.

7.- Glosario

17 α -E ₂	17 α -estradiol
17 β -E ₂	17 β -estradiol
17 β -E ₂ -d ₅	17 β -estradiol-2,4,16,17-d ₅
ACN	Acetonitrilo
C ₁₈	Octadecilsilano
DES	Dietilestilbestrol
DS	Dienestrol
dSPE	Extracción en fase sólida dispersiva
E ₁	Estrona
E ₃	Estriol
EE ₂	Etinilestradiol
EFSA	European Food Safety Authority
HEX	Hexestrol
LOQ	Límite de cuantificación
MeOH	Metanol
MRM	Monitorización de reacción múltiple
MS	Espectrometría de masas
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
PP	Polipropileno
PTFE	Politetrafluoroetileno
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe
UHPLC	Cromatografía líquida de ultra-alta eficacia
ZAN	Zearalanona
ZEN	Zearalenona

α -ZAL	α -zearalanol
α -ZEL	α -zearalenol
β -ZAL	β -zearalanol
β -ZAL-d ₅	β -zearalanol-10,10,11,12,12-d ₅
β -ZEL	β -zearalenol