



**Universidad  
de La Laguna**

# **Monitorización de compuestos estrogénicos en productos lácteos comercializados en Canarias.**

Monitoring of estrogenic compounds in dairy products marketed in Canary Islands.

**Cecilia Arrate Martí**

**Grado en Farmacia**

**2020/2021**

**Tutores:**

Dr. Miguel Ángel Rodríguez Delgado

Dra. Bárbara Socas Rodríguez

D. MIGUEL ÁNGEL RODRÍGUEZ DELGADO, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA, Y DÑA. BÁRBARA SOCAS RODRÍGUEZ, INVESTIGADORA POSTDOCTORAL “JUAN DE LA CIERVA” DEL CSIC

**AUTORIZAN:**

La presentación y defensa del Trabajo de Fin de Grado titulado: **“Monitorización de compuestos estrogénicos en productos lácteos comercializados en Canarias.”** realizado por Dña. Cecilia Arrate Martí, durante el curso académico 2020-2021 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 junio de 2021.

Fdo: D. Miguel Ángel Rodríguez Delgado      Fdo: Dña. Bárbara Socas Rodríguez

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3558385      Código de verificación: cSgi3+0k

Firmado por: Miguel Ángel Rodríguez Delgado  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha 2021/06/22 16:13:27

Bárbara Socas Rodríguez  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

2021/06/22 16:15:31

## Índice de contenidos

<b>Abstract</b> .....	3
<b>Resumen</b> .....	4
<b>1. Introducción</b> .....	5
<b>2. Objetivo del trabajo.</b> .....	8
<b>3. Parte experimental.</b> .....	9
3.1. Patrones, disolventes, reactivos y disoluciones.....	9
3.2. Material. ....	9
3.3. Equipos.....	10
3.3.1. Instrumentos. ....	10
3.3.2. Aparatos.....	10
3.3.3. Columnas cromatográficas .....	11
3.3.4. Programas informáticos.....	11
3.4. Muestras .....	11
3.6. Procedimientos experimentales.....	12
3.6.1. Metodología QuEChERS. Pretratamiento de las muestras. ....	12
3.6.2. Separación cromatográfica.....	13
3.6.3. Validación del método. ....	13
<b>4. Resultados y discusión.</b> .....	13
<b>5. Conclusiones</b> .....	17
<b>6. Referencias bibliográficas.</b> .....	19
<b>7. Glosario</b> .....	22

## **Abstract**

Estrogens are a group of sex hormones naturally synthesized in the human body that fulfil diverse functions in the organism. However, when there is an overexposure to this type of hormones, it can trigger a large number of diseases, including cancer. The objective of this study has been to analyze the occurrence of these type of hormones in dairy products consumed by Canary Island population. With this aim, 18 samples of dairy products marketed in the archipelago have been examined. These samples have been analyzed using the previously validated QuEChERS method for the extraction and preconcentration of the analytes with estrogenic activity and subsequently and ultra-high performance liquid chromatography coupled to a tandem mass spectrometry has been applied to separate and quantify the analytes in order to evaluate the exposure of the Canarian population to these estrogens. The results showed the occurrence of two phytoestrogens, enterolactone in all analyzed samples and glycitein in one of them.

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

## Resumen

Los estrógenos son un conjunto de hormonas sexuales sintetizados de manera natural en el cuerpo humano que cumplen diversas funciones en el organismo. Sin embargo, cuando hay una sobreexposición a este tipo de hormonas puede desencadenar un gran número de enfermedades, entre ellas cáncer. El objetivo de este trabajo ha sido analizar la presencia de este tipo de hormonas en productos lácteos altamente consumidos por la población canaria. Para ello se han examinado 18 muestras de productos lácteos comercializados en el archipiélago. Dichas muestras se han analizado a través del método, previamente validado, QuEChERS, para la extracción y preconcentración de los analitos con actividad estrogénica y seguidamente se ha aplicado la cromatografía líquida de ultra-alta eficacia acoplada a un espectrómetro de masas en tándem para separar y cuantificar los analitos con el fin de evaluar la exposición de la población canaria a estos estrógenos. Los resultados mostraron la presencia de dos fitoestrógenos, enterolactona en todas las muestras y gliciteína en una de ellas.

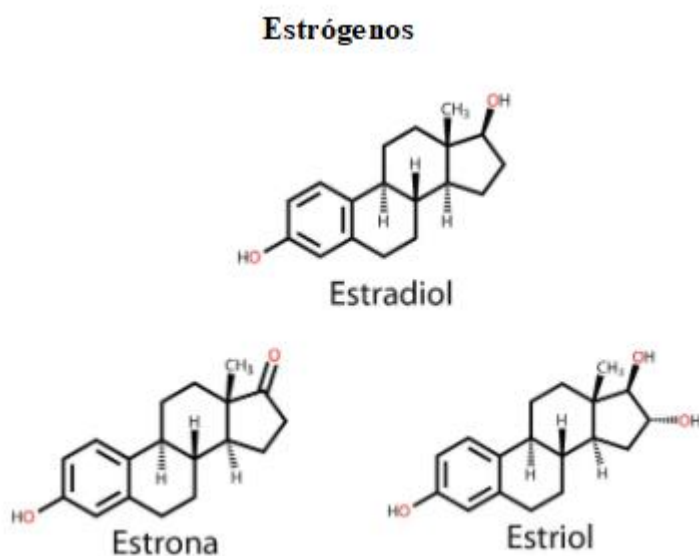
**Palabras clave:** estrógenos, productos lácteos, QuEChERS, cromatografía líquida de ultra-alta eficacia, espectrometría de masas.

## 1. Introducción

El colesterol es un compuesto lipídico que se encuentra en la membrana plasmática y en el torrente sanguíneo, a partir de él se sintetizan las hormonas esteroideas, que tienen diversas funciones reguladoras en nuestro organismo.

Dentro de este grupo de compuestos cabe destacar los estrógenos que son las hormonas reguladoras de los caracteres sexuales femeninos secundarios. Dentro de los cuales encontramos la estrona ( $E_1$ ) (3-hydroxy-13-methyl-7,8,9,11,12,14,15,16-octahydro-6H-cyclopentaphenanthren-17-one) con 17 átomos de carbono, el estradiol ( $E_2$ ), tanto el  $17\alpha$ -estradiol ( $17\alpha$ - $E_2$ ) ( $17\alpha$ -estra-1,3,5(10)-triene-3,17-diol ( $17\alpha$ - $E_2$ ) como el  $17\beta$ -estradiol ( $17\beta$ - $E_2$ ) ( $17\beta$ -estra-1,3,5(10)-triene-3,17-diol ( $17\beta$ - $E_2$ ) con 18 átomos de carbono y el estriol ( $E_3$ ) ((16alfa,17beta)-Estra-1,3,5(10)-trieno-3,16,17-triol) con 18 átomos de carbono.

**Figura 1:** Estructuras de los principales estrógenos naturales.



Fuente: Farmacia informativa (s.f.). Recuperada de: <https://farmaciainformativa.com/estrogenos/>

Entre las funciones de los estrógenos se encuentran: la preparación del organismo para la etapa de ovulación y menstruación, el mantenimiento de un adecuado perfil lipídico, disminuyendo el LDL y aumentando el HDL, el mantenimiento de una masa ósea apropiada, estimulación de la libido y regulación de la formación del colágeno del tejido conectivo. Sin embargo, los estrógenos no son hormonas exclusivamente

femeninas, también se encuentran en el hombre y son encargadas de regular la hormona LH, la homeostasis esquelética y también en la fisiología de los lípidos y en la cardiovascular (Marcos Becerro, 2008).

Este tipo de estrógenos que sintetiza el cuerpo humano los conocemos como endoestrógenos, pero también existe otro grupo llamados exoestrógenos. Estos son compuestos estrogénicos ajenos a nuestro organismo que pueden ser de origen natural o sintético (Socas-Rodríguez et al., 2013).

Entre ellos podemos encontrar micoestrógenos, como la zearalenona (ZEN), zearalanona (ZAN),  $\alpha$ -zearalanol ( $\alpha$ -ZAL),  $\beta$ -zearalanol ( $\beta$ -ZAL),  $\alpha$ -zearalenol ( $\alpha$ -ZEL) y  $\beta$ -zearalenol ( $\beta$ -ZEL), que son metabolitos secundarios de especies de hongos del género *Fusarium* comúnmente empleados para el engorde de ganado. (Jarošová y cols., 2015) y también podemos encontrar fitoestrógenos, que son compuestos no esteroideos presentes en diferentes plantas, por ejemplo: isoflavonas como biochanin A, daidzeína, genisteína, gliciteína, formononetina y prunetina y lignanos como el enterodiol y la enterolactona.

Estos estrógenos carecen de biodisponibilidad, pero a través de la acción de sulfatasas y glucuronidasas bacterianas presentes en la flora intestinal, se obtiene su forma biológicamente activa, causante de algunas enfermedades como ciertos tipos de cáncer (Socas-Rodríguez et al., 2013).

En cuanto a los exoestrógenos sintéticos, estos se consumen por vía oral, a través de medicamentos como anticonceptivos o terapias de sustitución hormonal postmenopáusicas. El más importante es el etinilestradiol (EE<sub>2</sub>), aunque existen otros presentes en algunos medicamentos que se usan de forma ilegal para el crecimiento del ganado como, por ejemplo, los estilbenos como el dietilestilbestrol (DES), el dienestrol (DS) y el hexestrol (HEX) (Socas-Rodríguez et al., 2013).

Hay muchas maneras de ingerir estrógenos a través de la dieta, por medio de alimentos vegetales, de hongos comestibles y a través de alimentos de origen animal, tales como carne, huevos y la más importante, productos lácteos (Kuhnle et al., 2008).

Una concentración excesiva de estrógenos en la mujer puede producir: síndrome premenstrual, endometriosis, alteraciones en el sangrado menstrual, hiperplasia del endometrio, mastopatía fibroquística, miomas y cánceres de seno, ovario y endometrio.

(MedlinePlus. (s.f.)). Además, puede aumentar la producción de la hormona TSH y provocar hipotiroidismo (IntraMed. (s.f.)).

En cuando a las alteraciones en el varón, cabe destacar la ginecomastia, el aumento de grasa corporal en la zona baja del abdomen y la cadera, pérdida de la libido, disfunción eréctil, depresión, hiperplasia de la próstata, atrofia testicular e infertilidad y diabetes tipo 2 (Clínica Andrológica de Madrid. (s.f.)). Por lo que es importante controlar este tipo de compuestos, ya que un exceso de estos en el organismo conlleva al desarrollo de múltiples enfermedades, tanto en la mujer como en el hombre.

Como mencionamos anteriormente los productos lácteos son una de las mayores fuentes de consumo de estrógenos, esto se debe tanto a la dieta del ganado (fito- y micoestrógenos), factores medioambientales como la transmisión de estos productos estrogénicos por transferencia a partir de envases de plástico y/o tratamiento del ganado, tanto mediante el uso de medicamentos, como el estado hormonal de la vaca cuando es ordeñada. (Serrano et al., 2001). La leche recogida en el último periodo de la gestación y los primeros días de lactancia es muy rica en E<sub>1</sub>, (Jouan et al., 2006). Además, el uso ilegal de anabolizantes para el crecimiento del ganado desempeña un papel importante ya que estos esteroides pueden atravesar las glándulas mamarias y llegar a la leche (Noppe et al., 2008).

La cantidad de estrógenos en productos lácteos no es muy grande, sin embargo, es necesario hacer controles, ya que unas mínimas cantidades de estas sustancias puede ser perjudiciales para la salud y, aunque no existen límites máximos de residuos (García y Romano, 2016), la EFSA (*European Food Safety Authority*) ha limitado el uso de productos que puedan contener estrógenos para fines veterinarios (RD 2178/2004).

Por estas razones se han desarrollado métodos analíticos para detectar y cuantificar estas sustancias. El método que se utiliza para desarrollar la parte experimental de este trabajo de final de grado es el método QuEChERS (*del inglés, Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*), ampliamente conocido por su versatilidad y desarrollado por Anastassiades y cols. en 2003. Este procedimiento de extracción, limpieza y preconcentración se combina con cromatográficas acopladas a detectores de espectrometría de masas, que han permitido identificar y cuantificar los analitos de las muestras analizadas con alta fiabilidad.

El método QuEChERS, consta de dos etapas: una primera extracción sólido-líquido utilizando acetonitrilo y una segunda etapa de limpieza de muestra con una extracción en



fase sólida dispersiva (dSPE) (M. Anastassiades, 2003). Este método no sólo se usa para la detección de estrógenos en productos lácteos, sino también para la determinación de plaguicidas en productos alimentarios, objetivo para el que fue inicialmente desarrollado, así como para la evaluación de otros analitos y matrices dentro de campos como el biológico o el medioambiental, en los que hay que hacer ciertas modificaciones del método inicialmente descrito por los creadores. (Santana-Mayor, y cols. 2019)

## **2. Objetivo del trabajo.**

El objetivo principal de este trabajo de fin de grado es evaluar y cuantificar la presencia de los posibles compuestos estrogénicos que se pueden encontrar en algunos productos lácteos comercializados en Canarias utilizando técnicas analíticas de última generación. Para ello se han establecido los siguientes objetivos específicos:

- Revisión bibliográfica de las principales hormonas sexuales, en particular de los estrógenos, ya que estos compuestos constituyen el grupo de interés seleccionado para el estudio debido a su posible presencia en productos lácteos y sus posibles efectos negativos sobre la salud.
- Estudio del método QuEChERS: origen, finalidad, etapas y reactivos utilizados.
- Verificación de la validación del método empleado para el análisis de estrógenos en derivados lácteos.
- Aplicación del método QuEChERS, para extraer los analitos, seguida de su determinación mediante cromatografía líquida de ultra-alta eficacia (*UHPLC*, acrónimo del inglés *ultra-high performance liquid chromatography*) acoplada a un espectrómetro de masas.
- Presentación y análisis de los datos obtenidos.
- Exposición de las conclusiones sobre los datos que son de interés para los consumidores de estos productos lácteos.

### 3. Parte experimental.

#### 3.1. Patrones, disolventes, reactivos y disoluciones.

- Agua Milli-Q, agua ultrapura de laboratorio (conductividad 18,2  $\mu\text{S}/\text{cm}$  a 25 °C).
- Sales: sulfato de magnesio anhidro ( $\text{MgSO}_4$ ), pureza del 98 % (Scharlau SA), utilizado en ambas etapas para eliminar el agua presente, cloruro sódico ( $\text{NaCl}$ ), pureza del 99,5% (Sigma-Aldrich Chemie), usado en la primera fase para ayudar a separar la fase orgánica del agua y octadecilsilano ( $\text{C}_{18}$ ) (Macherey-Nagel), elimina grasas y otros compuestos no polares.
- Disolventes: acetonitrilo (ACN) (VWR Chemicals) y metanol (MeOH) grado LC-MS (Merck).
- Estándares internos:  $17\beta$ -estradiol-2,4,16,17- $\text{d}_5$  ( $17\beta$ -E<sub>2</sub>- $\text{d}_5$ ) (Sigma-Aldrich Chemie) y  $\beta$ -zeralanol-10,10,11,12,12- $\text{d}_5$  ( $\beta$ -ZAL- $\text{d}_5$ ) (Witega Laboratorien Berlin-Adlershof GmbH).
- Estándares analíticos: E<sub>1</sub>,  $17\alpha$ -E<sub>2</sub>,  $17\beta$ -E<sub>2</sub>, E<sub>3</sub>, EE<sub>2</sub>, DES, DS, HEX, ZAN, ZEN,  $\alpha$ -ZAL,  $\alpha$ -ZEL,  $\beta$ -ZAL,  $\beta$ -ZEL, biochanin A, daidzeína, genisteína, gliciteína, formonetina, prunetina, enterolactona y enterodiol (Sigma-Aldrich Chemie).

#### 3.2. Material.

**Tabla 1:** *Materiales utilizados.*

<b>Material</b>	<b>Casa comercial</b>
Vasos de precipitados de vidrio de 25, 50, 100 y 250mL.	SIMAX
Matraces Erlenmeyer de vidrio de 50 mL	Witeg
Tubos de centrifuga de polipropileno (PP) de 50 mL	VWR internacional
Puntas desechables para pipetas automáticas de distintos volúmenes	Eppendorf
Jeringa de plástico de 10 mL	Braun

Filtros Chromafil® PET-20/15 MS	Macherey-Nagel
Viales de vidrio de 2mL para LC-MS	Waters Chromatography
Viales de inserción de vidrio de 300 µL	Sigma-Aldrich Chemie

### 3.3. Equipos.

#### 3.3.1. Instrumentos.

**Tabla 2:** *Instrumentos empleados.*

<b>Instrumento</b>	<b>Casa comercial</b>
Balanza analítica de precisión 0,1mg	Sartorius
Micropipetas automáticas	Eppendorf
Cromatógrafo de líquidos Acquity UPLC H-Class	Waters Chromatography
MS Xevo QqQ	Waters Chromatography

#### 3.3.2. Aparatos.

**Tabla 3:** *Aparatos utilizados.*

<b>Aparato</b>	<b>Casa Comercial</b>
Agitador Vórtex	Vórtex Genie 2
Sistema de purificación de agua modelo Milli-Q gradient A-10	Millipore
Centrífuga modelo 5810 R	Eppendorf
Rotavapor	IKA ® RV 10 basic
Baño de ultrasonidos 3510- MT	Branson
Baño de ultrasonidos	P-Selecta Ultrasons
Minipimer	Braun

### 3.3.3. Columnas cromatográficas

**Tabla 4:** *Columnas cromatográficas empleadas*

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

### 3.3.4. Programas informáticos.

- Para la elaboración de la memoria se ha utilizado: Microsoft® Word® para Microsoft 365 MSO.
- Para el tratamiento de los datos obtenidos en la práctica experimental se ha aplicado: Microsoft® Excel® para Microsoft 365 MSO.
- Para el control del espectrómetro de masas, visualización y tratamiento de los datos se ha utilizado: Software MassLynx™ 4.1 de Waters Chromatography.
- Para la preparación de figuras se ha utilizado: Apache OpenOffice 4.1.2.

### 3.4. Muestras

**Tabla 5:** *Descripción de las muestras analizadas.*

Producto	Valores nutricionales (en 100 g)		
	Grasas (g)	Hidratos de Carbono (g)	Proteínas (g)
Leche Fresca Semidesnatada	1,5	4,6	3,1
Kéfir natural	4,2	5,1	3,9
Probiótico natural_1	0,4	4,0	2,9
Probiótico natural_2	1,4	5,2	3,3
Probiótico natural_3	1,4	12	2,5
Probiótico sabor a naranja	1,4	14,5	2,2

Yogurt natural azucarado	2,0	10,3	2,4
Compota	2,9	19,3	3,3
Queso fresco	14	3,0	11
Queso fresco 0%	<0,5	3,6	12
Queso de untar	29,2	4,2	5,1
Producto lácteo infantil sabor a fresa	2,5	12,8	6,0
Yogurt infantil_1	2,5	9,1	2,0
Yogurt infantil_2	2,6	78	12
Yogurt líquido infantil_1	3,1	11,0	3,2
Yogurt líquido infantil_2	2,7	11,2	5,6
Yogurt líquido infantil_3	2,9	15	2,6
Producto lácteo infantil sabor a chocolate	7,2	27,8	4,5

### 3.6. Procedimientos experimentales

#### 3.6.1. Metodología QuEChERS. Pretratamiento de las muestras.

- *Pretratamiento de muestras sólidas:*

Las muestras de queso se homogeneizan con una minipimer durante unos minutos antes de ser tratadas. Posteriormente, se pesan 10 g en un tubo de centrifuga de plástico de 50 mL y se añaden 5 mL de agua Milli-Q. A continuación, se agita en un vórtex durante un minuto.

- *Pretratamiento de muestras líquidas y semi-líquidas:*

Se toman 15 mL en un tubo de centrifuga de 50 mL y se determina su masa en la balanza de precisión.

Una vez pesadas las muestras en el tubo de 50 mL, se añaden 15 mL de ACN y se agita manualmente durante un minuto. Seguidamente se añaden 6 g de MgSO<sub>4</sub> anhidro y 1,5g de NaCl. Se agita nuevamente durante un minuto, vigorosamente, y se introducen los tubos durante cinco minutos en un baño de ultrasonidos. Se centrifugan durante 15

min a 4000 r.p.m. y 5 °C. Posteriormente se toma el sobrenadante, aproximadamente 14 mL y se añade a un tubo de centrifuga de 50 mL que contiene 1,8 g de MgSO<sub>4</sub> anhidro y 180 mg de C<sub>18</sub> en el caso de las muestras líquidas y 500 mg en el caso de las muestras sólidas.

Se vuelven a centrifugar los tubos en las mismas condiciones, transcurridos los 15 minutos, se recoge el sobrenadante, 8 mL, en un matraz Erlenmeyer de 50 mL y se evapora el disolvente en un rotavapor a 40 °C y 165 mbar.

Finalmente, el residuo seco se reconstituye en el matraz con 500 µL de una mezcla de MeOH/H<sub>2</sub>O (50/50; V/V), se filtra con un filtro Chromafil ® PET-20/15, y se trasvasa a un vial de inyección. Finalmente se inyectan 5 µL en el sistema UHPLC-MS/MS.

### **3.6.2. Separación cromatográfica.**

Las inyecciones se hicieron utilizando un volumen de 5 µL a 10 °C en la columna de cromatografía líquida que se encontraba a 40 °C, acoplada a un espectrómetro de masa (MS).

Se utilizó como fase móvil A: MeOH y como fase móvil B: Agua Milli-Q, para la separación de los fito- y micoestrógenos, mientras que para los estrógenos sintéticos y naturales se utilizó como fase móvil A una mezcla de MeOH/ACN (50/50, v/v) y como fase móvil B una disolución de hidróxido amónico 2 mM.

### **3.6.3. Validación del método.**

Esta metodología desarrollada por Socas-Rodríguez et al., 2017, fue validada con un calibrado en la matriz en el rango de concentraciones de interés, así como un estudio de recuperaciones. Con el objetivo que garantizar los resultados obtenidos, en el presente trabajo de fin de grado se han verificado los resultados de la validación mediante la realización de un estudio de recuperaciones a un nivel de concentración intermedio, cerca del centroide de las correspondientes curvas de calibrado. El estudio de recuperaciones es útil para verificar que no ha habido un error cuantificable de pérdida de analitos durante el proceso experimental.

## **4. Resultados y discusión.**

Para realizar esta monitorización de los compuestos estrogénicos en productos lácteos, se ha

aplicado la metodología desarrollada por Socas Rodríguez et al. 2017, que previamente se había optimizado y validado en el grupo de investigación en el que se ha llevado a cabo el presente trabajo de fin de grado. Para ello se ha utilizado el método QuEChERS, junto con una separación por cromatografía de líquidos acoplada a un sistema de espectrometría de masas en una serie de muestras seleccionadas, adquiridas en diferentes supermercados de Tenerife.

Como esta metodología ya había sido previamente validada, para asegurar que los datos obtenidos son fiables, se ha realizado un estudio de recuperaciones utilizando tres réplicas (n=3). El rango obtenido para estas recuperaciones, que se exponen en la Tabla 6, varía entre un 80 y un 120%, con una desviación estándar relativa (RSD) < 19%, valores dentro de un rango aceptables (M. Anastassiades, 2003).

**Tabla 6:** Datos de las recuperaciones promedias con estándar interno (IS).

<b>Analito</b>	<b>Recuperación (%)</b>
ZAN	101
Formonetina	102
Daidzeína	102
Biochanin A	80
Genisteína	102
Gliciteína	103
Enterolactona	92
Enterodiol	97
ZEN	99
$\beta$ -ZEL	96
$\alpha$ -ZEL	108
$\alpha$ -ZAL	103
$\beta$ -ZAL	100
DS	107
DES	109
HEX	109

17 $\beta$ -E <sub>2</sub>	103
E <sub>1</sub>	110
17 $\alpha$ -E <sub>2</sub>	120
E <sub>3</sub>	113
EE <sub>2</sub>	114

En lo que respecta al análisis de muestras comercializadas, se encontraron dos fitoestrógenos en las muestras analizadas. Por un lado, la enterolactona en todas las muestras, pero en la mayoría en pequeñas cantidades, es decir en concentraciones por debajo del límite de cuantificación del método (LOQ) (Socas Rodríguez et al., 2017). Sólo dos muestras pudieron ser cuantificadas: la muestra de Probiótico natural\_3 ( $1,8 \pm 1,1$   $\mu\text{g/kg}$ ) y el Yogurt líquido infantil\_1 ( $3,0 \pm 1,1$   $\mu\text{g/kg}$ ). Por otro lado, la gliciteína en la muestra Queso fresco ( $1 \pm 0,4$   $\mu\text{g/kg}$ ). No se encontraron otros analitos en el resto de las muestras evaluadas.

**Tabla 8:** Resultados obtenidos del análisis de diferentes productos lácteos usando el método QuEChERS-UHPLC-MS/MS.

Muestras	Concentración ( $\mu\text{g/kg}$ ) del analito	
	Enterolactona	Gliciteína
Leche fresca semidesnatada	<LOQ	n.d.
Kéfir	<LOQ	n.d.
Actimel	<LOQ	n.d.
L. Casei	$1,8 \pm 1,1$	n.d.
L. Casei naranja	<LOQ	n.d.
Natural Azucarado	<LOQ	n.d.
Actimel	<LOQ	n.d.
Cuidacol	<LOQ	n.d.
Compota	<LOQ	n.d.
Burgo de Arias Original	<LOQ	$1,0 \pm 0,4$



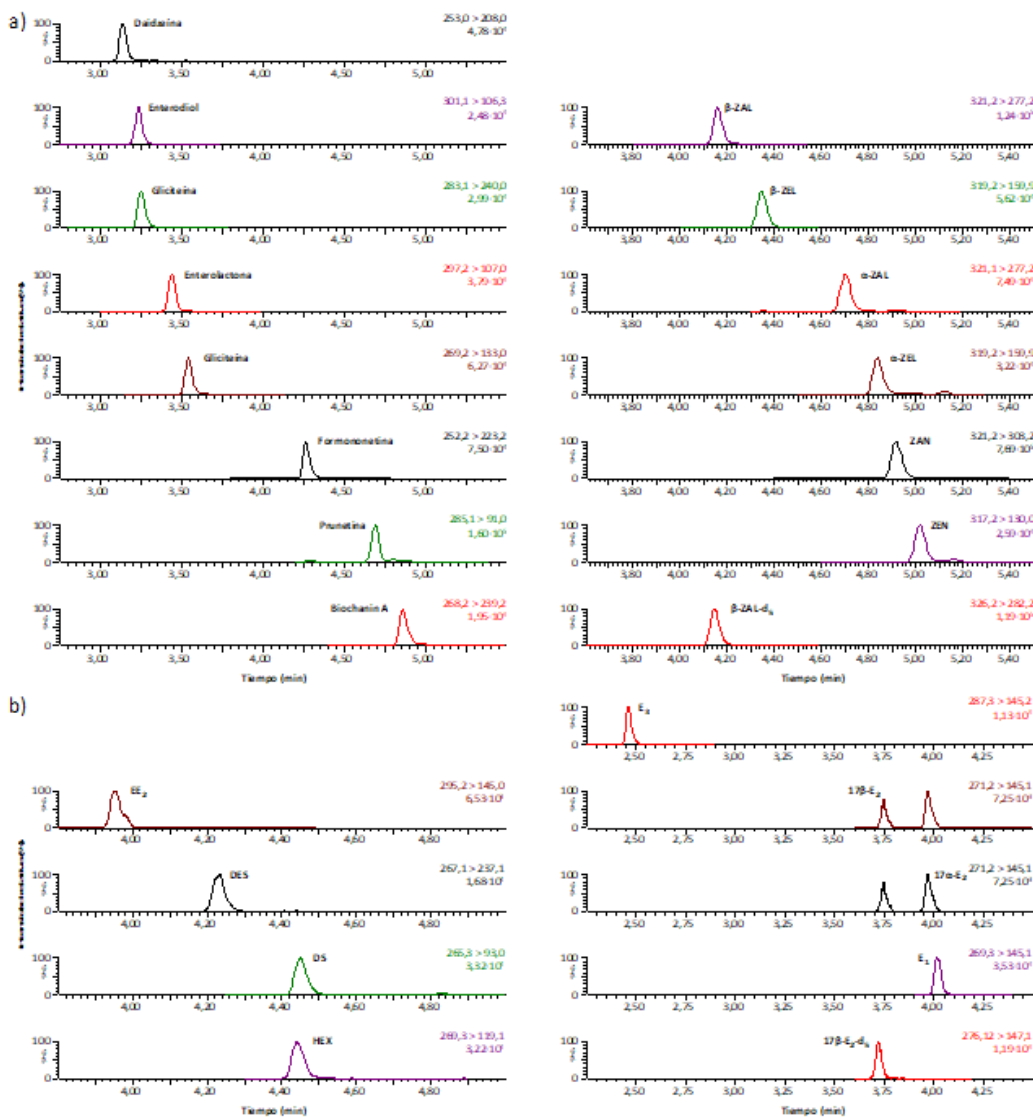
Burgo de Arias 0%	<LOQ	n.d.
Philadelphia	<LOQ	n.d.
Danonino	<LOQ	n.d.
Mi primer Danone	<LOQ	n.d.
NaturNes Bio	<LOQ	n.d.
Yogolino	3 ± 1,1	n.d.
Yoco Squeezy	<LOQ	n.d.
YogiKids	<LOQ	n.d.
Petit Nesquik Chocolate	<LOQ	n.d.

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

En los estudios anteriores de Socas Rodríguez en 2017 y 2018, donde también se analizaron productos comercializados en Canarias, obtuvieron una mayor cantidad de muestras positivas. En el primero de los estudios se encontró daidzeína, gliciteína y enterolactona entre 1,76 y 46,7 µg/kg, (Socas Rodríguez et al., 2017) y en el segundo daidzeína y genisteína, con concentraciones entre 0,7 - 30,1 µg/kg y 21,3 - 50,1 µg/kg, respectivamente, fundamentalmente en leches infantiles (Socas Rodríguez et al., 2018).

Hay estudios en países extranjeros donde los analitos y las concentraciones son diferentes, por ejemplo: se han encontrado concentraciones superiores para ciertos analitos como la enterolactona, 30 - 230 µg/kg, en el Reino Unido (Kuhnle et al., 2008), pero esto se puede deber a las diferencias entre las dietas de los ganados de los respectivos países y el proceso de elaboración de los productos (Křížová et al., 2011).

A continuación, se presenta en la Figura 4.1, la separación cromatográfica de los compuestos analizados.



**Figura 2:** a) Cromatogramas UHPLC–MS/MS para fitoestrógenos, microestrógenos y  $\beta$ -ZAL- $d_5$  (IS); b) Cromatogramas UHPLC–MS/MS para estrógenos naturales, sintéticos y  $17\beta$ -E $_2$ - $d_5$  (IS) de una muestra láctea enriquecida tras aplicar el procedimiento QuEChERS.

## 5. Conclusiones

De los resultados obtenidos en el presente trabajo de fin de grado se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Se realizó una búsqueda bibliográfica de los mejores métodos y formas de análisis para la determinación de compuestos estrogénicos en productos lácteos de la que se concluyó que el método QuEChERS y la cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas era la forma más adecuada de analizar las muestras.

- Se seleccionaron los analitos teniendo en cuenta su posible presencia en las muestras seleccionadas, así como sus efectos negativos para la salud de los consumidores. El grupo de analitos seleccionados fue: cuatro endoestrógenos naturales y cuatro sintéticos, seis microestrógenos y ocho fitoestrógenos.
- Se escogió un tipo de leche, un tipo de kéfir, tres quesos, un yogur, cuatro probióticos naturales, una compota que contenía queso, cinco tipos de yogures infantiles y dos productos lácteos infantiles; muestras altamente consumidas, fundamentalmente por niños, ya que en estudios anteriores la mayoría de los estrógenos fueron hallados en este tipo de producto lácteo, en diferentes supermercados de Tenerife.
- Se aplicó con éxito la metodología QuEChERS y la UHPLC-MS/MS, en el laboratorio, verificando la validez del método a través de un estudio de recuperaciones en el que se obtuvieron valores aceptables, en el rango 80-120%.
- Se llevó a cabo el análisis de los resultados obtenidos, en el que se concluyó que solo tres de las 18 muestras analizadas tenían niveles cuantificables de dos fitoestrógenos, Probiótico natural\_3 y el Yogurt líquido infantil\_1, que contenían enterolactona y la muestra de Queso fresco donde se encontró gliciteína.

## 6. Referencias bibliográficas.

- Michelangelo Anastassiades, Steven J Lehotay, Darinka Štajnbaher, Frank J Schenck, Fast and Easy Multiresidue Method Using Acetonitrile Extraction / Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce, *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, Volumen 86, Edición 2, 1 de marzo de 2003, páginas 412–431, <https://doi.org/10.1093/jaoac/86.2.412>
- Carlota Beneito Fernández, et al. (2019). Evaluación del contenido de estrógenos en productos lácteos. [Trabajo de fin de grado Universidad de La Laguna]. <https://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/15983/Evaluacion%20del%20contenido%20de%20estrogenos%20en%20productos%20lacteos%20.pdf?sequence=1>
- Clínica Andrológica de Madrid. (s.f). *Estrógenos en el hombre*. <https://andrologica.es/2/estrogenos-en-el-hombre/>
- Farmacia informativa (s.f). [Fotografía] Recuperada de: <https://farmaciainformativa.com/estrogenos/>
- García K, Romano D. (2016). Directo a tus hormonas: guía de alimentos disruptores. *Residuos de plaguicidas con capacidad de alterar el sistema endocrino en los alimentos españoles*. (pp.1- 26). Disponible en: <https://www.ecologistasenaccion.org/wp-content/uploads/adjuntospip/pdf/informe-plaguicidas-2016.pdf>
- IntraMed. (s.f). *Interacción entre las hormonas tiroideas y las hormonas sexuales*. <https://www.intramed.net/contenidover.asp?contenidoid=15779&pagina=3>
- Jarošová, B., Javůrek, J., Adamovský, O., & Hilscherová, K. (2015). Phytoestrogens and mycoestrogens in surface waters--Their sources, occurrence, and potential contribution to estrogenic activity. *Environment international*, 81, 26–44. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.03.019>

- Jouan, PN. (2006) *Hormones in bovine milk and milk products: A survey*. International Dairy Journal 16, 1408-1414, <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.06.007>.
- Křížová, L., Veselý, A., Třináctý, J., Schulzová, V., Hurajová, A., Hajšlová, J., Kvasničková, E. y Havlíková, Š. (2011). Cambios en las concentraciones de isoflavonas en el queso durante el procesamiento y la maduración. *Acta Univ. Agric. Silvic. Mendel. Brun.*, 59 (1), 153-162. doi: 10.11118 / actaun201159010153
- Kuhnle, G. G., et al. (2008). Phytoestrogen content of foods of animal origin: dairy products, eggs, meat, fish, and seafood. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(21), 10099–10104. <https://doi.org/10.1021/jf801344x>
- Marcos Becerro, JF. (2008). Las hormonas esteroideas sexuales, el envejecimiento y el ejercicio. *Revista Andaluza de Medicina del Deporte*, 1, 22-36. Centro Andaluz de Medicina del Deporte Sevilla, España. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=323327654005>
- MedlinePlus. (s.f.). *Estrógeno*. <https://medlineplus.gov/spanish/druginfo/meds/a682922-es.html>
- Noppe, H., et al. (2008). Novel analytical methods for the determination of steroid hormones in edible matrices. *Analytica chimica acta*, 611(1), 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.01.066>
- 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). Disponible en: <https://www.boe.es/boe/dias/2004/11/13/pdfs/A37490-37494.pdf>.
- Santana-Mayor, &., Socas-Rodríguez, B., Herrera-Herrera, A., & Rodríguez-Delgado, M. (2019). Current trends in QuEChERS method. A versatile procedure for food,

environmental and biological analysis. *TrAC, Trends in Analytical Chemistry (Regular Ed.)*, 116, 214-235.

Serrano N. O, et al. (2001). Disruptores endocrinos. El caso particular de los xenobióticos estrogénicos. I Estrógenos naturales. *Salud Ambient.* (pp. 1:6- 11). <https://ojs.diffundit.com/index.php/rsa/article/view/434>.

Socas-Rodríguez B, et al. (2017a). Multiresidue determination of estrogens in different dairy products by ultra-high-performance liquid chromatography triple quadrupole mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* (pp. 1496:58-67).

Socas-Rodríguez B et al. (2017b). Multiclass analytical method for the determination of natural/synthetic steroid hormones, phytoestrogens, and mycoestrogens in milk and yogurt. *Anal. Bioanal. Chem.* (pp. 409:4467-4477).

## 7. Glosario

17 $\alpha$ -E <sub>2</sub>	17 $\alpha$ -estradiol
17 $\beta$ -E <sub>2</sub>	17 $\beta$ -estradiol
17 $\beta$ -E <sub>2</sub> -d <sub>5</sub>	17 $\beta$ -estradiol-2,4,16,17-d <sub>5</sub>
ACN	Acetonitrilo
C <sub>18</sub>	Octadecilsilano
DES	Dietilestilbestrol
DS	Dienestrol
dSPE	Extracción en fase sólida dispersiva
E <sub>1</sub>	Estrona
E <sub>3</sub>	Estriol
EE <sub>2</sub>	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
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe
UHPLC	Cromatografía líquida de ultra-alta eficacia
ZAN	Zearalanona
ZEN	Zearalenona 26
$\alpha$ -ZAL	$\alpha$ -zearalanol
$\alpha$ -ZEL	$\alpha$ -zearalenol
$\beta$ -ZAL	$\beta$ -zearalanol
$\beta$ -ZAL-d <sub>5</sub>	$\beta$ -zearalanol-10,10,11,12,12-d <sub>5</sub>
$\beta$ -ZEL	$\beta$ -zearalenol