



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
GRADUAÇÃO EM QUÍMICA INDUSTRIAL

JÚLIA MARIA DA SILVA DIAS

**IMPLEMENTAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA
IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CONTAMINANTES EMERGENTES
POR CROMATOGRAFIA**

Recife—

2024

JÚLIA MARIA DA SILVA DIAS

**IMPLEMENTAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA
IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CONTAMINANTES EMERGENTES
POR CROMATOGRAFIA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado a Coordenação do Curso de
Graduação em Química Industrial da
Universidade Federal de Pernambuco,
como requisito parcial à obtenção do grau
de Bacharel em Química Industrial.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniella Carla Napoleão.

Coorientadora: Dr^a. Danúbia Maria da Silva Freitas.

Recife

2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Dias, Júlia Maria da Silva .

Implementação e validação de metodologia analítica para identificação e
quantificação de contaminantes emergentes por cromatografia. / Júlia Maria da
Silva Dias. - Recife, 2024.

52 : il., tab.

Orientador(a): Daniella Carla Napoleão

Cooorientador(a): Danúbia Maria da Silva Freitas

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, Química Industrial -
Bacharelado, 2024.

Inclui referências.

1. Cromatografia gasosa. 2. Espectrometria de massas. 3. Precisão. 4.
Exatidão. I. Napoleão, Daniella Carla. (Orientação). II. Freitas, Danúbia Maria da
Silva . (Coorientação). IV. Título.

540 CDD (22.ed.)

JÚLIA MARIA DA SILVA DIAS

**IMPLEMENTAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA
IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CONTAMINANTES EMERGENTES
POR CROMATOGRAFIA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado a Coordenação do Curso de
Graduação em Química Industrial da
Universidade Federal de Pernambuco,
como requisito parcial à obtenção do grau
de Bacharel em Química Industrial.

Aprovado em: 25/03/2024

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Daniella Carla Napoleão (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Rosana Casoti (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Alex Leandro Andrade de Lucena (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico esse trabalho a minha mãe, Maria

RESUMO

A validação de métodos analíticos em matrizes complexas é fundamental para assegurar que ele atenda ao seu propósito garantindo a confiabilidade dos resultados obtidos. No presente trabalho foi desenvolvido um método cromatográfico para determinação e quantificação de diclofenaco (DCF), estrona (E1) e β -estradiol (E2) em amostras de efluente doméstico. Para tal, foi utilizado um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas, com sistema de injeção de amostras automático, modo de injeção *split/splitless*, empregando ionização de elétrons e uma coluna capilar SLB® 5MS, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m. O método foi validado de acordo com a resolução nº 166 de 2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o documento DOQ-CGCRE-008 do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) de 2020. Os parâmetros de validação avaliados foram: linearidade, limites de quantificação (LQ), limite de detecção (LD), precisão e exatidão. A linearidade foi avaliada por meio do coeficiente de correlação obtido das análises das curvas analíticas em setuplicata e pelo teste de Grubbs. A exatidão foi determinada pela recuperação dos analitos, enquanto a precisão foi avaliada pela porcentagem do coeficiente de variação. Os valores de LD e LQ foram calculados utilizando parâmetros da curva analítica, incluindo o coeficiente angular da equação e o desvio padrão do menor nível da curva. O método apresentou linearidade na faixa estudada de 50 a 500 μ g.L⁻¹ com coeficiente de correlação linear superior a 0,99, além de boa seletividade e acurácia variando de 1,45 a 5,66%. Através deste estudo, pode-se afirmar que a metodologia empregada é precisa uma vez que apresentou valores de recuperação entre 90 e 107%. Portanto, pode-se afirmar que o método é confiável, uma vez que foi validado e encontra-se apto para aplicado na detecção e quantificação dos analitos estudados.

Palavras-chave: cromatografia gasosa; espectrometria de massas; precisão; exatidão.

ABSTRACT

The validation of analytical methods in complex matrices is essential to ensure that it meets its purpose, guaranteeing the reliability of the results obtained. In the present study, a chromatographic method was developed for the determination and quantification of diclofenac (DCF), estrone (E1), and β -estradiol (E2) in samples of domestic effluent. For this purpose, a gas chromatograph coupled to a mass spectrometer was used, with an automatic sample injection system, split/splitless injection mode, employing electron ionization and an SLB® 5MS capillary column, 30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m. The method was validated according to resolution no. 166 of 2017 of the National Health Surveillance Agency (ANVISA) and document DOQ-CGCRE-008 of the National Institute of Metrology, Quality, and Technology (INMETRO) of 2020. The validation parameters evaluated were: linearity, limits of quantification (LQ), limit of detection (LD), precision, and accuracy. Linearity was assessed using the correlation coefficient obtained from the analysis of analytical curves in duplicate and the Grubbs test. Accuracy was determined by the recovery of analytes, while precision was evaluated by the percentage of the coefficient of variation. The LD and LQ values were calculated using analytical curve parameters, including the standard deviation of the linear coefficient of the equation and the angular coefficient. The method showed linearity in the studied range from 50 to 500 μ g.L⁻¹ with a linear correlation coefficient greater than 0.99, in addition to good selectivity and accuracy ranging from 1.45 to 5.66%. Through this study, it can be stated that the methodology used is accurate as it presented recovery values between 90 and 107%. Therefore, it can be stated that the method is reliable since it has been validated and is suitable for application in the detection and quantification of these studied analytes.

Keywords: gas chromatography; mass spectrometry; precision; accuracy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura geral dos compostos esteroides	17
Figura 2 - Fórmula estrutural da estrona	19
Figura 3 - Fórmula estrutural do 17 β -estradiol	20
Figura 4 - Fórmula estrutural do diclofenaco	22
Figura 5 - Esquema geral da SPE	27
Figura 6 -. Cromatogramas de uma amostra adicionada de solução de 500 $\mu\text{g. L}^{-1}$ do diclofenaco (DCF), estrona (E1) e 17 β -estradiol (E2) com suas respectivas massas extraídas	37
Figura 7 - Cromatograma da análise uma amostra sobreposta de um cromatograma dessa mesma amostra adicionada de solução de 500 $\mu\text{g. L}^{-1}$ do diclofenaco (DCF), estrona (E1) e 17 β -estradiol (E2)	38
Figura 8 - Curvas analíticas do diclofenaco (DCF), estrona (E1) e 17 β -estradiol (E2)	39
Figura 9 - Equações da curva analítica e valores de coeficientes de correlação do diclofenaco (DCF), estrona (E1) e 17 β -estradiol (E2)	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Trabalhos estudando os analitos em diversas matrizes utilizando cromatografia líquida	29
Tabela 2 - Parâmetros cromatográficos para a separação do DCF, E1 e E2	32
Tabela 3 - Razões m/z do diclofenaco (DCF), estrona (E1) e 17 β -estradiol (E2)	36
Tabela 4 - Resultados dos valores mínimos e máximos do teste de Grubbs para o DCF, E1 e E2	40
Tabela 5 - Valores dos limites de detecção e quantificação	41
Tabela 6 - Valores de CV (%) para diclofenaco (DCF), estrona (E1) e 17 β -estradiol (E2)	41
Tabela 7 - Resultados de recuperação	42

LISTA DE ABREVIATURAS

AINE	Anti-inflamatórios não esteroides
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CV	Coefficiente de Variância
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DCF	Diclofenaco
ETAR	Estação de Tratamento de Águas Residuárias
ETE	Estação de Tratamento de Efluentes
E1	Estrona
E2	17 β -estradiol
E2-D3	17 β -estradiol Deuterado
GC	Cromatografia Gasosa
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
LC	Cromatografia Líquida
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MS	Espectrometria de Massas
MSTFA	N-trimetilsilil-N-metil trifluoroacetamida
SPE	Extração em fase sólida
UASB	Reator anaeróbio de fluxo ascendente de alta eficiência
UV-VIS	Ultravioleta-visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	OBJETIVOS	14
1.1.1	Objetivo Geral	14
1.1.2	Objetivo Específicos	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	DESREGULADORES ENDÓCRINOS	16
2.1.1	Hormônios esteroides	17
2.1.1.1	<i>Estrona</i>	18
2.1.1.2	<i>17β-estradiol</i>	20
2.2	FÁRMACOS	21
2.2.1	Diclofenaco	21
2.3	TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA DETECÇÃO DE	23
	CONTAMINANTES	
2.3.1	Cromatografia	23
2.3.2	Espectrometria de massas	24
2.3.2.1	<i>Cromatografia acoplada a espectrometria de massas</i>	25
2.4	PREPARAÇÃO DE AMOSTRA	26
2.4.1	Extração em fase sólida	26
2.4.2	Derivatização	27
2.5	VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA	28
2.6	ESTADO DA ARTE	29
3	METODOLOGIA	32
3.1	DETERMINAÇÃO DE HORMÔNIOS E FÁRMACOS VIA	32
	CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A	
	ESPECTROMETRIA DE MASSAS	
3.2	PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE	33
	CROMATOGRÁFICA	
3.3	PREPARAÇÃO DOS PADRÕES DE TRABALHO	33
3.4	VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA	34
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36

4.1	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	36
4.1.1	<i>Linearidade</i>	38
4.1.2	<i>Limites de quantificação e detecção</i>	40
4.1.3	<i>Precisão</i>	41
4.1.4	<i>Exatidão</i>	42
5	CONCLUSÃO	44
	REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

Contaminantes emergentes constituem uma classe de poluentes que vêm chamando a atenção da sociedade científica devido às consequências que podem causar ao meio ambiente, mesmo em concentrações baixas. A preocupação em relação a esses contaminantes decorre de suas propriedades persistentes, bioacumulativas e potencialmente tóxicas, bem como de sua presença em corpos d'água, solos e organismos aquáticos (Liu *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2021).

Nesse grupo de contaminantes estão presentes diversas classes de compostos, incluindo fármacos e desreguladores endócrinos. Os fármacos são medicamentos utilizados para o tratamento de doenças ou prevenção de enfermidades. Entre eles, encontram-se antibióticos, contraceptivos, anestésicos, antilipêmicos, meios de contraste de raios-X, anti-inflamatórios, antivirais, antiparasitários, antidepressivos, entre outros (Liu *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2021).

Os desreguladores endócrinos são substâncias químicas que interferem no sistema endócrino de organismos, afetando a regulação hormonal normal. Essas substâncias podem imitar, bloquear ou alterar a ação dos hormônios naturais do corpo, resultando em uma série de efeitos adversos, como distúrbios hormonais, problemas de reprodução e desenvolvimento, além de poder aumentar o risco de certos tipos de câncer (Diamanti-kandarakis *et al.*, 2009; Kwiatkowska *et al.*, 2017)

Uma das preocupações associadas aos contaminantes emergentes é o potencial impacto na saúde humana e no ecossistema. Estudos têm demonstrado efeitos adversos desses compostos em organismos aquáticos, como disfunção endócrina, alterações no desenvolvimento, efeitos genotóxicos e danos ao sistema nervoso. Além disso, a presença destes poluentes em águas superficiais e subterrâneas pode afetar a qualidade da água potável, representando um risco para a saúde pública (Liu *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2021).

A detecção e o monitoramento desses contaminantes são desafios importantes para garantir a proteção do meio ambiente e da saúde humana. As estações de tratamento de efluentes desempenham um papel importante no tratamento de esgotos sanitários, efluentes hospitalares e efluentes provenientes de indústrias químicas. No entanto, essas estações têm sido reconhecidas como fontes significativas de contaminação por esses compostos (Brandt *et al.*, 2013). Isso

ocorre devido ao fato de que os processos de tratamento convencionais não são completamente eficientes na remoção dessas substâncias. Associado a isto tem-se o déficit de infraestrutura em saneamento, o que contribui para a presença desses contaminantes em diferentes ambientes (Brandt *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2020).

A análise desses contaminantes requer o desenvolvimento e a validação de metodologias analíticas sensíveis e seletivas, capazes de identificar e quantificar uma ampla gama de contaminantes emergentes (Liu *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2021). Dentre as técnicas instrumentais disponíveis para a identificação e quantificação de fármacos e desreguladores endócrinos, a cromatografia, líquida ou gasosa acoplada à espectrometria de massas, é bastante utilizada (Martín-pozo *et al.*, 2019; Robin *et al.*, 2022).

Cromatografia é uma técnica físico-química de separação que está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura. Essa migração ocorre devido a diferentes interações, entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias a torna uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação (Skoog *et al.*, 2013). Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve ser validado (Chiarentin *et al.*, 2023).

A validação consiste em demonstrar que o método analítico é adequado para o seu propósito (Brito *et al.*, 2003). As figuras de mérito são indicadores quantitativos do bom desempenho das técnicas. São elas: seletividade, ajuste da curva analítica e determinação da sua faixa de linearidade, sensibilidade do método. Esta última é representada pelos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), precisão, exatidão e robustez (INMETRO, 2020).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Desenvolver e validar uma metodologia para identificação e quantificação de diclofenaco, estrona e estradiol por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) presentes em matrizes ambientais.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a eficiência de uma metodologia de preparação de amostras eficaz através da extração em fase sólida (SPE);
- Implantar e validar metodologia para identificação de diclofenaco (DCF) por GC-MS;
- Implantar e validar metodologia para identificação de estrona (E1) e 17 β -estradiol (E2) por GC-MS.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A gestão ambiental e a preservação dos recursos hídricos são questões de vital importância na busca por um ambiente saudável e sustentável. Nesse contexto, a análise precisa e confiável de contaminantes, especialmente os desreguladores endócrinos encontrados em esgotos domésticos, desempenha um papel fundamental. A precisa quantificação desses poluentes é indispensável para a avaliação dos riscos à saúde humana, aos ecossistemas aquáticos e para garantir a conformidade com as regulamentações ambientais (GEISSEN, *et al.*, 2015; Zhong, *et al.*, 2022).

Nesse sentido, é importante que as metodologias analíticas destinadas a esse propósito passem por um processo de validação para assegurar a confiabilidade de seus resultados (ANVISA, 2017). A compreensão desse tema é essencial para garantir a confiabilidade dos dados gerados em estudos ambientais e na gestão de recursos hídricos. Além disso, é necessário enfrentar os desafios sucessivos associados à crescente urbanização e às crescentes demandas por água limpa e segura em todo o mundo. Assim, se faz necessário a análise precisa e eficaz de contaminantes em esgoto doméstico, contribuindo para a proteção e sustentabilidade dos ecossistemas aquáticos e da saúde pública (Who, 2006).

2.1. DESREGULADORES ENDÓCRINOS

O aumento das atividades humanas tem resultado na elevação do número de resíduos gerados, contribuindo para encontrar uma maior concentração de contaminantes nas águas. Em especial, os desreguladores endócrinos, que incluem contaminantes tanto de origem natural quanto sintética, têm se destacado como agentes causadores de diversos problemas de saúde (Vieira *et al.*, 2020).

Esses desreguladores podem ser encontrados em uma ampla variedade de produtos de uso cotidiano, como, pesticidas, produtos químicos, cosméticos, entre outros. Sua liberação no meio ambiente pode ocorrer de diversas maneiras, tais como pelo descarte inadequado de resíduos, emissões industriais e liberação de substâncias químicas em embalagens (Vandenberg *et al.*, 2012).

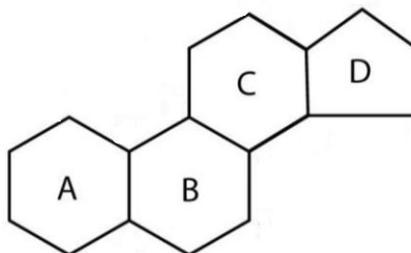
Essas substâncias, ao acumularem-se no organismo e desencadearem alterações nos sistemas endócrinos de humanos e animais selvagens, representam riscos significativos para a saúde, podendo causar lesões cerebrais, hepáticas e pulmonares, problemas de reprodução e câncer mesmo em concentrações reduzidas. A natureza recalcitrante dessas substâncias também torna o sistema atual de gestão de água e águas residuais ineficaz para sua remoção (Olasupo e Suah, 2021; Vieira *et al.*, 2020).

Estudos têm sido conduzidos para investigar os efeitos dos desreguladores endócrinos, incluindo a estrona e o estradiol na saúde humana e no meio ambiente. Essas pesquisas são fundamentais para a compreensão dos efeitos potenciais dessas substâncias e para o desenvolvimento de estratégias para minimizar a exposição e os impactos negativos (Kasonga *et al.*, 2021; Jiang *et al.*, 2020).

2.1.1. Hormônios Esteroides

Os esteroides são compostos orgânicos com um esqueleto de hidrocarbonetos policíclicos, classificados como lipídios devido às suas propriedades. Sua estrutura básica consiste em 17 átomos de carbono organizados em quatro anéis, incluindo três anéis de seis membros (A, B e C) e um anel de cinco membros (D), conforme representado na Figura 1. Esses anéis formam um derivado ciclopentanoperhidrofenantreno. Além da estrutura central, os esteroides possuem diversos grupos funcionais em diferentes posições.

Figura 1 - Estrutura geral dos compostos esteroides



Fonte: adaptado de Hehenberger (2016)

Os hormônios esteroides, que apresentam fórmula estrutural como apresentado na Figura 1, são essenciais em todos os vertebrados, desempenhando uma função crucial na regulação de diversos processos fisiológicos. Eles influenciam a osmorregulação, o desenvolvimento sexual, a reprodução e as reações ao estresse. Além disso, muitos hormônios esteroides de síntese, tanto na esfera humana quanto veterinária, são amplamente utilizados e difundidos, sendo empregados como medicamentos (Ojogoro *et al.*, 2021).

Recentes avanços na química analítica ambiental têm viabilizado a avaliação das concentrações de hormônios esteroides presentes nos rios. Diversos hormônios esteroides, tanto de origem natural quanto sintética, incluindo seus produtos de transformação, foram identificados e mensurados. Essa constatação destaca a disseminação generalizada desses hormônios como contaminantes aquáticos (Gunnarsson *et al.*, 2019; Ojogoro *et al.*, 2021).

Com base em suas atividades biológicas e efeitos farmacológicos, os hormônios esteroidais podem ser categorizados em dois conjuntos distintos: os corticosteroides, que abrangem os glicocorticosteroides e mineralocorticosteroides, e os hormônios sexuais, os quais são subdivididos em três grupos principais: os estrogênios, relacionados aos hormônios sexuais femininos; os andrógenos, associados aos hormônios sexuais masculinos; e os progestógenos, que são hormônios da gravidez (Dellagrave, 2012; Noppe *et al.*, 2005).

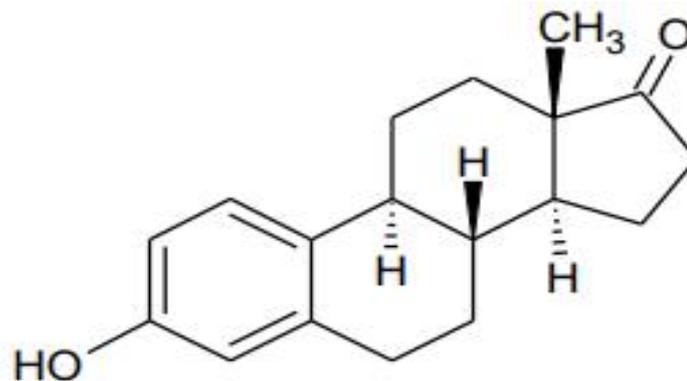
Os humanos expelem de forma natural hormônios estrogênios, como o 17β -estradiol, cujas quantidades são notadamente elevadas durante a gestação. Nas estações de tratamento de águas residuais (ETAR), as concentrações de um hormônio estrogênio presente no efluente oscilam de ng.L^{-1} a $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Khanal *et al.*, 2006). Estrona e 17β -estradiol são exemplos de esteroides que causam especial preocupação, pois manifestam seus efeitos fisiológicos em concentrações mais baixas em comparação com outros esteroides de origem sexual. Podem ser identificados no ambiente em quantidades superiores ao nível de menor efeito observável para peixes e plantas, situando-se na faixa de ng.L^{-1} (Shore; Shemesh, 2003).

2.1.1.1 Estrona

A estrona (E1) é um hormônio estrogênio produzido principalmente nos

ovários e nas glândulas adrenais, sendo mais encontrado em mulheres após a menopausa (Labrie *et al.*, 2017), possui uma massa molar igual a 270,36 g.mol⁻¹ e sua fórmula estrutural é apresentada na Figura 2.

Figura 2 - Fórmula estrutural da estrona



Fonte: adaptado de Dallegrave (2012)

A estrona desempenha um papel importante na manutenção da densidade óssea e na regulação do metabolismo lipídico (Labrie *et al.*, 2017). Vários hormônios sexuais naturais e sintéticos são utilizados com objetivos terapêuticos. As quantidades administradas são geralmente altas e, em muitos casos, uma significativa porcentagem não é assimilada pelo organismo, mas sim excretada pela urina (Bohrer, 2022).

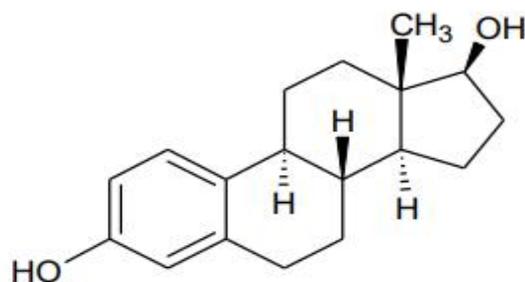
Nos processos de tratamento de águas residuárias a remoção de estrona é altamente variável, estabelecendo-se como a principal fonte de introdução nos ecossistemas aquáticos (Koh *et al.*, 2007; Manickum e John, 2014). A presença da estrona nos corpos d'água resulta em bioacumulação e bioamplificação ao longo da cadeia alimentar, interferindo no funcionamento normal do sistema endócrino (Conroy *et al.*, 2007; Jurado *et al.*, 2012). A exposição prolongada à água contaminada com estrona é reconhecida por perturbar o desenvolvimento sexual em animais, mesmo em concentrações muito baixas (0,1–1,0 ng.L⁻¹). Adicionalmente, o aumento da quantidade de estrona em águas superficiais está associado ao crescimento da incidência de câncer de mama e doenças cardíacas em mulheres com mais de 50 anos (Cui *et al.*, 2006).

Além disso, a estrona pode persistir no ambiente por longos períodos devido à sua estabilidade química, o que a torna uma preocupação em termos de poluentes persistentes (Płotka-Wasyłka *et al.*, 2015). Portanto, a monitorização e a mitigação da presença da estrona em esgotos domésticos são consideradas importantes para proteger a qualidade da água e a saúde dos ecossistemas aquáticos (Tang *et al.*, 2020).

2.1.1.2. 17β -estradiol

O 17β -estradiol (E2) representado na Figura 3, é um hormônio endógeno produzido pelos animais, desempenhando diversas funções fisiológicas relacionadas ao desenvolvimento. Nos seres humanos, desempenha um papel crucial no suporte ao processo reprodutivo e na regulação das características sexuais secundárias femininas, sendo sua produção influenciada por fatores como gênero, idade e ciclo reprodutivo. Este composto é considerado o estrogênio biologicamente ativo e natural mais significativo (Fernandes *et al.*, 2011; Manickum e John, 2014).

Figura 3 - Fórmula estrutural do 17β -estradiol



Fonte: adaptado de Dallegrave (2012)

O hormônio E2 exerce influência no controle da ovulação, nos sistemas imunológico e cardiovascular, além de impactar a pele, os ossos, o fígado e até mesmo o cérebro, assegurando o funcionamento normal dos sistemas orgânicos e participando em processos bioquímicos do metabolismo (Limpiyakorn, Homklin e Ong, 2011; Manickum e John, 2014). Desta maneira, tanto o estradiol quanto sua forma metabólica, a estrona, têm sido consistentemente introduzidos no ambiente

através da excreção dessas substâncias por humanos e outros animais (Schleicher, 2013).

2.2 FÁRMACOS

Os fármacos são compostos químicos criados e empregados no tratamento, prevenção ou diagnóstico de doenças em humanos e animais. Sua ação no organismo pode variar, podendo estimular, inibir ou interferir em processos fisiológicos. Os fármacos são substâncias biologicamente ativas desenvolvidas para interagir com diversos receptores humanos, apresentando modos de ação que podem ser tóxicos variados conforme o resultado biológico analisado (Albini, *et al.*, 2019; Pichler, *et al.*, 2015). A eliminação integral de produtos farmacêuticos é desafiadora devido às características biológicas das substâncias e à complexidade de suas estruturas químicas (Yang *et al.*, 2017).

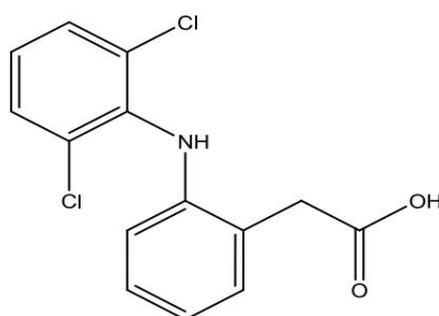
Uma análise recente de dados sobre exposição ambiental e toxicidade de 22 produtos farmacêuticos destaca que antiepilépticos, anti-inflamatórios e antibióticos geralmente representam os fármacos com os maiores riscos ecotoxicológicos (Pereira *et al.*, 2022). No entanto, as práticas de consumo e as eficiências de remoção dos sistemas de tratamento de águas residuárias diferem entre diversas bacias hidrográficas, resultando em combinações complexas que demandam avaliações específicas em cada caso (Altenburger *et al.*, 2015; Tóth, *et al.*, 2023).

Esse conjunto de compostos químicos tem despertado significativa atenção dos cientistas ambientais. A apreensão em relação a esses compostos decorre principalmente do fato de serem todos biologicamente ativos e, conseqüentemente, podem provocar impactos em espécies não-alvo expostas a eles. Essa preocupação foi acentuada quando se constatou que a utilização veterinária do medicamento anti-inflamatório diclofenaco através do consumo indireto de carne de gado resultou na morte de milhões de abutres na Ásia (Oaks *et al.*, 2004; Ojogoro *et al.*, 2021).

2.2.1 Diclofenaco

O diclofenaco (DCF) é um fármaco classificado como um anti-inflamatório não esteroide (AINE), que age inibindo a síntese de prostaglandinas, substâncias envolvidas na inflamação, dor e febre (Bjarnason *et al.*, 2018). Este fármaco é comumente usados no tratamento de condições inflamatórias, como artrite reumatoide, osteoartrite, gota, além de dores musculares e articulares, e cólicas menstruais (Amanullah *et al.*, 2022). Ele está disponível sem a necessidade de prescrição médica e é notável por ser um dos compostos mais amplamente utilizados e frequentemente detectados em ambientes aquáticos (Américo-Pinheiro *et al.*, 2017). Possui massa molecular de $295 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ e sua fórmula estrutural está representada na Figura 4.

Figura 4 - Fórmula estrutural do diclofenaco



Fonte: adaptado de Souza (2014)

O diclofenaco tem sido empregado tanto em seres humanos quanto em animais domésticos desde a década de 1970 (Caracciolo *et al.*, 2015). Em geral, a presença persistente deste fármaco nos ambientes decorre dos resíduos provenientes de indústrias farmacêuticas, hospitais e esgotos domésticos, podendo contaminar o meio ambiente em sua forma original ou por meio de seus metabólitos (Lindholm-Lehto *et al.*, 2016; Meyer *et al.*, 2016; KołECKA *et al.*, 2022).

Aproximadamente 75% do diclofenaco utilizado acaba nos ecossistemas aquáticos e no solo (Schmidt *et al.*, 2018). Adicionalmente, sua afinidade pela água e estabilidade sugerem maior probabilidade de persistência nos ambientes aquáticos (Madikizela *et al.*, 2017; Tiedeken *et al.*, 2017). Esse cenário pode também se refletir em diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar, com espécies aquáticas expostas por longos períodos ao diclofenaco, possivelmente apresentando risco ecológico elevado (Mezzelani *et al.*, 2016; Lindim *et al.*, 2019).

Contudo, diversos fatores, como o aumento global no consumo de produtos farmacêuticos, o descarte de águas residuais não tratadas no ambiente, as disparidades na eficácia das estações de tratamento de águas e a separação dos metabólitos do diclofenaco, têm contribuído para o aumento nas concentrações desse composto no ciclo da água (Charuaud *et al.*, 2019; Fekadu *et al.*, 2019; Williams *et al.*, 2019).

2.3. TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA DETECÇÃO DE CONTAMINANTES

Existem várias técnicas analíticas disponíveis para a quantificação de hormônios em matrizes ambientais. Como exemplos tem-se: 1) cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS) que oferece alta sensibilidade, seletividade; 2) cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), onde há possibilidade de empregar diferentes detectores, como UV/Visível ou fluorescência; 3) imunoenensaio, onde são utilizados anticorpos específicos para detectar e quantificar os hormônios; 4) cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS), onde é utilizada uma fase móvel gasosa e a confirmação pelo espectro de massas. É uma técnica sensível e seletiva que permite a identificação de composto em misturas complexas com alta confiabilidade (Arismendi *et al.*, 2019; Gravitte *et al.*, 2021).

2.3.1. Cromatografia

Cromatografia é uma técnica físico-química de separação. Tem uma ampla gama de aplicações em diversos campos, como química, bioquímica, farmacologia, ciências ambientais e alimentos. É frequentemente utilizada para separar e analisar componentes em misturas complexas, identificar substâncias desconhecidas, determinar a pureza de compostos, monitorar reações químicas e controlar a qualidade de produtos (Skoog *et al.*, 2013; Baciú, 2015).

Uma das grandes vantagens dessa da cromatografia é a grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias que podem ser utilizadas. Por isso, é possível empregar a técnica considerando as necessidades específicas de separação de análise de diferentes tipos de amostras (Hirose *et al.*, 2019; Patil *et al.*, 2023).

A fase estacionária é responsável por reter e interagir seletivamente com os componentes da amostra, enquanto a fase móvel os transporta através da coluna cromatográfica. À medida que a fase móvel flui pela coluna, os componentes da amostra são separados com base em suas diferentes afinidades e interações com a fase estacionária. Essas interações estão relacionadas com os tipos de mecanismos de separação, sendo eles: adsorção, partição, troca iônica, afinidade seletiva e exclusão (Skoog *et al.*, 2013; Baciú, 2015).

Existem diversas formas de detecção cromatográfica, cada uma com suas características e aplicações específicas, amplamente descritas na literatura científica. O sistema de detecção empregando ultravioleta/visível (UV/Vis), por exemplo, utiliza a absorção de luz nestas regiões do espectro pelos analitos. Este tipo de detector é frequentemente usado em HPLC (Skoog *et al.*, 2013). Já a detecção por fluorescência envolve a excitação de moléculas para um estado eletronicamente excitado e a subsequente emissão de luz fluorescente, sendo sensível para compostos fluorescentes naturais ou marcados (Zhao *et al.*, 2023). A técnica eletroquímica mede a corrente elétrica em uma célula eletroquímica, variando conforme os analitos são oxidados ou reduzidos, comumente utilizada em cromatografia líquida e eletroforese capilar (Poboży; Trojanowicz, 2021). A detecção por condutividade mede mudanças na condutividade elétrica da fase móvel causadas pelos analitos, comumente empregada em cromatografia iônica e eletroforese capilar (Santana; Lago, 2021).

E, por fim, a espectrometria de massas (MS) identifica e quantifica compostos com base na razão entre a massa e a carga de íons gerados a partir dos analitos, podendo ser acoplada às técnicas de cromatografia gasosa (GC/MS) e cromatografia líquida (LC/MS) (Niessen, 2011). A detecção refratométrica detecta mudanças no índice de refração dos analitos à medida que passam pela fase móvel, sendo utilizada em cromatografia líquida (Wicht *et al.*, 2022).

2.3.2. Espectrometria de massas

A espectrometria de massas (MS) é aplicável a substâncias orgânicas de qualquer natureza, desde pequenas moléculas, como metano e ácidos de cadeia curta, a enormes proteínas. Os espectros de massas geram informações úteis sobre a massa molecular e a estrutura dos analitos, podendo ajudar na elucidação de

compostos desconhecidos. A sensibilidade da técnica e as fragmentações geradas dependem da fonte de ionização das amostras. Dada as características desta técnica analítica, faz com que ela possa ser amplamente aplicada em várias áreas, como química, bioquímica e retroquímica (Khanal, 2022; Grzadka e Malinowska, 2024).

A MS tem como base a identificação e quantificação precisa dos compostos de interesse, utilizando diferentes metodologias de análise que variam de acordo com a resolução e a sensibilidade. A MS de baixa resolução é frequentemente utilizada para identificar e quantificar compostos conhecidos, enquanto a espectrometria de massas de alta resolução é empregada na identificação de compostos desconhecidos, como metabólitos formados no processo de degradação dos compostos alvo (Unsihuay; Sanchez; Laskin, 2021).

Na espectrometria de massa com fonte de ionização do tipo ionização por elétrons (EI), as moléculas neutras são ionizadas através da colisão com elétrons de alta energia. Durante esse processo, elétrons da última camada de valência são removidos das moléculas da amostra, resultando na formação de íons positivos, na maioria das vezes. Esses íons são então analisados com base em sua massa e carga elétrica. Essa abordagem é comumente aplicada na cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS), especialmente para a detecção de compostos voláteis e termicamente estáveis (Skoog *et al.*, 2013).

2.3.2.1 Cromatografia acoplada à espectrometria de massas

A cromatografia acoplada à espectrometria de massas, seja gasosa ou líquida (GC-MS e LC-MS, respectivamente) é uma técnica analítica poderosa que combina a separação cromatográfica com a detecção e identificação de compostos com base em suas massas moleculares e características estruturais. Essa abordagem envolve a utilização de um sistema cromatográfico gasoso ou líquido, para separar os componentes da amostra com base em suas interações com as fases móvel e estacionária (Gupta, *et al.*, 2022; Patil, *et al.*, 2022)

Após a separação cromatográfica, os compostos eluídos são direcionados para o espectrômetro de massas, onde são ionizados e posteriormente fragmentados para análise. A espectrometria de massas permite a determinação da razão massa/carga (m/z) dos íons resultantes, que são detectados e registrados

como espectros de massas (Niessen, 2016). A comparação desses espectros com bancos de dados ajuda na identificação dos compostos presentes na amostra. A combinação da cromatografia com a espectrometria de massas oferece uma análise mais precisa e confiável, uma vez que a separação cromatográfica reduz as interferências e a espectrometria de massas fornece informações estruturais adicionais para a identificação (Chiaradia, *et al.*, 2008).

2.4 PREPARO DE AMOSTRAS

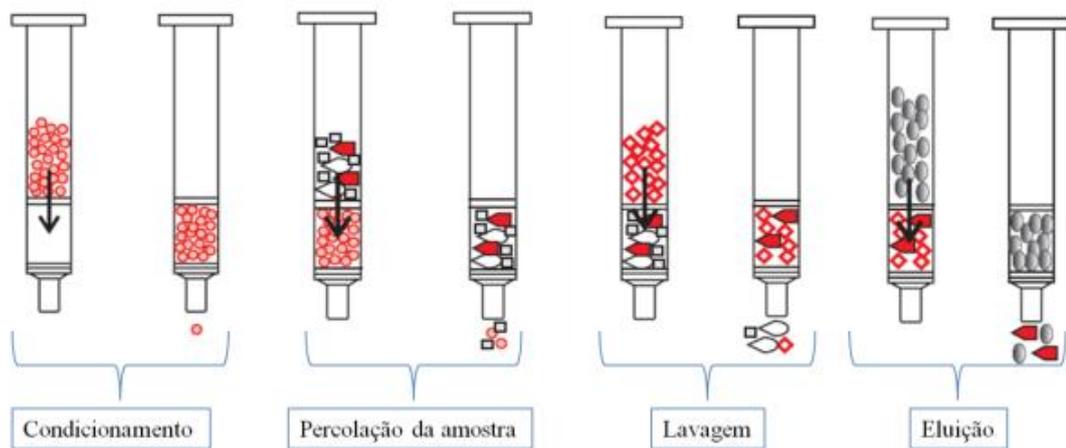
A preparação de amostras é crucial em análises instrumentais, desempenhando um papel significativo em todo o processo analítico. Na química analítica moderna, há um crescente interesse em amostras diversificadas e complexas, que provavelmente contenham diversos analitos-alvo e uma matriz intrincada. Esses analitos-alvo podem ser muito similares, mas têm uma presença mínima na matriz da amostra. Portanto, para evitar interferências da matriz, é necessário realizar a extração, separação e concentração dos analitos-alvo em níveis de traços antes da análise instrumental. Em termos teóricos, a preparação da amostra envolve concentrar os analitos de uma matriz para uma avaliação qualitativa e quantitativa, levando em consideração suas diferenças nas propriedades físicas, químicas e biológicas (Xia *et al.*, 2019).

2.4.1 Extração em Fase Sólida

A extração em fase sólida (SPE) é um tipo de preparação de amostra extensivamente empregada em etapas de pré-tratamento, concentração e análise de amostras, devido à sua elevada seletividade e aptidão para sistemas de amostras com baixas concentrações (Zhang *et al.*, 2021). As etapas principais de um procedimento padrão de SPE abrangem a ativação da fase sorvente, a percolação/sorção do analito da matriz da amostra (solução líquida) para o sorvente, a eliminação de interferências da matriz (limpeza), e a eluição e concentração do analito através de uma técnica apropriada (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2014). No entanto, os mecanismos de extração podem variar dependendo do sorvente (Cunha

et al., 2017). Na Figura 5 tem-se um esquema de como se dá o procedimento de SPE.

Figura 5 - Esquema geral da SPE



Fonte: Dallegrave (2012)

Na Figura 5 pode-se observar como se dão as etapas da extração em fase sólida. Durante o condicionamento, a fase sólida é preparada para receber o analito utilizando diferentes solventes e tampões conforme necessários, dependendo do mecanismo de retenção. Na etapa de percolação, a amostra passa pela fase estacionária, retendo os analitos de interesse e permitindo a passagem dos interferentes. Uma etapa de lavagem pode ser realizada para remover os interferentes da fase sólida sem eluir os analitos. Por fim, ocorre a eluição, onde a escolha do solvente apropriado é crucial para remover os analitos de interesse da fase sólida.

2.4.2 Derivatização

Uma outra técnica de pré-tratamento de amostras é a derivatização química, a qual altera os grupos funcionais nos analitos por meio de reações com reagentes derivados. Este processo é realizado com o intuito de amplificar a resposta através de diferentes tipos de detectores: ultravioleta (UV), de fluorescência ou espectrometria de massa (Qin *et al.*, 2020). A derivatização química pode ser utilizada para manter as características estruturais intactas, ajudando para que haja uma maior detecção com sinais mais intensos (Płotka-Wasyłka, 2015).

A maior parte das derivatizações acontece por meio de reações de silição, nas quais um hidrogênio facilmente removível presente em ácidos, álcoois, amins, amidas, cetonas enolizáveis ou aldeídos é trocado por um grupo trimetilsilila, resultando em um produto que é mais volátil e termicamente mais estável (HALKET.; ZAIKIN, 2003).

Sendo assim, o processo de derivatização melhora a análise cromatográfica ao aumentar a separação, a sensibilidade do detector, a precisão da quantificação, a estabilidade do analito e a identificação do composto. No entanto, para garantir que essa etapa de preparação seja eficaz, é necessário que seja realizada a validação do método (Moldoveanu e David, 2005; Wang, 2022).

2.5. VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA

No desenvolvimento de metodologias analíticas para o controle de qualidade ou pesquisa de um produto, faz-se necessário avaliar e otimizar diversos parâmetros, desde o preparo da amostra até a separação cromatográfica, detecção e quantificação de analitos. Esses parâmetros devem ser intensivamente estudados e intrinsecamente relacionados com os metabólitos de interesse, a fim de garantir resultados precisos e confiáveis (Ribani, 2004).

A validação de um método deve garantir, através de estudos experimentais, que este atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (ANVISA, 2003). Os parâmetros usuais de validação são: seletividade, precisão, exatidão, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e linearidade.

A seletividade é a garantia de que o método analítico é capaz para quantificar com precisão os analitos de interesse na presença de interferentes. A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância de interesse, dentro de uma determinada faixa de aplicação. No entanto, apenas o coeficiente de correlação não indica a qualidade de ajuste. É necessária a análise cuidadosa do gráfico dos resíduos do sinal analítico e a aplicação de testes para determinar a faixa na qual a curva analítica apresenta um comportamento linear (Ribeiro, 2008).

Detectar *outliers* é um tema interessante no campo estatístico. O teste de Grubbs é um dos métodos comuns de detecção de observações atípicas em conjuntos de dados univariados. Esse método se baseia na média e no desvio padrão dos dados univariados e, portanto, esses dados são fortemente afetados pela presença de valores discrepantes (Alrawashdeh, 2021).

Ao analisar a linearidade de um método é preciso atentar também para a faixa de concentração, que deverá ser de 0 a 150% do valor de concentração esperado em amostras reais.

O LD representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. O LQ representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, com precisão e exatidão. A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (INMETRO, 2020).

2.6 ESTADO DA ARTE

Na literatura é possível encontrar vários trabalhos com diversas técnicas utilizando tanto cromatografia líquida quanto gasosa para detecção e identificação desses compostos. Alguns desses trabalhos estão apresentados nas Tabela 1.

Tabela 1 - Trabalhos estudando os analitos em diversas matrizes utilizando cromatografia líquida

Compostos	Tipo de detector	Matriz	Referência
Estrogênios	DAD	Águas residuárias	González <i>et al.</i> (2020)

Estrogênios	DAD	Águas residuárias	Yasir <i>et al.</i> (2021)
Estrogênios	DAD/UV-VIS	Águas residuárias	Bohrer (2022)
E2	DAD/UV-VIS	-	Daruwati <i>et al.</i> (2023)
DCF	DAD	Águas residuárias e superficiais	Hanif <i>et al.</i> (2020)
CE	MS	Águas residuárias e superficiais	Arismendi <i>et al.</i> (2019)
DCF	UV/VIS	Águas residuárias	Correia <i>et al.</i> (2020)
Estrogênios	MS	Águas residuárias e superficiais	Chafi; Ballestros (2021)
Estrogênios	MS	Urina	Alladio <i>et al.</i> (2020)
DCF	MS	Água de torneira	Becker (2012)
Estrogênios	MS	Águas residuárias e águas superficiais	Davoodi <i>et al.</i> (2020)
Estrogênios	MS	Águas residuárias e águas superficiais	Dellagrave (2012)
Estrogênios	MS	Águas residuárias e águas superficiais	Hehenberg (2016)
DCF	UV/VIS	Águas superficiais	Romano (2018)
DCF	DAD	Águas superficiais	Vicente (2019)

DAD: arranjo de diodos; UV-VIS: ultravioleta-visível; MS: espectrometria de massas
 Fonte: a autora (2024).

Como se pode observar, na Tabela 1 o emprego de HPLC-DAD/UV-VIS é bastante utilizado. Entretanto, a análise de diversos contaminantes emergentes pode ser conduzida também através das técnicas cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS). No entanto, uma desvantagem de realizar análises via GC-MS é que, em algumas situações, a derivatização dos analitos é necessária (Nascimento, 2015).

Os procedimentos descritos na literatura para a quantificação de estrogênios em água predominantemente empregam a detecção por meio da cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) (Nakamura et al., 2001; Boyd et al., 2003; Cargouet et al., 2004; Leusch et al., 2006; Tan et al., 2007). Os equipamentos de GC-MS podem adotar diversas técnicas de ionização, sendo a ionização por elétrons a mais comum. Além disso, a ionização química também tem sua aplicação na análise de estrogênios (Nascimento, 2015).

Por exemplo, Kuch e Ballschmiter (2001) empregaram GC-MS com ionização química utilizando metano como gás reagente. Os autores utilizaram como etapa de preparação de amostra a extração em fase sólida e alcançaram limites de detecção da ordem de 50 ng.L⁻¹ em água tratada e 200 ng.L⁻¹ em efluentes. Nascimento (2015), explorou a cromatografia a gás com detector de captura de elétrons (GC-DCE), mas depararam-se com a complexidade das matrizes, gerando um ruído de fundo com picos não identificados que interferiram nos sinais analíticos, impedindo análises quantitativas.

3 METODOLOGIA

Os padrões analíticos de DCF, E1 e E2 foram adquiridos da Sigma-Aldrich, com pureza maior que 99%. O acetato de etila, diclorometano, metanol e piridina foram adquiridos da Merck. Foi também utilizada água com resistividade de 18 M Ω .cm, por purificação em sistema Merck Millipore.

3.1 DETERMINAÇÃO DE HORMÔNIOS E FÁRMACOS VIA CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A quantificação do DCF, E1 e E2 foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas (Agilent 7890A), com sistema de injeção de amostras automático, modo de injeção split/splitless e detector de espectrometria de massas (Modelo 7975C da Agilent), empregando ionização por elétrons. Na Tabela 2 estão descritas as condições cromatográficas do método.

Tabela 2 - Parâmetros cromatográficos para a separação do DCF, E1 e E2

Parâmetros	Condições
Gás de arraste	Hélio
Coluna	SLB® 5MS, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m
Temperatura de Injeção	275°C
Modo de injeção	Splitless
Fluxo	1,0 mL. min ⁻¹
Pressão <i>inlet</i>	8.6411 psi
Temp. da linha de transferência	250°C
Temperatura do analisador de massas (quadrupolo)	150°C
Temperatura da fonte	230°C
Temperatura inicial da coluna	130°C por 1 min.
Rampa de temperatura	25 °C·min ⁻¹ até 235°C; 2 °C·min ⁻¹ até 265°C; 5 °C·min ⁻¹ até 290 °C por 10 °C·min ⁻¹ até 305°C por 8 min.
Tempo de análise	26 min

Fonte: adaptado de Hehenberger (2016)

3.2. PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS PARA ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

Inicialmente, as amostras foram filtradas, empregando filtro de celulose regenerada com poro de 0,45 μm Chromafil® Xtra RC-45/25 da Phenomenex. Na sequência, foi realizada a correção do pH para 3,0 com uma solução de ácido clorídrico (10%) Para melhorar a solubilidade dos compostos na fase aquosa e facilitar a transferência para a fase sólida de adsorção.

Posteriormente, foi realizada a extração em fase sólida (SPE), para concentrar a amostra, como também eliminar possíveis interferentes. Para tal, foi utilizado um cartucho SPE Supel™ Swift HLB C18 (60 mg) da Sigma-Aldrich acoplado a um manifold e uma bomba para controle do fluxo. Para essa extração, o cartucho foi pré-condicionado com 5 mL de acetato de etila seguidos de 5 mL metanol e 10 mL de água acidificada (pH 3).

Em seguida, foram percolados 250 mL da amostra adicionada de 50 μL de 17 β -estradiol deuterado (E2-D3) (Sigma-Aldrich) na concentração de 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e o *spike* de uma solução padrão contendo os três analitos de concentração conhecida. Essa amostra foi condicionada no sistema sob baixa vazão de aproximadamente 3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Os cartuchos secaram a uma temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$ por no mínimo 30 min, depois os analitos foram eluídos com 10 mL de uma solução 1:2 de metanol e diclorometano (V/V).

As amostras passaram por uma etapa de secagem em baixo fluxo de nitrogênio e, em seguida, passaram pelo processo de derivatização. Este consistiu na adição de 50 μL do derivatizante N-trimetilsilil-N-metil trifluoroacetamida (MSTFA) e 50 μL de piridina. Foram mantidas a uma temperatura constante de 55°C em estufa por 60 min. Por fim, o volume foi completado com 100 μL de piridina e as amostras foram analisadas via GC/MS.

3.3. PREPARAÇÃO DOS PADRÕES DE TRABALHO

Inicialmente, foram preparadas soluções estoques individuais de DCF, E1, E2 na concentração de 1000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ em metanol. Em seguida, foram preparadas duas soluções mistas contendo os três analitos nas concentrações de: 1) solução A = 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de cada analito e 2) solução B = 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de cada analito. As soluções de

trabalho foram preparadas através de diluições em metanol das soluções A e B, nas concentrações de 50; 125; 200; 275; 350; 425; e 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Em seguida, foi adicionado o 17β -estradiol deuterado (D3) na concentração de 10 mg.L^{-1} a cada uma das concentrações descritas anteriormente. Feito isso, passou-se para a etapa de secagem em baixo fluxo de nitrogênio e adição do derivatizante, conforme descrito no item 4.2.

3.4. VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA

Após o estabelecimento das condições analíticas, foi realizada a validação do método, para garantir, através de testes experimentais e tratamento estatístico de dados, a sua proficiência de fornecer resultados quantitativos exatos e precisos, estimando a sua variabilidade no tempo, matriz e operador. O método foi validado conforme a legislação RE 166 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), sendo os seguintes parâmetros avaliados: seletividade, linearidade, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), precisão e exatidão.

As curvas analíticas com faixa linear de 50 a 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ foram construídas em sete níveis, em setuplicatas, uniformemente espaçadas na faixa de concentração. Os valores de LD e LQ foram calculados matematicamente através dos parâmetros da curva analítica, utilizando os valores da inclinação e o desvio padrão do menor nível da curva analítica, segundo as Equações 1 e 2.

$$LD = 3,3 \frac{s}{b} \tag{1}$$

$$LQ = 10 \frac{s}{b} \tag{2}$$

Onde, s é o coeficiente angular da equação e b o desvio padrão do menor nível curva analítica.

De modo a garantir a reprodução dos dados foi ainda realizada uma análise estatística empregando o teste de Grubb's. Desse modo, foram avaliados os valores de $G<$ e $G>$ a 95% de confiabilidade de acordo com as Equações 3 e 4

$$G < = \left(\frac{C_m - C_{<}}{\sigma} \right) \quad (3)$$

$$G > = \left(\frac{C_m - C_{>}}{\sigma} \right) \quad (4)$$

Em que $G_{<}$ representa o teste de Grubb's para o valor mínimo medido, enquanto $G_{>}$ refere-se ao teste de Grubb's para o valor máximo medido. O símbolo C_m denota a média dos valores medidos, $C_{<}$ indica o menor valor medido, $C_{>}$ representa o maior valor medido, e σ é o desvio padrão absoluto.

Em seguida, a precisão foi avaliada através do coeficiente de variação (CV) (Equação 5) resultante da análise de nove medições de soluções padrões em três níveis da curva analítica, com três repetições de cada nível.

$$CV (\%) = \frac{S}{\bar{x}} \quad (5)$$

Em que, S é a estimativa do desvio padrão absoluto (Equação 6) e \bar{x} , a média aritmética do número de medições.

$$S = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (6)$$

Em que, x_i é o valor individual da medição, \bar{x} é a média aritmética do número de medições e n , o número de medições.

A exatidão foi determinada em termos de recuperação do método pela análise de três réplicas autênticas do ponto de menor concentração, o intermediário e o de maior concentração da curva de analítica. A matriz foi fortificada com o padrão e o percentual de recuperação é calculada conforme a Equação 7.

$$R (\%) = \frac{\bar{x} \cdot 100}{x} \quad (7)$$

Em que, \bar{x} é a média aritmética da concentração obtida experimentalmente e, x corresponde à média aritmética da concentração teórica adicionada à amostra.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir estão apresentados os resultados deste trabalho e suas respectivas discussões de acordo com as diretrizes do INMETRO e da ANVISA.

4.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

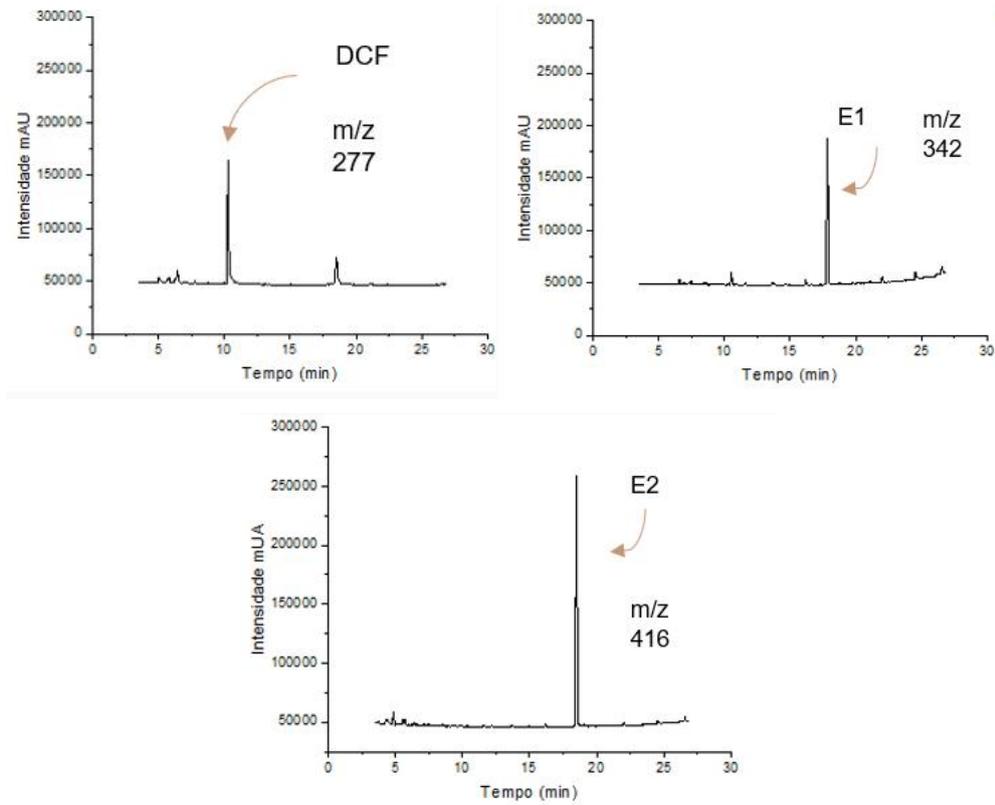
Em um primeiro momento, após as definições das condições cromatográficas, foram preparadas soluções padrões individuais de cada um dos analitos, a fim de identificar o tempo de retenção de cada composto. Foi feita também uma leitura com o *scan* do espectrômetro de massas, onde a partir da razão entre a massa de um íon e sua carga elétrica (m/z), identificou-se cada composto. Na Tabela 3 estão apresentadas as massas obtidas através dessa varredura, e na Figura 6 os cromatogramas dos analitos com suas respectivas massas extraídas.

Tabela 3 - Razões m/z do diclofenaco (DCF), estrona (E1) e 17 β -estradiol (E2)

Compostos	Razão m/z
DCF	277
E1	342
E2	416

Fonte: A Autora (2024).

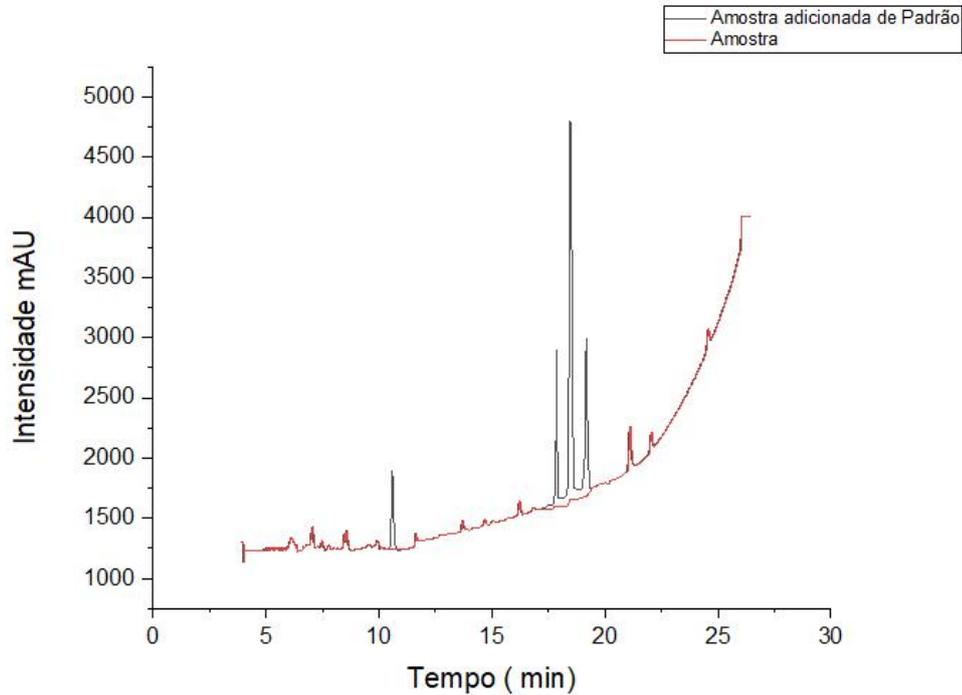
Figura 6 -. Cromatogramas de uma amostra adicionada de solução de 500 $\mu\text{g. L}^{-1}$ do diclofenaco (DCF), estrona (E1) e 17 β -estradiol (E2) com suas respectivas massas extraídas



Fonte: A Autora (2024).

A aquisição de dados foi feita a partir de 3,5 min pois o software foi configurado para que o corte de solvente acontecesse neste tempo, evitando assim, sujar mais rapidamente o analisador. Para avaliar a seletividade foi feita uma comparação entre o cromatograma de uma amostra com o e sem a adição de um padrão dos compostos em estudo, e pode ser observado na Figura 7.

Figura 7 - Cromatograma da análise uma amostra sobreposta de um cromatograma dessa mesma amostra adicionada de solução de 500 $\mu\text{g. L}^{-1}$ do diclofenaco (DCF), estrona (E1) e 17 β -estradiol (E2)



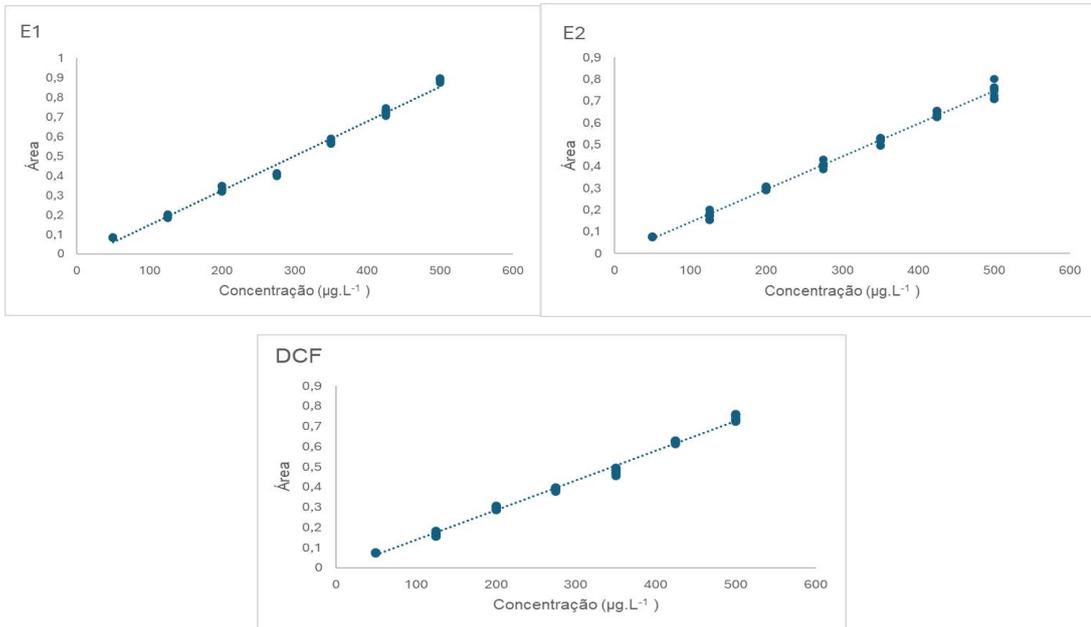
Fonte: A Autora (2024).

Os tempos de retenção encontrados foram 10,3; 17,9; 18,56 e 18,64 min para o DCF, E1, para o D3 e E2, nesta ordem. Ao analisar os cromatogramas sobrepostos na Figura 7, onde, em vermelho tem-se apenas a matriz, e em preto a matriz adicionada da solução padrão contendo os analitos, pode-se observar que o método se mostrou seletivo, uma vez que a eluição dos compostos em estudos ocorreu sem interferentes presentes na amostra.

4.1.1 Linearidade

A partir dos dados coletados para a análise das várias concentrações estudadas, foram geradas as curvas analíticas, mostradas na Figura 8. Essas curvas representam a relação entre a área média obtida das replicatas de cada ponto e suas respectivas concentrações.

Figura 8 - Curvas analíticas do diclofenaco (DCF), estrona (E1) e 17β-estradiol (E2)



Fonte: A Autora (2024).

A análise da linearidade das curvas apresentadas na Figura 8 foi feita através da determinação do coeficiente de correlação (r). Segundo a literatura, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) classifica uma curva como linear quando esse coeficiente atinge valores iguais ou superiores a 0,99, em contrapartida, o INMETRO admite valores superiores a 0,90. Na Tabela 4, encontram-se as equações das curvas obtidas para cada um dos analitos e seus respectivos coeficientes de correlação.

Figura 9 - Equações da curva analítica e valores de coeficientes de correlação do diclofenaco (DCF), estrona (E1) e 17β-estradiol (E2)

Composto	Equação da reta	r
DCF	$y = 0,0014x - 0,0119$	0,9973
E1	$y = 0,0018x - 0,0297$	0,9948
E2	$y = 0,0016x - 0,0053$	0,9976

Fonte: A Autora (2024).

De acordo com a Tabela 4, todos os valores de r estão dentro do que é preconizado tanto pelo INMETRO quanto pela ANVISA. Além disso, foi feita a avaliação da dispersão dos resultados de cada ponto através da determinação do

teste de Grubbs (Grubbs e Beck, 1972). A avaliação foi feita considerando o intervalo de confiança de 97,5%, os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 4 - Resultados dos valores mínimos e máximos do teste de Grubbs para o DCF, E1 e E2

Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Diclofenaco		Estrona		β -estradiol	
	G<	G>	G<	G>	G<	G>
50	1,84	1,26	1,37	1,65	1,96	0,95
125	1,23	1,65	1,62	1,5	1,17	1,95
200	1,45	1,22	1,14	1,34	1,15	0,96
275	1,88	1,21	1,91	1,56	1,28	1,07
350	1,30	1,65	1,13	1,58	1,45	0,96
425	1,80	1,48	1,48	1,88	1,30	1,06
500	1,44	1,37	2,01	1,01	1,14	1,84

Fonte: A Autora (2024).

Ao observar os dados da Tabela 5, verificou-se que os valores obtidos estão em concordância, uma vez que os resultados de G< e G> são inferiores ao valor tabelado que é de 2,020. Assim, pode-se afirmar que não há dispersão entre os valores das replicatas de cada concentração e atestar a linearidade do método.

4.1.2. Limites de quantificação e detecção

Os valores dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram estimados com base na inclinação da curva analítica e o desvio padrão da resposta do menor nível da curva, conforme descrito no item 3.4. Os valores de LD e LQ obtidos encontram-se na Tabela 6.

Tabela 5 - Valores dos limites de detecção e quantificação

Composto	LD ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
Diclofenaco	6,86	20,80
E1	3,29	9,97
E2	2,15	6,51

Fonte: A Autora (2024).

Ao analisar os valores de LD e LQ dispostos na Tabela 6 pode-se verificar que embora eles estejam em uma faixa de concentração maior do que se comparado a outros trabalhos (Dellagrave, 2012; Campos, 2018) que se encontram na faixa de $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ são aceitáveis, pois, as concentrações presentes na matriz estudada estão dentro da faixa analisada.

4.1.3 Precisão

A precisão foi estabelecida com base na determinação do coeficiente de variação. Os valores de CV estão descritos na Tabela 7 para todos os analitos.

Tabela 6 - Valores de CV (%) para diclofenaco (DCF), estrona (E1) e 17 β -estradiol (E2)

Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	CV(%)		
	DCF	E1	E2
50	3,90	3,21	3,21
125	5,66	4,69	4,59
200	2,94	3,69	3,69
275	3,66	3,13	3,13
350	3,13	2,02	2,02
425	1,45	1,69	1,69
500	1,89	5,24	5,14

Fonte: A Autora (2024).

De acordo com Ribani *et al.* (2004), é recomendado que o coeficiente de variação (CV) não ultrapasse 20% em amostras de traços ou amostras complexas para que o método seja classificado como preciso. A avaliação do valor de CV foi realizada em todos os níveis das curvas analíticas e pode-se concluir que o método em questão é preciso para todos os compostos estudados.

4.1.4 Exatidão

A exatidão foi estudada através da recuperação em três níveis de concentração, o menor, intermediário e o mais alto da curva analítica, todos com análise em triplicata, conforme descrito no item 3.4. Com isso, foi possível obter o percentual médio de recuperação de cada um dos analitos, estando os resultados obtidos expostos na Tabela 8.

Tabela 7 - Resultados de recuperação

Composto	Recuperação Média	Desvio Padrão
Diclofenaco	90%	2,45
E1	95%	3,24
E2	107%	3,57

Fonte: A Autora (2024).

A recuperação é essencial para avaliar o desempenho do método em extrair o composto de interesse da amostra, levando em consideração possíveis perdas durante a preparação e análise da amostra. Uma boa recuperação indica que o método de preparação de amostra empregando extração em fase sólida é eficaz, podendo ser realizada a detecção e quantificação do analito através da técnica analítica proposta no estudo. Sendo assim, uma recuperação próxima a 100% é usualmente considerada como um indicativo de um método confiável e preciso. Ao analisar os resultados de recuperação apresentados na Tabela 8, pode-se dizer que o método é exato, pois os valores estão dentro da faixa preconizado pelo INMETRO que entre 90 e 120% (INMETRO, 2020).

Além de fornecer bons resultados de recuperação a SPE também evitou a coextração de interferentes que poderiam comprometer a análise. O uso do derivatizante MSTFA e da piridina como solvente catalisador também foram aceitáveis pois ajudaram a aumentar a detectabilidade dos analitos por GC-MS.

Diante dos resultados apresentados, o método se mostrou satisfatório uma vez que além de seletivo, os tempos de retenção se mostraram próximos a de outros trabalhos como o de Dellagrave (2012) onde foi descrito 14,16 min para o E1 e 14,49 min para o E2 se tornando um método rápido. Embora necessário o processo de derivatização, esse método auxilia quando não se tem LC-MS disponível uma vez que é sensível e consegue alcançar faixas de concentração que a cromatografia líquida não conseguiria realizar a determinação.

5 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos é possível afirmar que a metodologia proposta para a preparação de amostras por extração em fase sólida, aliada à identificação e quantificação, através do emprego da cromatografia gasosa de diclofenaco, estrona e 17β -estradiol, demonstraram um desempenho satisfatório. O método exibiu uma notável linearidade, estendendo-se habilmente pela faixa de 50 a 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$, destacando-se não apenas pela sua eficiência linear, mas também pela exatidão e precisão evidenciadas. Essas características, assim delineadas, conferem ao método uma adequação para a determinação e quantificação destes compostos.

REFERÊNCIAS

- ALLADIO, E. *et al.* Optimization and validation of a GC–MS quantitative method for the determination of an extended estrogenic profile in human urine: Variability intervals in a population of healthy women. **Biomedical Chromatography**, v. 35, n. 2, 3 fev. 2021.
- ALRAWASHDEH, M. J. An adjusted Grubbs' and generalized extreme studentized deviation. **Demonstratio Mathematica**, v. 54, n. 1, p. 548–557, 1 jan. 2021.
- ALTENBURGER, R. *et al.* Future water quality monitoring — Adapting tools to deal with mixtures of pollutants in water resource management. **Science of The Total Environment**, v. 512–513, p. 540–551, 15 abr. 2015.
- AMANULLAH, A. *et al.* Development and Challenges of Diclofenac-Based Novel Therapeutics: Targeting Cancer and Complex Diseases. **Cancers 2022, Vol. 14, Page 4385**, v. 14, n. 18, p. 4385, 9 set. 2022.
- AMÉRICO-PINHEIRO, J. H. P. *et al.* Ocorrência de diclofenaco e naproxeno em água superficial no município de Três Lagoas (MS) e a influência da temperatura da água na detecção desses anti-inflamatórios. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 22, n. 3, p. 429–435, 1 maio 2017.
- ARISMENDI, D. *et al.* Simultaneous determination of multiresidue and multiclass emerging contaminants in waters by rotating-disk sorptive extraction-derivatization-gas chromatography/mass spectrometry. **Talanta**, v. 201, p. 480–489, 15 ago. 2019.
- BACIU, T. *et al.* Recent trends in analytical methods and separation techniques for drugs of abuse in hair. **Analytica chimica acta**, v. 856, p. 1–26, 26 jan. 2015.
- BARRA CARACCILO, A.; TOPP, E.; GRENNI, P. Pharmaceuticals in the environment: biodegradation and effects on natural microbial communities. A review. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 106, p. 25–36, 5 mar. 2015.
- BECKER, R. W. Determinação de anti-inflamatórios em efluente urbano na região de Porto Alegre-RS por SPE, derivatização e GC-MS. 2012.
- BJARNASON, I. *et al.* Mechanisms of Damage to the Gastrointestinal Tract From Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. **Gastroenterology**, v. 154, n. 3, p. 500–514, 1 fev. 2018.
- BOHRER, J. K. Quantificação de hormônios estrógenos em esgoto sanitário por HPLC-UV e avaliação da degradação por processos oxidativos avançados. 16 mar. 2022.
- BOYD, G. R. *et al.* Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in surface and treated waters of Louisiana, USA and Ontario, Canada. **The Science of the total environment**, v. 311, n. 1–3, p. 135–149, 20 jul. 2003.

BRANDT, E. M. F. *et al.* Behaviour of pharmaceuticals and endocrine disrupting chemicals in simplified sewage treatment systems. **Journal of environmental management**, v. 128, p. 718–726, 15 out. 2013.

BRITO, N. M. *et al.* VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS: ESTRATÉGIA E DISCUSSÃO. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129–146, 31 dez. 2003.

CAMPOS, A. C. V. Otimização e validação do método para análise de microcontaminantes de preocupação emergente por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas utilizando derivatização online. 2018.

CARGOUËT, M. *et al.* Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France). **The Science of the total environment**, v. 324, n. 1–3, p. 55–66, 25 maio 2004.

CHAFI, S.; BALLESTEROS, E. A sensitive, robust method for determining natural and synthetic hormones in surface and wastewaters by continuous solid-phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry. **Environmental science and pollution research international**, v. 29, n. 35, p. 53619–53632, 1 jul. 2022.

CHARUAUD, L. *et al.* Veterinary pharmaceutical residues in water resources and tap water in an intensive husbandry area in France. **The Science of the total environment**, v. 664, p. 605–615, 10 maio 2019.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 623–636, 2008.

CHIARENTIN, L. *et al.* Rheology of Complex Topical Formulations: An Analytical Quality by Design Approach to Method Optimization and Validation. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 7, 1 jul. 2023.

CONROY, O. *et al.* Changes in estrogen/anti-estrogen activities in ponded secondary effluent. **The Science of the total environment**, v. 382, n. 2–3, p. 311–323, 1 set. 2007.

CORREIA, J. V. *et al.* Determinação das condições cromatográficas para a análise de diclofenaco, ibuprofeno e naproxeno em efluentes / Determination of chromatographical conditions for the analysis of diclofenac, ibuprofen and naproxen in effluents. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 6, p. 33624–33629, 3 jun. 2020.

CUI, C. W.; JI, S. L.; REN, H. Y. Determination of steroid estrogens in wastewater treatment plant of a contraceptives producing factory. **Environmental monitoring and assessment**, v. 121, n. 1–3, p. 407–417, out. 2006.

CYDZIK-KWIATKOWSKA, A. *et al.* Aerobic granular sludge for bisphenol A (BPA) removal from wastewater. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 122, p. 1–11, 1 ago. 2017.

D. PATIL, H. *et al.* A Brief Review on Gas Chromatography. **Asian Journal of Pharmaceutical Analysis**, p. 47–52, 22 mar. 2023.

DA CUNHA, D. L. *et al.* Ocorrência e remoção de estrogênios por processos de tratamento biológico de esgotos. **Revista Ambiente & Água**, v. 12, n. 2, p. 249–262, 2017.

DARUWATI, I. *et al.* Method development, validation, and impurity measurement of β -estradiol from radiolabeled [^{131}I] β -estradiol using radio-high-performance liquid chromatography for radioligand of saturation binding assay. **Journal of advanced pharmaceutical technology & research**, v. 14, n. 2, p. 105–112, 1 abr. 2023.

DAVOODI, R. *et al.* Erratum: Solid-phase extraction followed by deep eutectic solvent based dispersive liquid-liquid microextraction and GC-MS detection of the estrogenic compounds in wastewater samples (New Journal of Chemistry (2020) 44 9844–9851, DOI: 10.1039/D0NJ00911C). **New Journal of Chemistry**, v. 44, n. 35, p. 15300, 21 set. 2020.

DE, I.; DE, Q.; CARLOS, S. Desenvolvimento e validação de um método analítico para determinação dos fármacos Diclofenaco, Nimesulida e Paracetamol em águas superficiais da cidade de São Carlos-SP. 21 out. 2012.

DIAMANTI-KANDARAKIS, E. *et al.* Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. **Endocrine reviews**, v. 30, n. 4, p. 293–342, jun. 2009.

FEKADU, S. *et al.* Pharmaceuticals in freshwater aquatic environments: A comparison of the African and European challenge. **The Science of the total environment**, v. 654, p. 324–337, 1 mar. 2019.

FERNANDES, A. N. *et al.* Remoção dos hormônios 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol de soluções aquosas empregando turfa decomposta como material adsorvente. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1526–1533, 2011.

GAD, S. C. Handbook of Pharmaceutical Biotechnology. **Handbook of Pharmaceutical Biotechnology**, p. 1–1659, 24 ago. 2006.

GEISSEN, V. *et al.* Emerging pollutants in the environment: A challenge for water resource management. **International Soil and Water Conservation Research**, v. 3, n. 1, p. 57–65, 1 mar. 2015.

GONZÁLEZ, A.; CERDÀ, V. Development of an automatic sequential injection analysis-lab on valve system exploiting molecularly imprinted polymers coupled with high performance liquid chromatography for the determination of estrogens in wastewater samples. **Talanta**, v. 209, 1 mar. 2020.

GRAVITTE, A. *et al.* Liquid chromatography-mass spectrometry applications for quantification of endogenous sex hormones. **Biomedical chromatography : BMC**, v. 35, n. 1, 1 jan. 2021.

GRZĄDKA, E.; MALINOWSKA, I. Selected Chromatographic Methods for Determining the Biological Activity of Substances. **Applied Sciences** **2024**, Vol. **14**, Page **4265**, v. 14, n. 10, p. 4265, 17 maio 2024.

GUNNARSSON, L. *et al.* Pharmacology beyond the patient - The environmental risks of human drugs. **Environment international**, v. 129, p. 320–332, 1 ago. 2019.
HEHENBERGER, A. Derivatization study of selected steroid compounds Bachelor Thesis. 2016.

GUPTA, K. *et al.* An Overview On The Chromatography. **International Journal of Creative Research Thoughts (IJCRT)** www.ijcrt.org, v. 8, p. 5, 2020.

HALKET, J. M.; ZAIKIN, V. G. Derivatization in Mass Spectrometry—1. Silylation. **European Journal of Mass Spectrometry**, v. 9, n. 1, p. 1–21, 2003.

HANIF, H. *et al.* Environmental risk assessment of diclofenac residues in surface waters and wastewater: a hidden global threat to aquatic ecosystem. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 192, n. 4, p. 1–12, 1 abr. 2020.

HIROSE, T. *et al.* Comparison of Retention Behavior between Supercritical Fluid Chromatography and Normal-Phase High-Performance Liquid Chromatography with Various Stationary Phases. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 24, n. 13, 2019a.

HOMKLIN, S.; ONG, S. K.; LIMPIYAKORN, T. Biotransformation of 17 α -methyltestosterone in sediment under different electron acceptor conditions. **Chemosphere**, v. 82, n. 10, p. 1401–1407, 2011.

JIANG, R. *et al.* Assessment of the potential ecological risk of residual endocrine-disrupting chemicals from wastewater treatment plants. **The Science of the total environment**, v. 714, 20 abr. 2020.

JURADO, A. *et al.* Emerging organic contaminants in groundwater in Spain: A review of sources, recent occurrence and fate in a European context. **Science of The Total Environment**, v. 440, p. 82–94, 1 dez. 2012.

KASONGA, T. K. *et al.* Endocrine-disruptive chemicals as contaminants of emerging concern in wastewater and surface water: A review. **Journal of environmental management**, v. 277, 1 jan. 2021.

KHANAL, O. Mathematical modeling and process analytical technology for continuous chromatography of biopharmaceutical products. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 78, p. 102796, 1 dez. 2022.

KHANAL, S. K. *et al.* Fate, transport and biodegradation of natural estrogens in the environment and engineered systems. **Environmental Science and Technology**, v. 40, n. 21, p. 6537–6546, 1 nov. 2006.

KOH, Y. K. K. *et al.* Determination of steroid estrogens in wastewater by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography. A**, v. 1173, n. 1–2, p. 81–87, 30 nov. 2007.

KOŁECKA, K.; GAJEWSKA, M.; CABAN, M. From the pills to environment - Prediction and tracking of non-steroidal anti-inflammatory drug concentrations in wastewater. **The Science of the total environment**, v. 825, 15 jun. 2022.

KUCH, H. M.; BALLSCHMITER, K. Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the picogram per liter range. **Environmental science & technology**, v. 35, n. 15, p. 3201–3206, 1 ago. 2001.

KUMARI, D.; SINGH, R. Pretreatment of lignocellulosic wastes for biofuel production: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 90, p. 877–891, jul. 2018.

LABRIE, F. *et al.* Androgens in women are essentially made from DHEA in each peripheral tissue according to intracrinology. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 168, p. 9–18, 1 abr. 2017.

LEUSCH, F. D. L. *et al.* Bioassay-derived androgenic and estrogenic activity in municipal sewage in Australia and New Zealand. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 65, n. 3, p. 403–411, nov. 2006.

LINDHOLM-LEHTO, P. C. *et al.* Widespread occurrence and seasonal variation of pharmaceuticals in surface waters and municipal wastewater treatment plants in central Finland. **Environmental science and pollution research international**, v. 23, n. 8, p. 7985–7997, 1 abr. 2016.

LINDIM, C. *et al.* Exposure and ecotoxicological risk assessment of mixtures of top prescribed pharmaceuticals in Swedish freshwaters. **Chemosphere**, v. 220, p. 344–352, 1 abr. 2019.

LIU, J. *et al.* Hydrochemical characteristics and quality assessment of groundwater for drinking and irrigation purposes in the Futuan River Basin, China. **Arabian Journal of Geosciences**, v. 12, n. 18, 1 set. 2019.

LIU, K. *et al.* Simultaneous Determination of Five Hormones in Milk by Automated Online Solid-Phase Extraction Coupled to High-Performance Liquid Chromatography. **Journal of AOAC International**, v. 103, n. 1, p. 265–271, 2020a.

LIU, K. *et al.* Simultaneous Determination of Five Hormones in Milk by Automated Online Solid-Phase Extraction Coupled to High-Performance Liquid Chromatography. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, v. 103, n. 1, p. 265–271, 1 jan. 2020b.

MADIKIZELA, L. M.; TAVENGWA, N. T.; CHIMUKA, L. Status of pharmaceuticals in African water bodies: Occurrence, removal and analytical methods. **Journal of environmental management**, v. 193, p. 211–220, 15 maio 2017.

MANICKUM, T.; JOHN, W. Occurrence, fate and environmental risk assessment of endocrine disrupting compounds at the wastewater treatment works in Pietermaritzburg (South Africa). **The Science of the total environment**, v. 468–469, p. 584–597, 15 jan. 2014.

- MARTÍN-POZO, L. *et al.* Analytical methods for the determination of emerging contaminants in sewage sludge samples. A review. **Talanta**, v. 192, p. 508–533, 15 jan. 2019.
- MEYER, W. *et al.* Measured and predicted environmental concentrations of carbamazepine, diclofenac, and metoprolol in small and medium rivers in northern Germany. **Environmental monitoring and assessment**, v. 188, n. 8, 1 ago. 2016.
- MEZZELANI, M. *et al.* Ecotoxicological potential of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in marine organisms: Bioavailability, biomarkers and natural occurrence in *Mytilus galloprovincialis*. **Marine environmental research**, v. 121, p. 31–39, 1 out. 2016.
- MOLDOVEANU, S.; DAVID, V. The Role of Derivatization in Chromatography. **Modern Sample Preparation for Chromatography**, p. 307–331, 2015.
- NAKAMURA, S.; HWEE SIAN, T.; DAISHIMA, S. Determination of estrogens in river water by gas chromatography-negative-ion chemical-ionization mass spectrometry. **Journal of chromatography. A**, v. 919, n. 2, p. 275–282, 15 jun. 2001.
- NASCIMENTO, M. S. DO; 026.409.661-46; [HTTP://LATTES.CNPQ.BR/1508679438127449](http://lattes.cnpq.br/1508679438127449). Determinação de hormônios estrogênicos em água por cromatografia : uma revisão crítica de métodos analíticos. 28 fev. 2015.
- NIESSEN, W. M. A. Fragmentation of toxicologically relevant drugs in positive-ion liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Mass spectrometry reviews**, v. 30, n. 4, p. 626–663, jul. 2011.
- NIESSEN, W. M. A. Mass spectrometry | Electrospray Ionization. **Encyclopedia of Analytical Science**, p. 344–350, 1 jan. 2016.
- NOPPE, H. *et al.* Development and validation of an analytical method for detection of estrogens in water. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 382, n. 1, p. 91–98, maio 2005.
- OJOGHORO, J. O.; SCRIMSHAW, M. D.; SUMPTER, J. P. Steroid hormones in the aquatic environment. **The Science of the total environment**, v. 792, 20 out. 2021.
- OAKS, J. L. *et al.* Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. **Nature**, v. 427, n. 6975, p. 630–633, 12 fev. 2004.
- OLASUPO, A.; SUAHI, F. B. M. Recent advances in the removal of pharmaceuticals and endocrine-disrupting compounds in the aquatic system: A case of polymer inclusion membranes. **Journal of hazardous materials**, v. 406, 15 mar. 2021.
- PATIL, S. V *et al.* IJCRT2205597 International Journal of Creative Research Thoughts (IJCRT) www.ijcrt.org f166 REVIEW ON DIFFERENT CHROMATOGRAPHY METHOD OF ANALYSIS. 2022.

PEREIRA, B. F. *et al.* Efeitos adversos associados ao uso excessivo de Diclofenaco: revisão sistemática: Adverse effects associated with overuse of diclofenac: a systematic review. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 5, n. 6, p. 24937–24951, 20 dez. 2022.

PÉREZ, R. L.; ESCANDAR, G. M. Liquid chromatography with diode array detection and multivariate curve resolution for the selective and sensitive quantification of estrogens in natural waters. **Analytica chimica acta**, v. 835, p. 19–28, 4 jul. 2014.

PICHLER, W. J. *et al.* Drug Hypersensitivity: How Drugs Stimulate T Cells via Pharmacological Interaction with Immune Receptors. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 168, n. 1, p. 13–24, 2015.

PŁOTKA-WASYLKA, J. M. *et al.* Chemical derivatization processes applied to amine determination in samples of different matrix composition. **Chemical reviews**, v. 115, n. 11, p. 4693–4718, 10 jun. 2015.

POBOŻY, E.; TROJANOWICZ, M. Application of capillary electrophoresis for determination of inorganic analytes in waters. **Molecules**, v. 26, n. 22, 1 nov. 2021.

QIAN, W. J. *et al.* Advances and challenges in liquid chromatography-mass spectrometry-based proteomics profiling for clinical applications. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 5, n. 10, p. 1727–1744, out. 2006.

QIN, Q. *et al.* Parallel derivatization strategy coupled with liquid chromatography-mass spectrometry for broad coverage of steroid hormones. **Journal of chromatography. A**, v. 1614, 15 mar. 2020.

RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

RIBEIRO, F. A. D. L. *et al.* Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 164–171, 2008.

ROBIN, J. *et al.* Analytical method for the biomonitoring of bisphenols and parabens by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry in human hair. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 243, 15 set. 2022.

ROMANO, L. E.; [HTTP://LATTES.CNPQ.BR/3579369797073090](http://lattes.cnpq.br/3579369797073090). Desenvolvimento de metodologia para determinação de diclofenaco em águas superficiais. 5 mar. 2018.

SANTANA, M. A.; LUCIO DO LAGO, C. Indirect calibration for capillary electrophoresis with conductivity detection. **Analytica chimica acta**, v. 1158, 8 maio 2021.

SCHLEICHER, A. T. Remoção de estrona, estradiol, etinilestradiol e bisfenol-A por meio de nanofiltração aplicada ao tratamento avançado de águas para consumo humano. 3 out. 2013.

SCHMIDT, M.; SØRENSEN, H. T.; PEDERSEN, L. Diclofenac use and cardiovascular risks: series of nationwide cohort studies. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 362, 2018.

SHORE, L. S.; SHEMESH, M. Naturally produced steroid hormones and their release into the environment. **Pure and Applied Chemistry**, v. 75, n. 11–12, p. 1859–1871, 2003.

TAN, B. L. L. *et al.* Comprehensive study of endocrine disrupting compounds using grab and passive sampling at selected wastewater treatment plants in South East Queensland, Australia. **Environment international**, v. 33, n. 5, p. 654–669, 2007.

TANG, Z. *et al.* Trace determination of eleven natural estrogens and insights from their occurrence in a municipal wastewater treatment plant and river water. **Water research**, v. 182, 1 set. 2020.

TIEDEKEN, E. J. *et al.* Monitoring, sources, receptors, and control measures for three European Union watch list substances of emerging concern in receiving waters - A 20year systematic review. **The Science of the total environment**, v. 574, p. 1140–1163, 1 jan. 2017.

TÓTH, G. *et al.* The Elimination of Pharmaceutical Agents with Microbiological Treatment from Municipal Sewage. **Sustainability 2023, Vol. 15, Page 2991**, v. 15, n. 4, p. 2991, 7 fev. 2023.

UNSIHUAY, D.; MESA SANCHEZ, D.; LASKIN, J. Quantitative Mass Spectrometry Imaging of Biological Systems. **Annual review of physical chemistry**, v. 72, p. 307–329, 20 abr. 2021.

VANDENBERG, L. N. *et al.* Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. **Endocrine reviews**, v. 33, n. 3, p. 378–455, jun. 2012.

VICENTE, G. H. L. **Desenvolvimento e validação de um método analítico para determinação dos fármacos Diclofenaco, Nimesulida e Paracetamol em águas superficiais da cidade de São Carlos-SP**. 2011. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011. doi:10.11606/D.75.2011.tde-17042012-115050. Acesso em: 2023-11-08

VIEIRA, W. T. *et al.* Removal of endocrine disruptors in waters by adsorption, membrane filtration and biodegradation. A review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 18, n. 4, p. 1113–1143, 1 jul. 2020.

WANG, Y. *et al.* Determination of Methyl Methanesulfonate and Ethyl Methylsulfonate in New Drug for the Treatment of Fatty Liver Using Derivatization Followed by High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 27, n. 6, 1 mar. 2022.

WHO. Safe Use of Wastewater , Excreta and Greywater Guidelines for the Safe Use of. **World Health**, v. II, p. 204, 2006.

WICHT, K. *et al.* Enhanced Sensitivity in Comprehensive Liquid Chromatography: Overcoming the Dilution Problem in LC × LC via Temperature-Responsive Liquid Chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 94, n. 48, p. 16728–16737, 6 dez. 2022.

WILLIAMS, M. *et al.* Emerging contaminants in a river receiving untreated wastewater from an Indian urban centre. **The Science of the total environment**, v. 647, p. 1256–1265, 10 jan. 2019.

XIA, C. *et al.* Direct electrosynthesis of pure aqueous H₂O₂ solutions up to 20% by weight using a solid electrolyte. **Science (New York, N.Y.)**, v. 366, n. 6462, p. 226–231, 11 out. 2019.

YANG, Y. *et al.* Comparative study on degradation of propranolol and formation of oxidation products by UV/H₂O₂ and UV/persulfate (PDS). **Water research**, v. 149, p. 543–552, 1 fev. 2019.

YASIR, M. *et al.* Facile hplc technique for simultaneous detection of estrogenic hormones in wastewater. **NANOCON Conference Proceedings - International Conference on Nanomaterials**, v. 2021- October, p. 272–276, 2021.

ZHANG, H. *et al.* Integrated recombinant gene yeast bioassay and HPLC-MS analysis for detection of low-dose multi-component residue of hormone-like compounds in environment. **The Science of the total environment**, v. 773, 15 jun. 2021.

ZHANG, X. *et al.* Solvent effect on the photophysical properties of thermally activated delayed fluorescence molecules. **Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy**, v. 225, 15 jan. 2020.

ZHAO, JINGTAO *et al.* Research on optical fiber SPR sensing characteristics of surface-enhanced fluorescence. **AOPC 2023: Optical Sensing, Imaging, and Display Technology and Applications; and Biomedical Optics**, p. 13, 18 dez. 2023.

ZHONG, M. *et al.* Emerging Organic Contaminants in Chinese Surface Water: Identification of Priority Pollutants. **Engineering**, v. 11, p. 111–125, 1 abr. 2022.