

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE QUÍMICA

JULIANO EDUARDO ALVES

**GC-MS × LC-MS/MS PARA A DETERMINAÇÃO DE HORMÔNIOS ESTEROIDAIIS  
EM AMOSTRAS AMBIENTAIS AQUOSAS**

Porto Alegre, 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE QUÍMICA

JULIANO EDUARDO ALVES

**GC-MS X LC-MS/MS PARA A DETERMINAÇÃO DE HORMÔNIOS ESTEROIDAIIS  
EM AMOSTRAS AMBIENTAIS AQUOSAS**

Monografia apresentada junto à atividade de ensino  
“Projeto Tecnológico” do curso de Química  
Industrial, como requisito parcial para a obtenção  
do grau de Bacharel em Química Industrial.

Profa. Dra. Tânia Mara Pizzolato

Orientador

Porto Alegre, 2017

## AGRADECIMENTOS

À professora Tânia Mara Pizzolato pela orientação na execução deste trabalho, pela compreensão com as falhas e pelos ensinamentos e conselhos dados, contribuindo para meu crescimento como profissional e como químico.

Ao professor João Henrique Zimnoch dos Santos pela convivência no Instituto de Química e pelas aulas de química analítica instrumental, onde demonstrou não apenas conhecimento, mas também profunda dedicação em ensinar.

Ao Alex, pela ajuda com questões técnicas sobre cromatografia, onde demonstra conhecimento sem igual, sempre disposto a compartilhá-lo.

Ao Alan, pela amizade e por sempre se mostrar solícito em auxiliar na execução deste trabalho, seja com revisão de textos, pesquisa de artigos, aprimoramento de gráficos e outros tantos mais.

Aos colegas do LQAA, Juliana, Eduardo, Carolina e Nátali pela ajuda na realização da parte experimental deste trabalho.

Aos colegas de trabalho da Química Analítica do Instituto de Química, pela compreensão quando precisei me dividir entre as tarefas do setor e a realização deste projeto.

Ao André, pela amizade e por mostrar que ainda existem estudantes dispostos a aprender e aprimorar seu conhecimento na ciência.

Aos meus pais, Jackson e Ana Margarete pelo amor e por sempre incentivarem o estudo, nunca duvidando da minha escolha profissional. Aquela estante cheia de enciclopédias foi a porta de entrada para esse universo do qual hoje faço parte.

À Juliana, por todo o amor e companheirismo, por me incentivar a crescer, não estagnar no conformismo e sempre acreditar que posso fazer muito mais do que imagino.

## RESUMO

A determinação de compostos em nível de traços em amostras ambientais é sempre um desafio analítico, tanto no que diz respeito à concentração dos compostos alvo bem como aos problemas relacionados à matriz. A infraestrutura necessária para um laboratório com condições de realizar este tipo de análise sempre demanda alto investimento inicial (equipamentos e instalações) e altos valores de manutenção (aquisição de padrões, reagentes, solventes, vidrarias, gases e outros), o que exige mão de obra especializada. Neste contexto, este trabalho apresenta um estudo comparativo entre duas técnicas analíticas, a cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) e a cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS), na determinação de hormônios esteroidais em amostras aquosas ambientais. Foram escolhidos os hormônios como compostos alvo porque podem ser analisados tanto por GC-MS como por LC-MS/MS. Além disso, estes compostos fazem parte de monitoramento realizado pelo Laboratório de Química Analítica e Ambiental (LQAA) na água do Arroio Dilúvio, Rio dos Sinos e Rio Gravataí, possibilitando a discussão da problemática ambiental. Os compostos alvos foram: estrona,  $\beta$ -estradiol,  $17\alpha$ -etinilestradiol, estriol, progesterona, alopregnanolona, gestodeno e drospirenona, os quais foram analisados nos corpos hídricos citados.

A metodologia analítica para análise por GC-MS foi definida e validada em trabalho anterior e por LC-MS/MS foram utilizados dados da literatura. Em ambos os casos considerou-se a extração em fase sólida (SPE) como preparo de amostra. A análise por GC-MS necessitou de derivatização prévia com MSTFA ativado III e análise no modo de Monitoramento de Íons (SIM) com curva de calibração externa. Os limites de detecção obtidos foram de  $5 \text{ ng mL}^{-1}$  (estrona) a  $100 \text{ ng mL}^{-1}$  (gestodeno). A análise por LC-MS/MS foi avaliada com base em artigos científicos publicados sobre determinação de hormônios esteroidais em matrizes aquosas publicados no último período de 2012 a 2017.

Avaliou-se o custo de instrumentação de um laboratório para realizar estas análises, bem como o custo por análise e o treinamento de técnicos para operação dos instrumentos. O laboratório com GC-MS tem custo de implantação em torno de 14% do necessário para LC-MS/M, enquanto o custo por análise é aproximadamente 25% menor. No que diz respeito à mão de obra qualificada, as exigências são muito maiores para o LC-MS/MS.

Palavras-chave: Hormônios esteroidais. Cromatografia a gás e líquido. Espectrometria de massas. Matrizes aquosas ambientais.

## ABSTRACT

The determination of trace level compounds in environment samples is always an analytical challenge, regarding both concentration of target chemicals and matrix related problems. The required infrastructure of a laboratory with condition to perform this type of analysis always demands high initial investment (equipment and installations) and high maintenance values (acquisition of standards, reagents, solvents, glassware, gases and others), which requires specialized labor. In this context, this work presents two analytical techniques, gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) and liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS), in the determination of steroidal hormones in aqueous environmental samples. Hormones were chosen as target compounds because they can be analyzed by both GC-MS and LC-MS/MS. In addition, these compounds are part of monitoring performed by the Laboratório de Química Analítica e Ambiental (LQAA) in the water from Arroio Dilúvio, Rio dos Sinos e Rio Gravataí, enabling the discussion of the environmental issues. The target compounds were: estrone,  $\beta$ -estradiol,  $17\alpha$ -ethinylestradiol, estriol, progesterone, allopregnanolone, drospirenone and gestodene, which were analysed in the mentioned superficial water bodies.

The analytical methodology for GC-MS analysis was defined and validated from previous work, and for LC-MS/MS data from literature was used. In both cases solid phase extraction (SPE) was considered as sample preparation. GC-MS required derivatization with activated MSTFA III prior to analysis in Selected Ion Monitoring (SIM) with external calibration curve. Detection limits were between 5 ng mL<sup>-1</sup> (estrone) and 100 ng mL<sup>-1</sup> (gestodene). LC-MS/MS analysis was evaluated based on scientific articles on determination of steroid hormones in aqueous matrices published between 2012 - 2017.

It was evaluated the cost of instrumentation of a laboratory to perform these analyzes, as well as the cost per analysis and the training of technicians to operate the instruments. A GC-MS laboratory has an implementation cost around 14% of the required for LC-MS/MS, while the cost per analysis is 25% less expensive. As far as technical personnel are concerned, the requirements are much higher for LC-MS/MS.

Keywords: Steroid hormones. Gas and liquid chromatography. Mass spectrometry. Aqueous environmental matrices.

## APÊNDICES

APÊNDICE A – RESUMO DAS PUBLICAÇÕES SOBRE DETERMINAÇÃO DE HORMÔNIOS EM AMOSTRAS AQUOSAS NOS ÚLTIMO CINCO ANOS (2012 - 2017). .....	48
APÊNDICE B – RESUMO DAS PUBLICAÇÕES SOBRE DETERMINAÇÃO DE HORMÔNIOS EM AMOSTRAS AQUOSAS UTILIZANDO GC-MS.....	53
APÊNDICE C – RESUMO DAS PUBLICAÇÕES SOBRE DETERMINAÇÃO DE HORMÔNIOS EM AMOSTRAS AQUOSAS UTILIZANDO LC-MS.....	55
APÊNDICE D – RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DE HORMÔNIOS POR GC-MS NO ARROIO DILÚVIO. ....	59
APÊNDICE E – RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DE HORMÔNIOS POR GC-MS NO RIO DOS SINOS E RIO GRAVATAÍ.....	60
APÊNDICE F – EQUIVALENTE ESTRADIOL ( $\text{ng L}^{-1}$ ) CALCULADO PARA O ARROIO DILÚVIO .....	61
APÊNDICE G – ESPECTROS DE MASSAS DOS ANALITOS OBTIDO POR GC-MS NO MODO SCAN. ....	62
APÊNDICE H – CURVAS ANALÍTICAS OBTIDAS PARA CADA HORMÔNIO POR GC-MS. ....	63

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da origem de resíduos de contaminantes no meio ambiente. ....	15
Figura 2 – Estrutura básica dos hormônios .....	17
Figura 3 – Estrutura química dos hormônios de interesse.....	17
Figura 4 – Etapas necessárias e técnicas para análise de hormônios em amostras aquosas.....	19
Figura 5 – Artigos publicados em revistas indexadas relativo a determinação de estrógenos. 19	
Figura 6 – Levantamento de publicações em revistas científicas especializadas sobre análise de estrógenos em água e as técnicas cromatográficas utilizadas.....	20
Figura 7 – Reação de derivatização de sililação envolvendo hormônios (R-OH), onde X diferencia os derivatizantes. ....	22
Figura 8 – Fluxograma da preparação da curva analítica para GC-MS. ....	27

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Condições de análise GC-MS.....	26
Tabela 2 – Condições de análise LC-MS/MS. ....	28
Tabela 3 – Método SIM para análise quantitativa de hormônios. ....	29
Tabela 4 – Dados da curva analítica. ....	30
Tabela 5 – EEQ médio e porcentagem de ocorrência nos rios monitorados. ....	31
Tabela 6 – Valores dos itens utilizados na estimativa de custo de análises. ....	34
Tabela 7 – Estudo de custo de análise de hormônios por GC-MS. ....	34
Tabela 8 – Estudo de custo de análise de hormônios por LC-MS/MS.....	35
Tabela 9 – Estudo de custo de instrumentação de um laboratório para GC-MS.....	35
Tabela 10 – Estudo de custo de instrumentação de um laboratório para LC-MS/MS. ....	36



## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	OBJETIVOS.....	13
2.1	OBJETIVOS GERAIS.....	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
3.1	CONTAMINANTES EMERGENTES.....	14
3.2	DESREGULADORES ENDÓCRINOS.....	15
3.3	HORMÔNIOS .....	16
3.4	MÉTODOS DE ANÁLISE.....	18
3.4.1	Análise de hormônios por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (GC-MS). .....	21
3.4.2	Análise de hormônios por cromatografia a líquido acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS). .....	22
4	METODOLOGIA.....	24
4.1	MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
4.1.1	Materiais .....	24
4.1.2	Métodos .....	24
4.1.2.1	Coleta e preservação de amostras.....	24
4.1.2.2	Extração em fase sólida.....	25
4.1.2.3	Derivatização dos analitos de interesse.....	25
4.1.2.4	Análise por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas. ....	25
4.1.2.5	Curva analítica.....	26
4.1.2.6	Análise por cromatografia a líquido acoplada a espectrometria de massas.....	26

4.1.2.7	Limites de detecção e quantificação .....	27
4.1.2.8	Cálculo da atividade estrogênica.....	28
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	29
5.1	CROMATOGRAFIA A GÁS ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (GC-MS).....	29
5.1.1	Método SIM.....	29
5.1.2	Análise de amostras aquosas ambientais .....	30
5.2	CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (LC-MS/MS) .....	31
5.3	VIABILIDADE ECONÔMICA E AMBIENTAL .....	31
5.3.1	Custo de mão de obra .....	31
5.3.2	Custo por análise .....	32
5.3.3	Custo de instrumentação.....	32
5.3.4	Impacto ambiental .....	33
6	CONCLUSÃO.....	36
7	REFERÊNCIAS .....	37

## 1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento tecnológico tem possibilitado grandes avanços da ciência, o que acaba refletindo no dia-a-dia das comunidades. Atualmente, fala-se em contaminantes emergentes e desreguladores endócrinos, contaminantes em nível de traços, quase como se fossem “lugar comum”. No entanto, há duas décadas não era possível realizar medidas que hoje estão incorporadas à rotina de muitos laboratórios de controle sanitário, por exemplo, que permitem garantir a qualidade e segurança de alimentos de origem vegetal e animal. Porém, pouco se discute sobre as dificuldades e o investimento financeiro e de pessoal para se ter um laboratório em condições de realizar este tipo de análise.

Diversos são os compostos químicos de origem natural ou sintética que são despejados diariamente nos sistemas ambientais aquáticos devido a atividades humanas, seja pela inexistência de tratamento de águas residuais e seu descarte direto ou pelo tratamento ineficaz ou incompleto das mesmas. Provenientes de usos industriais, agropecuários ou domésticos, vários destes compostos, devido ao recente histórico de aplicação, não apresentam regulamentação quanto aos níveis seguros de sua presença em corpos aquáticos. Além disso, os efeitos potenciais de sua ecotoxicidade, mesmo em baixas concentrações, tanto à vida selvagem quanto a humanos, ainda não são completamente compreendidos e estudados. A esse tipo de contaminante dá-se o nome de Contaminantes Emergentes (ECs).

Entre os contaminantes emergentes encontra-se um subgrupo denominado Desreguladores Endócrinos (EDCs), que reúne moléculas capazes de alterar as funções do sistema endócrino dos seres vivos incluindo indivíduos, população e descendentes. Os principais compostos classificados como EDCs são os hormônios esteroidais, de origem natural como a estrona, estriol e  $\beta$ -estradiol, ou sintéticos como o  $17\alpha$ -etinilestradiol. Estes hormônios estão presentes em águas superficiais como rios em concentrações na faixa de  $\text{ng L}^{-1}$ , a qual já é suficiente para causar respostas estrogênicas em peixes, como feminilização e hermafroditismo.

Dada a complexidade da matriz, a faixa de concentração em que os hormônios esteroidais encontram-se presentes e o efeito desregulador endócrino causado por estes, a detecção destes compostos em sistemas aquáticos e sua quantificação é uma parte importante do monitoramento ambiental de rios, arroios e demais águas superficiais. Faz-se necessária, portanto, uma técnica analítica capaz de detectá-los com limites de detecção e quantificação (LD e LQ) na ordem de  $\text{ng L}^{-1}$ , com boa reprodutibilidade e baixos custos, tanto quanto

possível. Entre as técnicas disponíveis atualmente para quantificação de hormônios encontram-se as técnicas não instrumentais, entre elas os ensaios imunológicos (ELISA e RIA) e biológicos (YES e *E-screen*), e as técnicas instrumentais cromatográficas, que incluem GC-MS e GC-MS/MS (EI, *Cold*-EI e CI), LC (EC, DAD, FLD e UV), LC-MS e LC-MS/MS (APCI, ESI e APPI).

Os ensaios imunológicos apesar de simples e menos custosos, demandam tempo, materiais radioativos (no caso de RIA) e estão sujeitos a interferências de reatividade cruzada entre anticorpos e antígenos diferentes do analito, não apresentando exatidão e precisão em faixas de concentrações muito baixas, como o caso das amostras ambientais. Assim, os resultados costumam ser superestimados, com resultados de concentração mais elevados do que o real. Já os ensaios biológicos são capazes de determinar apenas a atividade estrogênica total, expressa em equivalente estradiol (EEQ), sendo menos precisa e específica do que as demais técnicas.

A vantagem das técnicas cromatográficas está na possibilidade de separação e análise de múltiplos compostos simultaneamente. Além disso, o uso de espectrômetro de massas permite a identificação de compostos não conhecidos ou que não possuem padrões. A cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) é bem estabelecida como técnica para determinação de hormônios esteroidais em amostras ambientais, sendo ecologicamente menos impactante (pelo uso gases inertes) e menos sensível a efeitos de matriz do que a cromatografia a líquido (LC). Entretanto, seu uso com este objetivo está condicionado a uma etapa adicional no preparo da amostra, a derivatização, que implica não apenas mais um procedimento experimental que pode acarretar perdas e variações no método, além de aumento no tempo de análise, mas também o uso de um reagente de custo elevado, o derivatizante.

Recentemente, a cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) vem se apresentando como substituta à GC-MS, pois não requer a etapa de derivatização e permite análises em tempos menores com aumento de sensibilidade e com maior facilidade de identificação de compostos, apesar de seu elevado custo de instrumentação e necessidade de pessoal altamente qualificado para operação. Utilizando técnicas de ionização suaves como *elétronspray* (ESI), ionização química à pressão atmosférica (APCI) e ionização fotoquímica à pressão atmosférica (APPI), conjuntamente com analisadores de alto poder de resolução como o analisador de massas por tempo-de-voou acoplado a filtro de massas quadrupolo (Q-ToF-MS) ou de alta sensibilidade como o triplo-

quadropolo (QqQ), a cromatografia a líquido vem se mostrando uma ferramenta valiosa para atingir baixos limites de detecção necessários na análise de amostras ambientais.

Neste contexto, este projeto tecnológico visa comparar as técnicas de GC-MS e LC-MS/MS para a determinação de hormônios esteroidais em amostras de água superficial, discutindo critérios de custos, complexidade, limites de detecção e quantificação, treinamento técnico, além de realizar uma discussão dos resultados obtidos durante o período de monitoramento em que o trabalho foi conduzido. Para realizar esta avaliação foram utilizados os dados dos Laboratórios de Cromatografia da Graduação (LABChrom) e do laboratório 201-43161, ambos pertencentes à Central Analítica do Instituto de Química/UFRGS.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

Comparar o desempenho das técnicas de GC-MS e LC-MS/MS em termos de limites de detecção e recursos econômicos necessários para a determinação de estrona,  $\beta$ -estradiol,  $17\alpha$ -etinilestradiol, estriol, alopregnanolona, drospirenona, gestodeno e progesterona em água superficial.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Implementar a etapa de preparo de amostra, com condições de extração/pré-concentração estabelecidas em trabalho anterior;
- Analisar amostras reais de água de rio coletadas no Arroio Dilúvio, Rio dos Sinos e Rio Gravataí na região metropolitana de Porto Alegre, utilizando os procedimentos estabelecidos;
- Comparar os custos por análise e para implementação de um laboratório em condições de realizar análises por GC-MS e LC-MS/MS

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 CONTAMINANTES EMERGENTES

Água é o principal recurso natural, essencial para todos os seres vivos e para as mais diversas atividades humanas, como uso doméstico, agricultura e indústria. Entretanto, muitas dessas atividades, devido ao descaso acabam por contaminar as reservas desse bem natural, desde aquíferos a águas superficiais como rios, lagos e lagoas. Entre os diversos contaminantes lançados diariamente aos corpos hídricos encontram-se aqueles tradicionais ou bem conhecidos, que incluem metais tóxicos como cádmio e chumbo, hidrocarbonetos de petróleo ou poliaromáticos, certos pesticidas e amianto.<sup>1</sup>

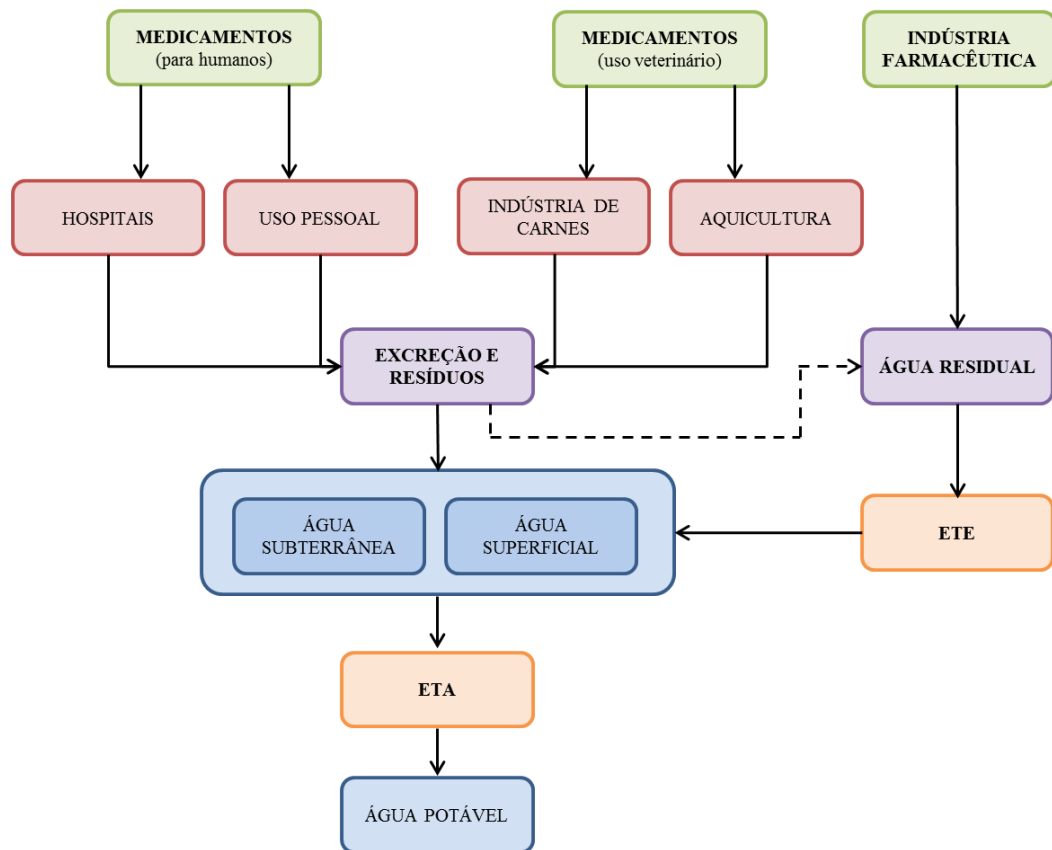
Porém, com o desenvolvimento de técnicas de instrumentação analítica mais sensíveis, nas últimas décadas do século XX e no início do século XXI, um significativo número de compostos em baixas concentrações pôde ser detectado, mesmo que estivessem presentes anteriormente, porém não detectáveis.<sup>2</sup> À medida que os trabalhos foram sendo intensificados, foi constatado que os dados sobre os efeitos ecotoxicológicos a longo prazo desses compostos eram escassos e que, mesmo em baixas concentrações, eram capazes de induzir respostas biológicas impactantes em seres vivos aquáticos. Desde então, o meio científico preocupa-se com questões como quais são os efeitos e qual o destino, transporte e forma de tratamentos referentes a esses contaminantes, denominados de contaminantes emergentes (ECs).<sup>3</sup> Sua presença pode ser detectada em ambientes aquáticos e terrestres e mesmo em água potável, não sendo comumente controlados e/ou monitorados, apesar de seu potencial efeito adverso em concentrações baixas, na faixa de  $\text{ng L}^{-1}$  ou  $\mu\text{g L}^{-1}$ .<sup>4</sup>

Essa nova classe de contaminantes inclui mais de 80.000 compostos químicos sintéticos ou naturais, constituída de pesticidas, compostos industriais, fármacos, produtos de uso pessoal, hormônios esteroidais, drogas de abuso, nanomateriais, líquidos iônicos, retardantes de chama e outros, que são lançados diariamente ao meio ambiente como parte do processo produtivo ou de resíduos domésticos e industriais.<sup>1,3</sup>

Os ECs são introduzidos ao meio ambiente principalmente por água residual industrial e esgoto doméstico, proveniente de efluentes de estações de tratamento ou por despejo direto sem tratamento. Mesmo em locais onde o tratamento de água residual aconteça, a remoção destes compostos pode não ser completa.<sup>1</sup> Outras fontes incluem lixiviação de aterros, escoamentos agrícolas e pecuários e efluentes de hospitais.<sup>3</sup> Uma vez no meio ambiente,

processos de biodegradação como oxidação e redução química, hidrólise e fotólise podem converter os ECs em outros produtos, que embora reduzam a concentração do composto original, em alguns casos podem ser ainda mais problemáticos.<sup>4</sup> A Figura 1 resume as origens e os caminhos percorridos por fármacos, um tipo de contaminantes emergentes, até alcançarem as fontes de água natural e potável.

Figura 1 – Representação esquemática da origem de resíduos de fármacos no meio ambiente.



Fonte: adaptado de Barbosa e colaboradores.<sup>3</sup>

### 3.2 DESREGULADORES ENDÓCRINOS

Um subgrupo importante dos contaminantes emergentes é constituído de substâncias que podem perturbar a função normal do sistema endócrino de seres humanos e animais, os chamados compostos desreguladores endócrinos (EDCs). Consistindo de compostos

orgânicos naturais ou sintéticos utilizados em produtos farmacêuticos, produtos de uso pessoal e produtos químicos de uso industrial, esses compostos são capazes de interferir na ação de hormônios endógenos, mimetizando ou antagonizando seus efeitos, prejudicando sua síntese e metabolismo ou atuando sobre os receptores específicos destes hormônios, havendo uma preocupação constante de quais riscos estes EDCs representam ao meio ambiente e aos seres humanos.<sup>5,6</sup>

Os principais compostos denominados de desreguladores endócrinos são os estrógenos e andrógenos, naturais ou sintéticos. Os estrógenos naturais como estrona, estriol e  $\beta$ -estradiol e sintéticos como  $17\alpha$ -etinilestradiol são os principais representantes dos EDCs, apresentando elevado potencial desregulador endócrino em baixas concentrações ( $\text{ng L}^{-1}$ ) para seres vivos.<sup>6</sup> Outros compostos como octilfenol, nonilfenol, etoxilados de nonilfenol, bisfenol A e ftalatos também expressam estrogenicidade, mas em uma menor extensão que estrógenos.<sup>7</sup>

### 3.3 HORMÔNIOS

Hormônios esteroidais são sintetizados nos organismos a partir do colesterol e liberados pelo córtex adrenal, testículos, ovários e placenta, apresentando em comum uma estrutura básica de 17 átomos de carbono dispostos em três anéis ciclohexano e um anel ciclopentano ligados entre si, conforme demonstrado na Figura 2. Capazes de induzir respostas terapêuticas em baixas concentrações, são excretados por todos os animais, incluindo seres humanos, em quantidades diferentes, definidas pela idade, estado de saúde, dieta e gravidez. Mulheres grávidas excretam entre 260-790  $\mu\text{g}/\text{dia}$  de estrona, 280-600  $\mu\text{g}/\text{dia}$  de  $\beta$ -estradiol e 6000 a 10.000  $\mu\text{g}/\text{dia}$  de estriol. Os estrógenos, hormônios sexuais femininos naturais, como estrona (E1),  $\beta$ -estradiol (E2) e estriol (E3) mais o sintético  $17\alpha$ -etinilestradiol (EE2) são os estrógenos comumente encontrados em análises de águas residuais e superficiais. Estes hormônios ajudam a regular a reprodução, função cardiovascular, força óssea, comportamento cognitivo, sucesso de gravidez e sistema gastrointestinal, enquanto EE2 é o mais utilizado em formulação de contraceptivos orais.<sup>5,7-9</sup> Outros hormônios com importância e utilização por seres humanos incluem a progesterona, gestodeno, alopregnanolona e drospironona. As estruturas químicas destes compostos estão representadas na Figura 3.



Figura 2 – Estrutura básica dos hormônios

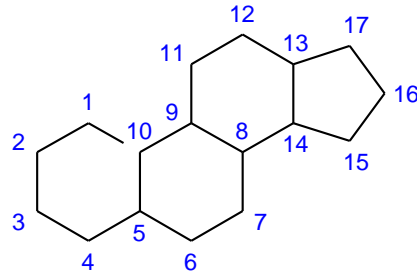
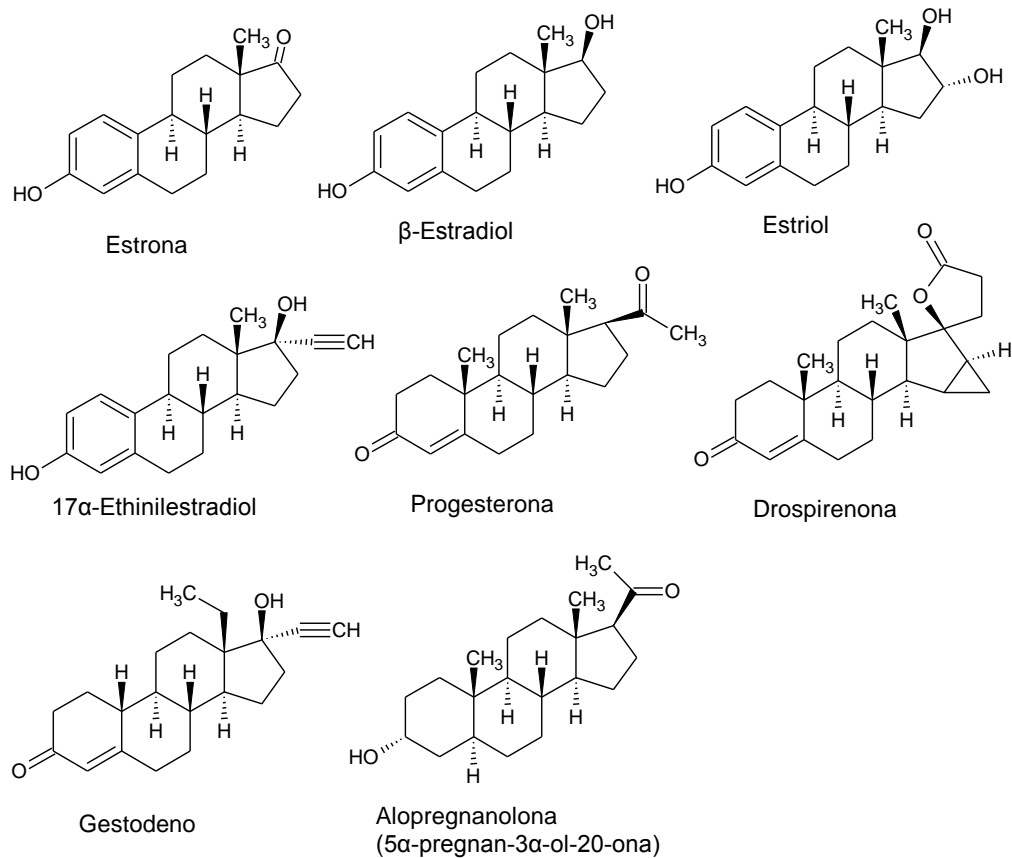


Figura 3 – Estrutura química dos hormônios de interesse.



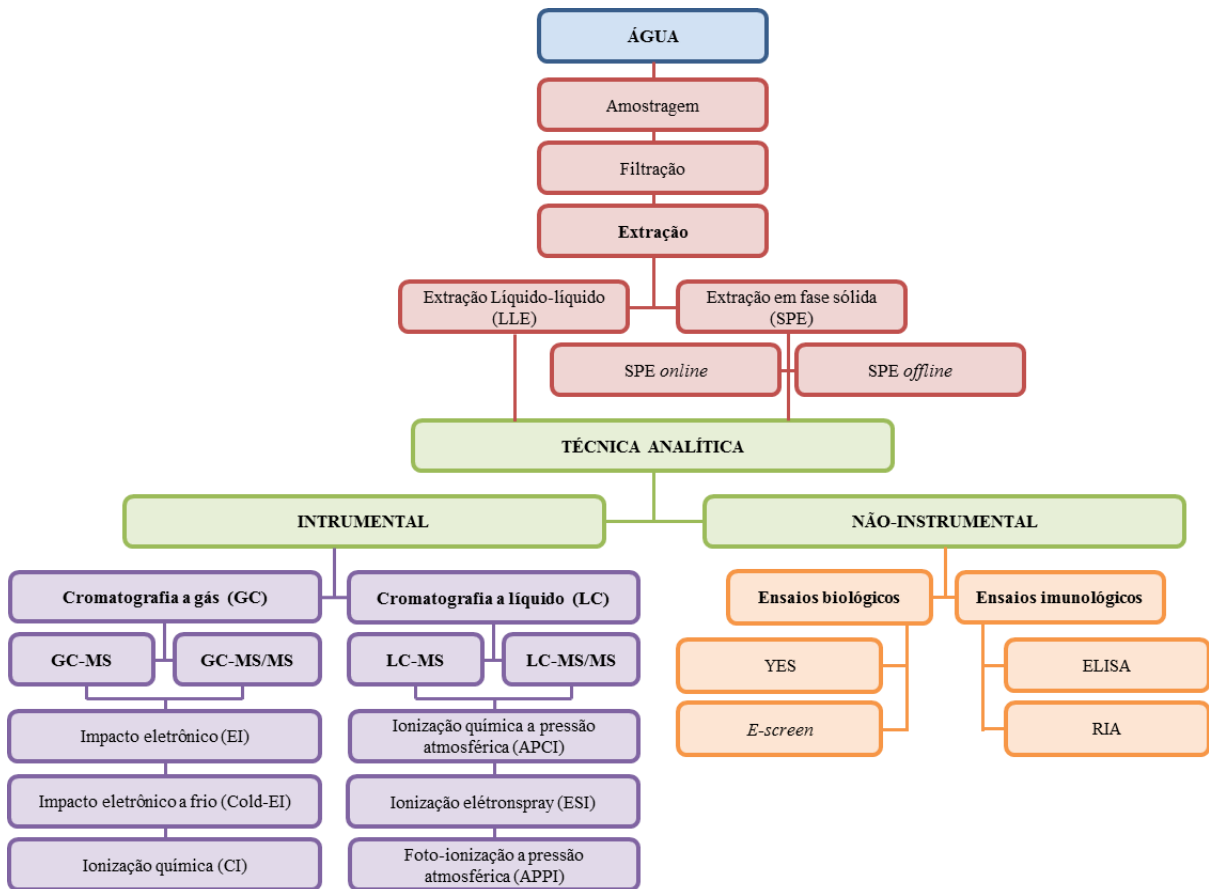
Através da excreção, estes hormônios acabam no meio ambiente através do despejo de efluentes domésticos e disposição de resíduos de animais, que são utilizados diretamente no solo como adubo, escoando para reservatórios de água e alcançando água potável. Estima-se que a população mundial despeje 30.000 kg/ano de estrógenos naturais e 700 kg/ano de estrógeno sintético somente pela utilização como controle de natalidade, enquanto o descarte de estrógenos por práticas agropecuárias representa apenas nos Estados Unidos e União Europeia uma quantidade de 83.000 kg/ano.<sup>5,8,9</sup>

### 3.4 MÉTODOS DE ANÁLISE

A primeira etapa para o estudo de contaminantes emergentes no meio ambiente é a identificação destes os compostos. Os avanços recentes no entendimento dessa classe de poluentes tem se correlacionado fortemente aos avanços em instrumentação analítica.<sup>4</sup> As matrizes ambientais são diversas e complexas e constituem um dos maiores desafios na detecção e quantificação de compostos em baixas concentrações. Métodos analíticos precisos ainda encontram-se em estágio de desenvolvimento. Sem a identificação adequada, o problema dos ECs, incluindo suas fontes, caminhos e destinos no meio ambiente, não pode ser resolvido.<sup>1</sup> Com o desenvolvimento de novas técnicas analíticas, a detecção de concentrações na faixa de  $\mu\text{g L}^{-1}$  e  $\text{ng L}^{-1}$  em matrizes ambientais como água residual, superficial e subterrâneas tornou-se possível, conduzindo numerosos artigos na área da química analítica para otimização e validação de métodos de preparo e de análise de amostras ambientais.<sup>10</sup> A Figura 4 apresenta as etapas de tratamento de amostra necessárias à análise de hormônios em águas ambientais e as técnicas disponíveis para detectar e/ou quantificar estes analitos, enquanto o gráfico apresentado na Figura 5 apresenta o número de artigos publicados por ano sobre determinação de estrógenos, onde é possível identificar um salto na quantidade de publicações nas última décadas do século XX, acompanhando o desenvolvimento de técnicas instrumentais como a cromatografia a líquido acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS). O Apêndice A resume os estudos publicados nos últimos cinco anos (2012 a 2017) sobre a determinação de hormônios em diferentes matrizes aquosas.

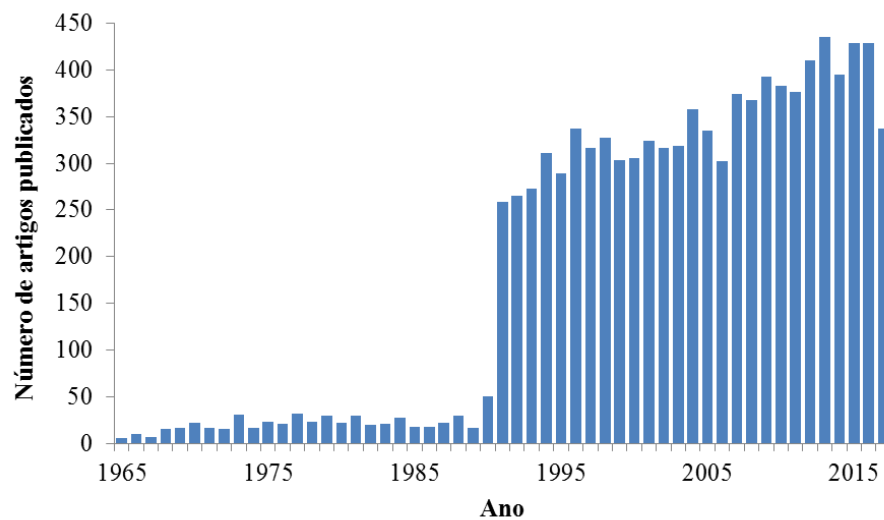
Uma vez que hormônios em amostras ambientais estão presentes em traços, a extração se faz necessária, com o objetivo de pré-concentrar os analitos e atenuar interferentes referentes à matriz complexa. Os dois métodos de extração mais utilizados para hormônios são a extração líquido-líquido (LLE) e extração em fase sólida (SPE). A SPE tem sido a técnica de preferência devido a sua simplicidade experimental e fácil automação frente à LLE, que consome uma grande quantidade de solventes orgânicos tóxicos. A técnica SPE é dividida em duas classificações: SPE *off-line* e SPE *on-line*. Esta última engloba todas as etapas envolvidas na SPE *off-line* (condicionamento, enriquecimento, lavagem e eluição) em um único procedimento automatizado, embora o procedimento *off-line* ainda seja o mais utilizado por ser menos custoso e atingir recuperações satisfatórias.<sup>11,12</sup>

Figura 4 – Etapas necessárias e técnicas para análise de hormônios em amostras aquosas.



Fonte: adaptado de Fang e colaboradores.<sup>12</sup>

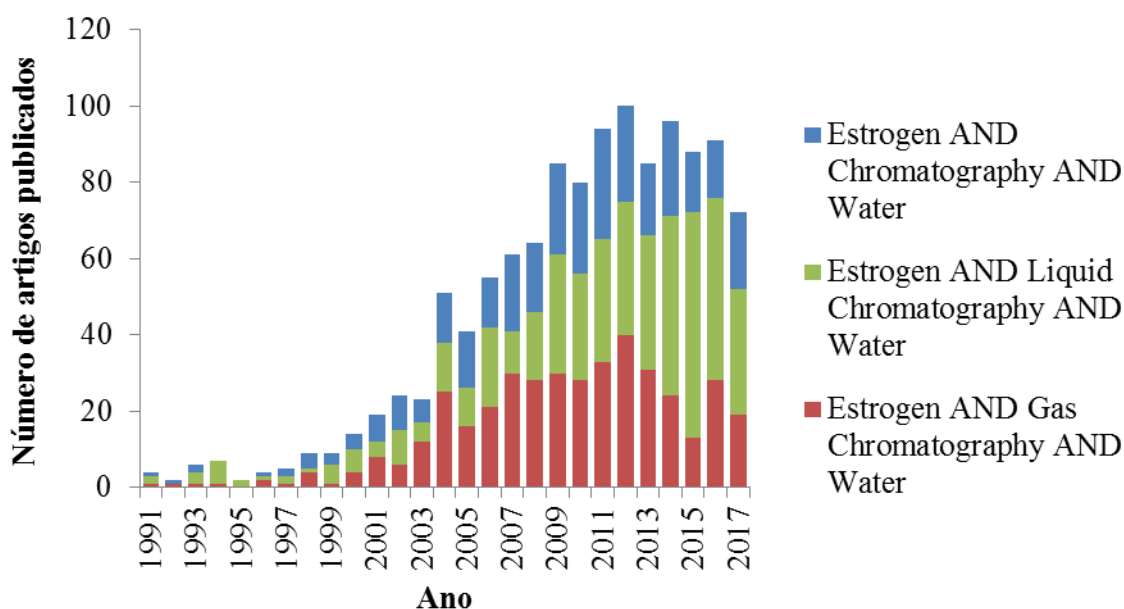
Figura 5 – Artigos publicados em revistas indexadas relativo a determinação de estrógenos.



Fonte: *Web of Science*. Pesquisa por Tópico: *estrogen AND determination* (06/12/2017 às 16:00).

Entre os problemas abordados no desenvolvimento de métodos analíticos encontram-se os limites instrumentais de sensibilidade e limites no número de compostos que podem ser incluídos em uma dada metodologia. Alguns EDCs podem ser biologicamente ativos em concentrações abaixo dos limites de detecção (LD), enquanto outros podem estar presentes mas não serem detectáveis por determinado método.<sup>6</sup> As técnicas analíticas instrumentais mais utilizadas na determinação de hormônios esteroidais em amostras aquosas são as cromatografias a gás e a líquido (GC e LC). A Figura 6 representa a frequência de artigos na determinação de estrógenos em água utilizando técnicas cromatográficas. Ambas as técnicas tem se demonstrado adequadas na análise de hormônios esteroidais, atingindo baixos limites de detecção necessários. As diferenças encontram-se no menor efeito de matriz observado, melhor eficiência de separação e menos agressividade ao meio ambiente devido ao não-uso de solventes tóxicos apresentados pela GC frente a LC, que dispensa a necessidade de reações de derivatização, requer menos tempo de análise e é capaz de apresentar resultados mais precisos e exatos.<sup>12</sup>

Figura 6 – Levantamento de publicações em revistas científicas especializadas sobre análise de estrógenos em água e as técnicas cromatográficas utilizadas.



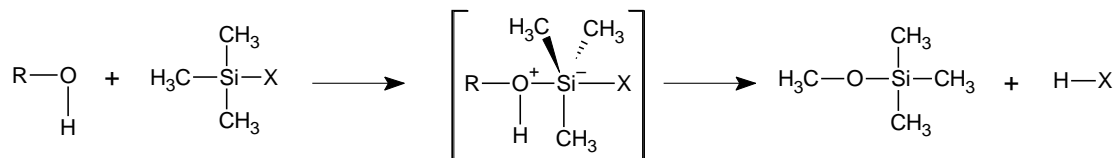
Fonte: *Web of Science* (06/12/2017 às 16:00).

Matrizes complexas necessitam da espectrometria de massas (MS) em modos seletivos de detecção como *Single Ion Monitoring* (SIM) ou *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) para uma identificação adequada em baixas concentrações, que não pode ser alcançada com detectores UV, DAD, EC ou similares. Três tipos de técnicas têm sido utilizados: GC-MS, GC-MS/MS e LC-MS/MS. A escolha da técnica depende principalmente da disponibilidade do equipamento e dos limites de detecção necessários. Para a análise de hormônios sozinhos em amostras ambientais, GC-MS e GC-MS/MS são as técnicas mais utilizadas. Porém, dada a necessidade do entendimento da composição de uma amostra ambiental como uma mistura complexa de contaminantes, a LC-MS/MS acaba sendo a escolha mais adequada. Um exemplo é a análise de conjugados de estrógenos, que não podem ser analisados por GC por causa de sua não-volatilidade, requerendo um método LC ou então uma reação de desconjugação, que leva a perda de informações importantes.<sup>9</sup>

#### **3.4.1 Análise de hormônios por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (GC-MS).**

A análise por GC-MS de hormônios esteroidais requer uma etapa adicional no preparo de amostra que é a derivatização, embora alguns hormônios possam ser analisados na forma nativa. A derivatização envolve uma reação química que tem por objetivo modificar os grupos funcionais das moléculas alvo a fim de aumentar a estabilidade dos analitos frente ao modo de injeção utilizado em GC, evitando sua decomposição térmica, além de aumentar a volatilidade, a ionização, a sensibilidade da detecção e a separação e reduzir a polaridade, que devido a interações com a fase estacionária pode alargar os picos cromatográficos, levando a menor resolução além de formas, áreas e alturas de pico irreprodutíveis.<sup>13</sup> A geração de fragmentos com maior massa melhora a relação sinal/ruído e, portanto, os limites de detecção, pois as regiões de mais alta massa apresentam menos fragmentos de contaminação.<sup>14</sup> Não existe um derivatizante específico para estrógenos, podendo-se utilizar vários deles, uma vez que quase todos reagem com o grupo hidroxila dos esteróis, conforme exemplo na Figura 7.

Figura 7 – Reação de derivatização de sililação envolvendo hormônios (R-OH), onde X diferencia os derivatizantes.



Fonte: adaptado de Dallegrave.<sup>15</sup>

Diversos artigos têm como objetivo a otimização da reação de derivatização. A sililação é a técnica mais utilizada, onde hidrogênios dos grupos OH são substituídos por um grupo silila  $-\text{SiR}_3$  conforme demonstrado na Figura 7, formando derivados trimetilsilila (TMS) e tert-butildimetilsilil (t-BDMS), sendo os reagentes derivatizantes de preferência BSTFA, MTBSTFA e MSTFA. As interações de ligação de hidrogênio são diminuídas, aumentando a volatilidade, enquanto grupos silila promovem caminhos de fragmentação característicos, gerando abundância de íons típicos que podem ser utilizados para análise de traços no modo SIM<sup>14</sup>. A alquilação e acilação são alternativas. A derivatização com BSTFA costuma ser a mais escolhida, embora, os protocolos de extração variam e até o momento não há um método de referência para análise de esteroides em matrizes ambientais. O que é necessário apenas é que o agente derivatizante disponha de piridina em sua composição quando o objetivo é a análise de EE2, pois este solvente previne a clivagem do grupo etinila gerando E1 no calor do injetor<sup>9,16</sup>, embora tenha sido demonstrado que MSTFA é capaz de realizar a sililação completa dos grupos OH de hormônios sem a necessidade de qualquer outro composto auxiliar.<sup>17</sup>

O Apêndice B resume os principais artigos encontrados na literatura nos últimos cinco anos (2012 – 2017) onde verifica-se que GC-MS é uma técnica apropriada para análise de hormônios esteroidais em amostras aquosas ambientais pois atinge limites de detecção para análise de traços.

### 3.4.2 Análise de hormônios por cromatografia a líquido acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS).

Para a análise de rotina de ECs em amostras ambientais sistemas LC acoplados a triplo-quadrupolos (QqQ) tem se tornado a abordagem mais comumente utilizada. Oferecendo

alta sensibilidade e seletividade, com o uso desses detectores tem-se alcançado os limites de detecção na faixa de ng L<sup>-1</sup> necessários. Porém, a capacidade de identificação de compostos desconhecidos ou sem padrões é limitada nesses instrumentos, pois apresentam resolução de massas unitária. O desempenho único da espectrometria de massas de alta resolução (HR-MS) tem configurado importante papel na identificação desses compostos desconhecidos por permitirem o registro de cromatogramas no modo *full-scan* com alta precisão em massa, tornando possível a procura seletiva baseada na massa exata. São integrantes dessa classe de MS os analisadores *time-of-flight* (TOF), *iontrap* e sistemas híbridos como quadrupolo-TOF, linear *iontrap-Orbitrap*<sup>TM</sup> e quadrupolo-*Orbitrap*<sup>TM</sup>. Sem utilizar padrões de referência, a HR-MS apresenta dois tipos principais de abordagens para identificação de compostos e/ou seus produtos de transformação: *suspect screening*, quando pode-se prever a fórmula molecular e estrutura, ou *non-target screening*, que depende de softwares de processamento de dados para o entendimento dos dados obtidos.<sup>4</sup>

A análise por LC-MS/MS depende da otimização de uma série de parâmetros para maximizar a resposta do instrumento de conseqüentemente atingir os menores limites de detecção possíveis. O estudo pode ser realizado com cada fator separadamente por uma abordagem de tentativa e erro, utilizando a auto otimização que alguns equipamentos dispõem ou através de métodos estatísticos de abordagem quimiométrica. Entre os fatores envolvidos que podem ser variados de forma a melhorar a resposta e obter a melhor resolução, simetria e área de pico encontram-se temperatura de capilar e de vaporização, voltagem de spray, pressões de gás, composição da fase móvel, fluxo, volume de injeção entre outros.<sup>18</sup>

Estrógenos costumam ser analisados em LC com ionização negativa e em fase móvel neutra ou básica, com adição de hidróxido de amônio, acetato de amônio ou formato de amônio diretamente ao sistema ou em mistura isocrática como solvente inicial. Progestágenos requerem ionização positiva e fase móvel neutra ou modificada com ácido fórmico. Os solventes mais utilizados são água, acetonitrila e metanol, com mistura dependente do tipo de coluna utilizada. Os modos de ionização mais utilizados são ionização *elétronspray* (ESI) e ionização química a pressão atmosférica (APCI), ambos operando em modo positivo ou negativo.<sup>12</sup>

O Apêndice C resume os principais artigos encontrados no último período de 5 anos (2012 a 2017), onde observa-se a maior tendência no uso de colunas C18 e ESI negativo como modo de ionização, com dominância do analisador triplo-quadrupolo em MRM na análise de hormônios esteroidais em amostras aquosas. Em praticamente todos os casos os

limites de detecção são satisfatórios para análise de amostras ambientais contendo traços dos analitos, qualificando a LC-MS/MS como técnica adequada para este tipo de análise.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 4.1.1 Materiais

Todos os solventes utilizados foram de pureza grau HPLC. Acetato de etila e metanol foram adquiridos de *Panreac* (Espanha). Acetonitrila foi adquirida de *J.T. Baker* (México). Iso-octano foi adquirido de *Tedia* (Estados Unidos). Água ultrapura com resistividade  $18,2 \mu\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$  foi produzida por sistema *Milli-Q Plus* adquirido de *Millipore* (Estados Unidos). Membranas de nitrocelulose para filtração de água coletada de rio foram adquiridas de *Merck* (Irlanda). Cartuchos para extração em fase sólida *Supel<sup>TM</sup>-Select* HLB 200 mg/6 mL foram adquiridos de *Sigma-Aldrich* (Alemanha). pHmetro DM-32 foi adquirido de *Digimed* (Brasil). *Manifold VISIPREP<sup>TM</sup>* DL foi adquirido de *SUPELCO* (Estados Unidos). *Reacti-Vap<sup>TM</sup>* *Reacti-Therm I #TS-18822* para reações de derivatização e redução de volume foi adquirido de *Thermo Scientific* (Estado Unidos). Derivatizante MSTFA ativado III foi adquirido de *Sigma-Aldrich* (Alemanha). Cromatógrafo GC-MS modelo QP-2010 SE foi adquirido de *Shimadzu* (Japão). Coluna cromatográfica para GC Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm, 0,25  $\mu\text{m}$ ) foi adquirida de *Restek* (Estados Unidos). Cromatógrafo LC modelo *Nexera X2* foi adquirido de *Shimadzu* (Japão). Espectrômetro Q-ToF modelo *Impact 2* foi adquirido de *Brucker* (Estados Unidos).

#### 4.1.2 Métodos

##### 4.1.2.1 Coleta e preservação de amostras

As amostras de água superficial foram coletadas em três rios na região metropolitana de Porto Alegre, Rio Grande do Sul – Brasil: Arroio Dilúvio, Rio dos Sinos e Rio Gravataí. A coleta trimestral procedeu-se de setembro de 2016 a setembro de 2017. Foram coletados 1 L em cada ponto de coleta em frascos de vidro âmbar esterilizados, sendo adicionados 1 mL de



formaldeído para conservação, procedendo-se filtração com membranas de nitrocelulose 0,45  $\mu\text{m}$  e armazenagem sob refrigeração.<sup>15</sup> A etapa de SPE descrita no item 4.1.2.2 foi realizada em até 48 horas após a coleta.

#### 4.1.2.2 Extração em fase sólida

A amostra foi aclimatada em temperatura ambiente e o pH é ajustado com HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>. O cartucho HLB foi condicionado em *manifold* em vácuo de aproximadamente -20 kPa com 5 mL de acetato de etila, seguido de 5 mL de metanol e, por fim, 10 mL de água ultrapura pH 3,0 acidificada com HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>. 250 mL de amostra foram percolados através do cartucho em fluxo de 2,5 mL min<sup>-1</sup>. O cartucho foi seco com vácuo de aproximadamente -50 kPa por 15 minutos e então eluiu-se os analitos com 5 mL de acetato de etila sob fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>. O eluído foi seco em fluxo suave de nitrogênio e reconstituído de acordo com a técnica analítica a ser utilizada (GC-MS ou LC-MS/MS).<sup>15</sup>

#### 4.1.2.3 Derivatização dos analitos de interesse

Ao eluído seco, em vial de 2 mL, obtido após a etapa de SPE descrita no item 4.1.2.2 foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  do derivatizante MSTFA ativado III (composto de MTSFA e catalisador imidazol), agitando-se em vórtice por 30 segundos. Após, 100  $\mu\text{L}$  de solvente iso-octano foram adicionados e o vial foi colocado em sistema de aquecimento a 55 °C por 30 minutos. Após resfriamento, a amostra foi avolumada a 1 mL com iso-octano e analisada por GC-MS conforme item 4.1.2.4.<sup>15</sup>

#### 4.1.2.4 Análise por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas.

A análise por GC-MS foi realizada em um cromatógrafo a gás equipado com uma coluna sílica fundida 5% difenil 95% dimetilpolisiloxano e com espectrômetro de massas com analisador quadrupolo e impacto eletrônico (EI) como modo de ionização. As condições de análise estão apresentadas na Tabela **Erro! Fonte de referência não encontrada.** 1, adaptadas de trabalhos anteriores realizados no laboratório onde este estudo foi conduzido.<sup>15</sup> Análises no modo SCAN foram realizadas com padrões dos hormônios para obtenção do espectro de massas de cada composto, a partir do qual foram escolhidos dois íons para serem utilizados no modo SIM para quantificação.

Tabela 1 – Condições de análise GC-MS.

GC	<b>Temperatura do injetor</b>	250 °C
	<b>Volume de injeção</b>	1 µL
	<b>Modo de injeção</b>	<i>Splitless</i>
	<b>Coluna</b>	Rtx-5MS (30 m × 0,25 mm, 0,25 µm)
	<b>Gás de arraste</b>	Helio
	<b>Fluxo do gás de arraste</b>	1 mL.min <sup>-1</sup>
	<b>Rampa de aquecimento</b>	150 °C (2 min) – 10 °C/min – 250 °C (10 min) – 10 °C/min – 300 °C (3 min)
MS	<b>Temperatura da linha de transferência</b>	300 °C
	<b>Analizador de massas</b>	Quadrupolo
	<b>Voltagem de ionização por EI</b>	30 eV
	<b>Modo de análise MS</b>	SCAN e SIM

#### 4.1.2.5 Curva analítica

Os hormônios foram quantificados através de calibração externa, com curva analítica construída na matriz. Para este fim, procedeu-se a extração SPE descrita no item 4.1.2.2 em água superficial real para remoção de hormônios da matriz. A esta amostra sem hormônios foi adicionada solução padrão com mistura de todos os hormônios analisados neste estudo e procedeu-se extração SPE novamente, obtendo-se um extrato concentrado. Este extrato foi derivatizado conforme item 4.1.2.3 e a partir da solução concentrada obtida foram preparadas, por diluição, o pontos da curva analítica (0,5 – 1,0 – 5,0 – 10,0 – 25,0 – 50,0 – 100,0 – 150,0 – 200,0 ngmL<sup>-1</sup>). A Figura 8 apresenta o fluxograma do preparo desta curva, com os respectivos volumes e concentrações utilizados.

#### 4.1.2.6 Análise por cromatografia a líquido acoplada a espectrometria de massas.

A análise cromatográfica por LC-MS/MS foi realizada em um cromatógrafo a líquido equipado com coluna fenila acoplado a um analisador de massas híbrido quadrupolo-tempo-de-voo (Q-ToF-MS). Foi utilizado metodologia adaptada de artigo publicado por Wang e colaboradores, que está descrita na Tabela 2.<sup>19</sup> Soluções padrões individuais dos hormônios foram injetadas em infusão direta para otimização os parâmetros instrumentais. Foi utilizado

massa exata para identificação dos compostos e área do pico no cromatograma para quantificação com calibração externa utilizando curva analítica preparada a partir dos padrões dos hormônios.

#### 4.1.2.7 Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) é definido como o menor valor de concentração que pode ser detectado pelo método.<sup>21</sup> Uma vez que a técnica de cromatografia apresenta ruído na linha de base, o LD e o LQ podem ser calculados através da relação sinal/ruído (S/N), que é definida como duas vezes a altura de um pico cromatográfico dividido pela altura do ruído da linha de base. O LD é definido como a menor concentração com relação S/N 3:1 enquanto o LQ é definido pela menor concentração com relação S/N de 10:1.<sup>22</sup> Foram utilizados os valores de S/N fornecidos pelo equipamento.

Figura 8 – Fluxograma da preparação da curva analítica para GC-MS.

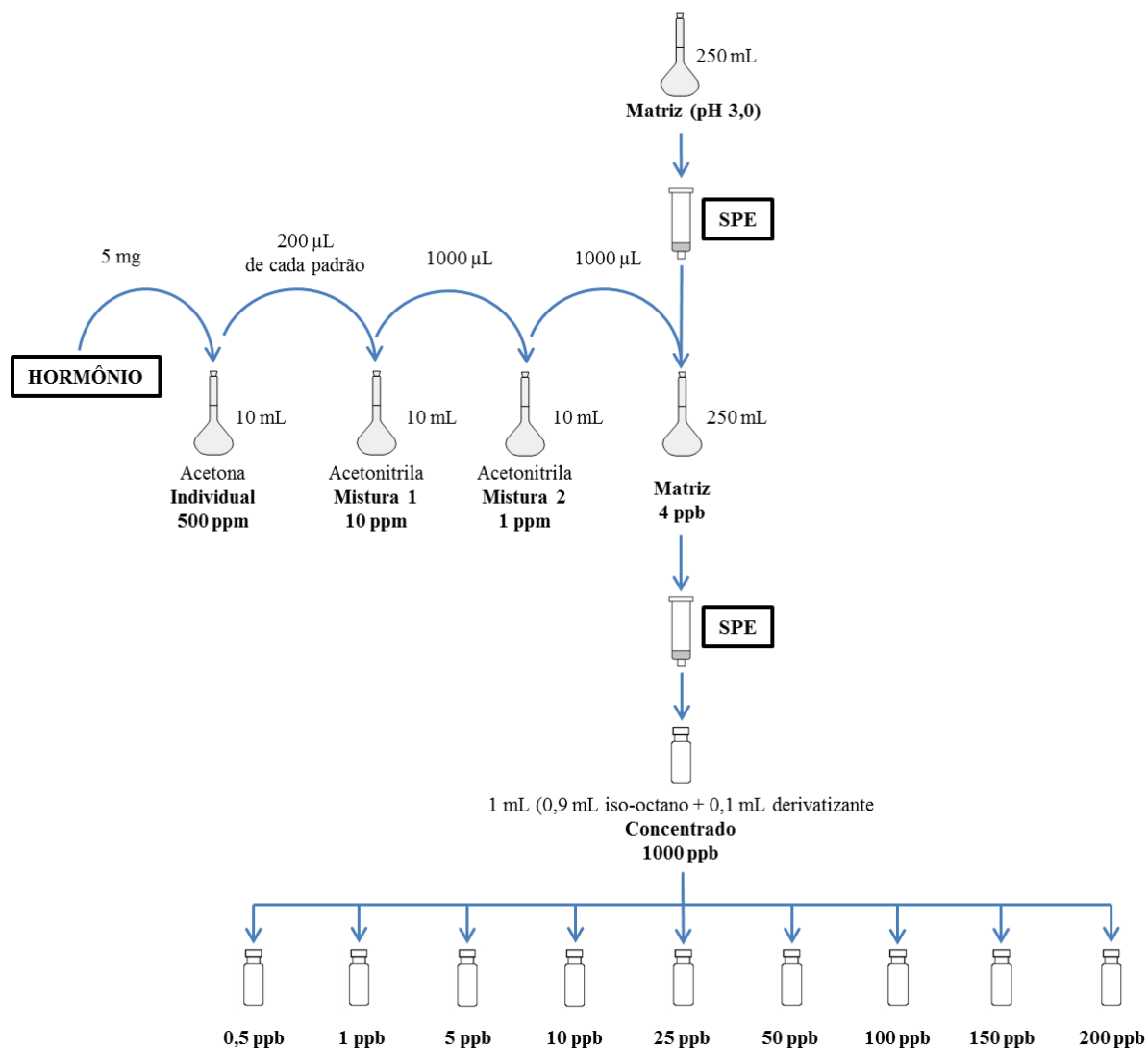


Tabela 2 – Condições de análise LC-MS/MS.

<b>LC</b>	<b>Coluna</b>	Fenila (150 mm x 2,1 mm, 1,7 $\mu$ m)
	<b>Modo de ionização</b>	ESI (-)
	<b>Fluxo</b>	700 $\mu$ L min <sup>-1</sup>
	<b>Solvente A</b>	Água
	<b>Solvente B</b>	Acetonitrila
	<b>Gradiente</b>	5% B (0,1 min) - 30% B (5 min) - 40% (6 min) - 55% B (9 min) - 95% B (10 min) - 5% B (10,5 min) - 5% B (12 min)
	<b>Temperatura coluna</b>	40 °C
<b>MS/MS</b>	<b>Gás de nebulização</b>	Nitrogênio
	<b>Temperatura de nebulização</b>	450 °C
	<b>Temperatura de fonte</b>	120 °C
	<b>Voltagem do capilar</b>	2,8 kV
	<b>Energia de colisão</b>	18 a 50 eV
	<b>Faixa m/z</b>	50 - 600

#### 4.1.2.8 Cálculo da atividade estrogênica

Uma vez que estrógenos existem no ambiente em combinação e agem aditivamente para induzir efeitos biológicos similares, é apropriado que um “equivalente tóxico” adequado seja incorporado em qualquer avaliação de riscos. Este é apresentado como equivalente estradiol (EEQ) em ng L<sup>-1</sup>, calculado baseado na comparação de sua atividade estrogênica como  $([EE2]/0,1 + [E2]/1 + [E1]/3)$  com uma concentração prevista de nenhum efeito de 1 ng L<sup>-1</sup>. Para determinar os risco para populações de peixes selvagens, pode-se mapear potenciais “hot spots” para concentração de estrógenos, categorizando como “sem risco” (EEQ < 1 ng L<sup>-1</sup>), “em risco” (EEQ 1-10 ng L<sup>-1</sup>) e “alto risco” (EEQ > 10 ng L<sup>-1</sup>), baseado no seu EEQ<sup>20</sup>.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CROMATOGRAFIA A GÁS ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (GC-MS)

#### 5.1.1 Método SIM

A partir da análise SCAN dos padrões de hormônios derivatizados conforme o item 4.1.2.3 foram obtidos os espectros de massa de cada analito, que estão apresentados no Apêndice G. O hormônio drospirenona não foi detectável por GC-MS com o método utilizado, sendo descartado das etapas seguintes. A partir destes espectros foram escolhidos os pares de íons a serem utilizados no modo SIM para quantificação. Foram escolhidos os dois íons mais intensos de cada composto, exceto quando um dos mais intensos é um fragmento em comum em mais de um analito, sendo escolhido o próximo fragmento, portanto, para evitar interferências. A partir da análise no modo SCAN obteve-se também os tempos de retenção de cada analito. Com estes dados foi gerado o método de análise SIM, com janelas de registro de íons de acordo com o composto que deve aparecer neste espaço de tempo, conforme apresentado na Tabela 3. Este método foi utilizado na análise das amostras reais e da curva de calibração.

Tabela 3 – Método SIM para análise quantitativa de hormônios.

<b>Tempo de retenção (min)</b>	<b>Hormônio alvo (derivatizado)</b>	<b>Fragmento 1 (m/z)</b>	<b>Fragmento 2 (m/z)</b>
16,50 – 17,75	Estrona	342	257
17,76 – 19,99	Alopregnanolona	300	215
17,76 – 19,99	β-Estradiol	416	129
20,00 – 21,70	17α-Etinilestradiol	425	196
21,71 – 22,99	Gestodeno	327	454
21,71 – 22,99	Progesterona	124	314
23,00 – 24,50	Estriol	311	504

Cada ponto foi analisado por GC-MS utilizando as condições descritas no item 4.1.2.4 e o método SIM obtido no item 5.1.1. A partir das áreas integradas de cada pico foram

construídas as curvas analíticas de cada hormônio por regressão linear, apresentadas no Apêndice H. A Tabela 4 apresenta a equação da reta, o coeficiente de determinação, a faixa de linearidade e o limite de detecção e quantificação para cada analito.

Tabela 4 – Dados da curva analítica.

Hormônio	Equação da reta	Faixa linear (ng mL <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	LD (ng mL <sup>-1</sup> )	LQ (ng mL <sup>-1</sup> )
Estrona	$y = 31,2551x + 101,5102$	5 a 50	0,9955	5	25
β-Estradiol	$y = 55,91939x - 124,8112$	5 a 50	0,9986	5	25
17α-Etinilestradiol	$y = 17,61224x - 64,34694$	10 a 50	0,9873	25	50
Estriol	$y = 25,72143x - 71,35714$	5 a 50	0,9982	5	25
Progesterona	$y = 8,883729x + 75,82203$	25 a 150	0,9681	10	50
Alopregnanolona	$y = 20,07456x - 137,5736$	10 a 100	0,9997	25	25
Gestodeno	$y = 10,535x - 696,75$	100 a 200	0,9982	100	150

### 5.1.2 Análise de amostras aquosas ambientais

As amostras de água superficial coletadas foram analisadas com o mesmo procedimento de GC-MS utilizado para a construção da curva analítica. Os resultados obtidos estão apresentados no Apêndice D para amostras obtidas em seis pontos de coleta no Arroio Dilúvio, enquanto o Apêndice E apresenta os resultados para o Rio dos Sinos e Rio Gravataí.

Com os valores de concentração apresentados no Apêndice D foi realizado o cálculo do equivalente estradiol (EEQ) para avaliação do risco ambiental apresentado por estes hormônios, conforme item 4.1.2.8. O Apêndice F apresenta os valores de EEQ para os seis pontos monitorados no Arroio Dilúvio. Segundo a classificação apresentada no item 4.1.2.8 todos os pontos monitorados estão sob “alto risco”, oferecendo riscos à populações de vida aquática. A Tabela 5 apresenta o EEQ médio e a porcentagem de ocorrência de cada rio, onde verifica-se que o efeito estrogênico apresentado por estes se deve exclusivamente ao hormônio natural estrona, indicando, portanto e em conjunto com o hormônio também natural estriol, elevada taxa de despejo de esgoto doméstico não tratado. Como 96% das amostras de

monitoramento ao longo de um ano do Arroio Dilúvio apresentaram o hormônio estrona e 85% apresentaram o hormônio estriol, é evidenciado que o problema de contaminação neste corpo aquático é constante e não eventual.

Tabela 5 – EEQ médio e porcentagem de ocorrência nos rios monitorados.

	<b>Arroio Dilúvio</b>	<b>Rio dos Sinos</b>	<b>Rio Gravataí</b>
<b>EEQ médio (ng L<sup>-1</sup>)</b>	47,5	-	-
<b>% de ocorrência</b>	Estrona = 95,83 Estriol = 85,42	-	-

## 5.2 CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (LC-MS/MS)

Não foram obtidos resultados pela análise de hormônios em LC-MS/MS utilizando cromatógrafo e analisador Q-ToF pelo método descrito no item 4.1.2.6. A provável causa é a degradação da solução com padrões de hormônios utilizada. Assim, foram considerados os artigos publicados sobre determinação de hormônios em amostras ambientais aquosas resumidos no Apêndice C, onde a vasta quantidade de artigos com limites de detecção na ordem de ng L<sup>-1</sup> demonstra que a técnica é considerada eficaz para esta análise.

## 5.3 VIABILIDADE ECONÔMICA E AMBIENTAL

### 5.3.1 Custo de mão de obra

O manuseio adequado de instrumentos de cromatografia a gás acoplado a espectrometria de massas com quadrupolo como analisador requer que o operador seja, pelo menos, formado em curso técnico de química para não apenas operar o equipamento, mas também para interpretação dos resultados e aplicação de conceitos de química analítica como curva de calibração, diluição entre outros. Assim, a hora de serviço de um técnico em química foi atribuída em conjunto ao cálculo de estimativa de custo da análise por GC-MS discutida no item 5.3.2. Entretanto, no caso da cromatografia a líquido acoplada a espectrometria com diferentes tipos de analisadores de massas mais complexos e de tecnologia mais recente

(triplo-quadrupolo, íon *trap*, tempo-de-voo e híbridos), se faz essencial que o operador disponha de conhecimento avançado de espectrometria de massas para a interpretação correta dos resultados e manuseio adequado do equipamento. Esse conhecimento é adquirido pelo operador durante meses de treinamento direto no equipamento de utilização, além de ser fundamental uma base aprofundada no conhecimento da química. Portanto, a operação de um equipamento LC-MS/MS requer um bacharel em química ou química industrial formado, com treinamento em espectrometria de massas e com curso de pós-graduação, completo ou em andamento. Assim, a hora de serviço de um químico foi atribuída em conjunto ao cálculo de estimativa de custo de análise por LC-MS/MS, discutida no item 5.3.2.

### **5.3.2 Custo por análise**

O custo por análise foi estimado a partir das quantidades de reagentes e consumíveis individuais utilizados mais mão de obra necessária. A Tabela 6 apresenta o custo de cada item utilizado no cálculo do custo de análises. A Tabela 7 e a Tabela 8 apresentam os custos estimados de cada análise para GC-MS e LC-MS/MS respectivamente, onde pode-se observar que o custo de uma análise GC-MS em triplicata e com curva de seis pontos é estimado em R\$ 450,26, enquanto que uma análise LC-MS/MS em triplicata e com curva de seis pontos é estimada em R\$ 598,93.

Utilizando-se estes custos estimados por análise, foi calculado o quanto foi gasto no monitoramento ambiental de um ano com coleta trimestral descrito no item 5.1.2. Foi realizado o preparo de amostra e a análise por GC-MS em 64 amostras (quatro coletas em oito pontos e análise em duplicada), totalizando um custo estimado de R\$ 2225,20 para este monitoramento no período determinado, levando-se em conta apenas o uso de reagentes e consumíveis. Somando-se o valor de mão de obra, o custo tem acréscimo de R\$ 549,35, tomando-se um dia de trabalho de oito horas para cada mês de coleta para a execução da análise, totalizando, por tanto, R\$ 2774,55 como custo da execução do monitoramento realizado neste projeto tecnológico.

### **5.3.3 Custo de instrumentação**

O custo de instrumentação foi estimado considerando o custo de aquisição de cada equipamento e o custo de consumíveis de longa duração, como coluna cromatográfica. Foram



atribuídos ao custo de instrumentação todos os equipamentos utilizados na análise, desde o preparo de amostra até a análise cromatográfica. A Tabela 9 apresenta o custo estimado para instrumentação para análise por GC-MS, enquanto a Tabela 10 apresenta o análogo para LC-MS/MS, tendo sido utilizado como referência o custo de um analisador Q-ToF-MS pois este é o instrumento disponível no local onde este estudo foi conduzido e o preço é semelhante a um analisador MS/MS triplo-quadrupolo. O custo de instrumentação para equipar um laboratório com GC-MS é estimado em R\$ 119.125,56, cerca de 14% do que o necessário para equipar um laboratório com LC-MS/MS, R\$ 839.622,38, devido à tecnologia mais avançada e complexa utilizada por esta técnica.

#### **5.3.4 Impacto ambiental**

A técnica de GC-MS em uma análise de hormônios pelo método utilizado em triplicata gera aproximadamente 3 mL de resíduo líquido de amostras, composto de 2,7 mL de iso-octano e de derivatizante e hormônios derivatizados dissolvidos, além de mais 750 mL de água superficial acidificada em pH 3,0 e três cartuchos HLB descartados. A técnica GC-MS utiliza hélio como gás de arraste, e por ser um gás inerte e não-tóxico não apresenta riscos de contaminação no seu uso. Assim, estima-se que para acumulação de 1 L de resíduo orgânico por análise de hormônios através de GC-MS serão necessárias 330 análises. A água acidificada requer apenas neutralização para descarte, enquanto os cartuchos são destinados a aterro sanitário como resíduo sólido químico.

A técnica LC-MS/MS na análise de hormônios em triplicata gera 3 mL de resíduo líquido de amostras, composto de 3 mL de mistura acetonitrila e água e de hormônios em sua forma nativa dissolvidos, além de mais 750 mL de água superficial acidificada em pH 3,0. Assim, estima-se que para acumulação de 1 L de resíduo líquido por análise de hormônios através de LC-MS serão necessárias 330 análises.

Desta forma, a análise por LC-MS/MS e por GC-MS apresentam o mesmo impacto ambiental, sem que nenhuma vantagem perceptível em termos de geração de resíduos seja observada.

Tabela 6 – Valores dos itens utilizados na estimativa de custo de análises.

Item	Preço (R\$)	Qtde.	Unidade
HCl p.a. <sup>23</sup>	201,00	500	mL
Água Milli-Q <sup>24</sup>	358,00	1000	mL
Metanol HPLC <sup>25</sup>	357,00	2000	mL
Acetato de etila HPLC <sup>26</sup>	534,00	2500	mL
Iso-octano HPLC <sup>27</sup>	571,00	2500	mL
MTSFA ativado III <sup>28</sup>	1336,00	10	mL
Cartucho HLB <sup>29</sup>	366,00	30	unidade
Vial com tampa e septo <sup>30</sup>	189,00	100	unidade
Nitrogenio 5.0	500,00	8	m <sup>3</sup>
Acetonitrila LC-MS <sup>31</sup>	247,00	1000	mL
Técnico Químico <sup>32</sup>	2746,74	160	h
Químico <sup>33</sup>	7964,50	160	h

Tabela 7 – Estudo de custo de análise de hormônios por GC-MS.

Reagente	Qtde./ análise	Unidade	GC-MS		
			Custo/ análise (R\$)	Custo/ triplicata (R\$)	Custo/Curva 6 pontos (R\$)
HCl p.a.	0,04	mL	0,02	0,05	0,10
Água ultrapura	10	mL	3,58	10,74	21,48
Metanol HPLC	5	mL	0,89	2,68	5,36
Acetato de etila HPLC	10	mL	2,14	6,41	12,82
Iso-octano HPLC	0,9	mL	0,21	0,62	1,23
MTSFA ativado III	0,1	mL	13,36	40,08	80,16
Cartucho HLB	1	unidade	12,20	36,60	73,20
Vial com tampa e septo	1	unidade	1,89	5,67	11,34
Nitrogênio 5.0	0,008	m <sup>3</sup>	0,49	1,46	2,93
Técnico Químico	8	h	137,34	-	-
<b>TOTAL</b>			172,11	104,31	208,61

Tabela 8 – Estudo de custo de análise de hormônios por LC-MS/MS.

LC-MS/MS					
Reagente	Qtde./ análise	Unidade	Custo/ análise (R\$)	Custo/ triplicata (R\$)	Custo/Curva 6 pontos (R\$)
HCl p.a.	0,04	mL	0,02	0,05	0,10
Água Milli-Q	10	mL	3,58	10,74	21,48
Metanol HPLC	5	mL	0,89	2,68	5,36
Acetato de etila HPLC	10	mL	2,14	6,41	12,82
Cartucho HLB	1	unidade	12,20	36,60	73,20
Vial com tampa e septo	1	unidade	1,89	5,67	11,34
Nitrogenio 5.0	0,008	m <sup>3</sup>	0,49	1,46	2,93
Acetonitrila LC-MS	0,5	mL	0,12	0,37	0,74
Água Milli-Q (Fase móvel)	1,5	mL	0,60	1,81	3,62
Solvente (Fase móvel)	1,5	mL	0,37	1,11	2,22
Químico	8	h	398,23	-	-
<b>TOTAL</b>			420,53	66,90	133,80

Tabela 9 – Estudo de custo de instrumentação de um laboratório para GC-MS.

GC-MS		
Item	Custo (R\$)	Qtde.
Coluna	4916,60	1
Bomba de vácuo	5000,00	1
Amostrador automático	19980,00	1
Injetor automático	19980,00	1
Espectrômetro de massas (quadrupolo)	22750,00	1
Cromatógrafo a gás	27000,00	1
Hélio	2380,00	8.5 m <sup>3</sup>
Tubulação para gás	5000,00	1
Balança analítica (0,0001 g)	1290,00	1
Concentrador de amostras	7142,96	1
<i>Manifold</i> para SPE	2670,00	1
Agitador <i>vortex</i>	1016,00	1
<b>Total</b>	119125,56	

Tabela 10 – Estudo de custo de instrumentação de um laboratório para LC-MS/MS.

LC-MS/MS		
Item	Custo (R\$)	Qtde.
Coluna	5000	1
LC	118413,61	1
Espectrômetro de massas (Q-ToF)	704089,81	1
Concentrador de amostra	7142,96	1
<i>Manifold</i> para SPE	2670,00	1
Balança analítica (0,0001 g)	1290,00	1
Agitador <i>vortex</i>	1016,00	1
<b>Total</b>	<b>839622,38</b>	

## 6 CONCLUSÃO

Conclui-se com este projeto tecnológico que a análise dos hormônios esteroidais estrona,  $\beta$ -estradiol,  $17\alpha$ -etinilestradiol, estriol, alopregnanolona, drospirenona, gestodeno e progesterona em amostras de água superficial pode ser executada tanto por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) quanto por cromatografia a líquido acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS), pois ambas demonstram a sensibilidade para alcançar limites de detecção na ordem de  $\text{ng L}^{-1}$ , necessários para análise de traços em matrizes aquosas ambientais complexas.

Para as análises ambientais realizadas, verificou-se que o Arroio Dilúvio recebe dejetos de esgoto *in natura*, que pode ser comprovado pela presença dos hormônios endógenos (estrona e estriol) com porcentagem de ocorrência de 96% e 85% respectivamente, e os níveis de concentração encontrados devem ser considerados preocupantes pois o EEQ calculado indica “alto risco”. Nos Rios Gravataí e dos Sinos, todos os hormônios não foram detectados, indicando maior diluição com concentrações abaixo dos limites de detecção do método utilizado.

Comparando-se a viabilidade econômica de cada técnica, GC-MS é menos custosa que LC-MS/MS, custando cerca de 25% menos que LC-MS/MS (R\$ 450,26 para GC-MS contra

R\$ 598,93 para LC-MS/MS) para a realização de uma análise em triplicata de amostra real com utilização de uma curva de calibração externa de seis pontos. A grande diferença entre as duas técnicas se deve principalmente ao fato de que LC-MS/MS requer operador mais capacitado do que GC-MS, devido ao alto grau de exigência de conhecimento de espectrometria de massas e química analítica instrumental. Além disso, o custo de instrumentação de um laboratório para realização desta análise por GC-MS é de aproximadamente R\$ 119.125,56, enquanto LC-MS/MS custa R\$ 839.622,38, sendo a maior fração deste custo devido ao valor econômico elevado do espectrômetro de massas Q-ToF, utilizado como referência comparativa ao valor de um triplo-quadrupolo geralmente utilizado para determinação de hormônios, de tecnologia mais avançada e complexa que o quadrupolo da GC-MS.

Em termos de impacto ambiental, GC-MS e LC-MS/MS geram a mesma quantidade de resíduo líquido, embora a GC-MS utilize um gás inerte como gás de araste, o hélio, frente ao uso de solventes orgânicos como fase móvel na LC-MS/MS.

Portanto, conclui-se que a cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas é mais vantajosa em termos econômicos e ambientais para a análise de hormônios esteroidais em matrizes aquosas ambientais, pois obtém resultados satisfatórios com menos custos e menor impacto ambiental. Entretanto esta vantagem é aplicável apenas à análise de hormônios esteroidais sozinhos na amostra, pois a GC-MS requer derivatização para resultados adequados, enquanto LC-MS/MS demonstra ser uma técnica mais ampla, capaz de determinar com exatidão vários compostos ao mesmo tempo, mesmo sem disponibilidade de padrões, o que em análise de contaminantes emergentes no meio ambiente é de extrema necessidade e importância.

## 7 REFERÊNCIAS

1. Naidu, R., Arias Espana, V. A., Liu, Y. & Jit, J. Emerging contaminants in the environment: Risk-based analysis for better management. *Chemosphere* **154**, 350–357 (2016).
2. Taylor, D. & Senac, T. Human pharmaceutical products in the environment - The ‘problem’ in perspective. *Chemosphere* **115**, 95–99 (2014).
3. Barbosa, M. O., Moreira, N. F. F., Ribeiro, A. R., Pereira, M. F. R. & Silva, A. M. T.

- Occurrence and removal of organic micropollutants: An overview of the watch list of EU Decision 2015/495. *Water Res.* **94**, 257–279 (2016).
4. Noguera-Oviedo, K. & Aga, D. S. Lessons learned from more than two decades of research on emerging contaminants in the environment. *J. Hazard. Mater.* **316**, 242–251 (2016).
  5. Silva, C. P., Otero, M. & Esteves, V. Processes for the elimination of estrogenic steroid hormones from water: A review. *Environ. Pollut.* **165**, 38–58 (2012).
  6. Conley, J. M. *et al.* Comparison of in vitro estrogenic activity and estrogen concentrations in source and treated waters from 25 U.S. drinking water treatment plants. *Sci. Total Environ.* **579**, 1610–1617 (2017).
  7. Limpiyakorn, T., Homklin, S. & Ong, S. K. Fate of estrogens and estrogenic potentials in sewerage systems. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **41**, 1231–1270 (2011).
  8. Adeel, M., Song, X., Wang, Y., Francis, D. & Yang, Y. Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: A critical review. *Environ. Int.* **99**, 107–119 (2017).
  9. Puckowski, A. *et al.* Bioaccumulation and analytics of pharmaceutical residues in the environment: A review. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **127**, 232–255 (2016).
  10. Rivera-Utrilla, J., Sánchez-Polo, M., Ferro-García, M. Á., Prados-Joya, G. & Ocampo-Pérez, R. Pharmaceuticals as emerging contaminants and their removal from water. A review. *Chemosphere* **93**, 1268–1287 (2013).
  11. Fayad, P. B., Prévost, M. & Sauvé, S. On-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry optimized for the analysis of steroid hormones in urban wastewaters. *Talanta* **115**, 349–360 (2013).
  12. Fang, T. Y. *et al.* Analytical techniques for steroid estrogens in water samples - A review. *Chemosphere* **165**, 358–368 (2016).
  13. Kumirska, J. *et al.* Chemometric optimization of derivatization reactions prior to gas chromatography-mass spectrometry analysis. *J. Chromatogr. A* **1296**, 164–178 (2013).
  14. Zaikin, V. & Halket, J. M. *A handbook of derivatives for mass spectrometry*. (IM Publications, 2009).
  15. Dallegrave, A. **Determinação de hormônios estrógenos e progestágenos em amostras ambientais por GC-MS**. 2012. 96 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.
  16. Caban, M. *et al.* A new silylation reagent dimethyl(3,3,3-trifluoropropyl)silyldiethylamine for the analysis of estrogenic compounds by gas

- chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1301**, 215–224 (2013).
17. Quintana, J. B. *et al.* Determination of natural and synthetic estrogens in water by gas chromatography with mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* **1024**, 177–185 (2004).
  18. Karapinar, I., Ertaş, F. N., Şahintürk, B., Aftafa, C. & Kiliç, E. LC-MS/MS signal enhancement for estrogenic hormones in water samples using experimental design. *RSC Adv.* **6**, 39188–39197 (2016).
  19. Wang, H. X., Zhou, Y. & Jiang, Q. W. Simultaneous screening of estrogens, progestogens, and phenols and their metabolites in potable water and river water by ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Microchem. J.* **100**, 83–94 (2012).
  20. Green, C. *et al.* Modeling of steroid estrogen contamination in UK and South Australian rivers predicts modest increases in concentrations in the future. *Environ. Sci. Technol.* **47**, 7224–7232 (2013).
  21. INMETRO. ORIENTAÇÃO SOBRE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS - DOQ-CGCRE-008. 20 (2011).
  22. Shrivastava, A. & Gupta, V. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles Young Sci.* **2**, 21 (2011).
  23. SIGMA-ALDRICH. Hydrochloric acid, 37% . Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigald/258148?lang=pt&region=BR>. Acesso em: 12 de setembro de 2017.
  24. SIGMA-ALDRICH. Water for UHPLC, for mass spectrometry | . Disponível em: [https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/900682?lang=pt&region=BR&cm\\_sp=Insite\\_-\\_prodRecCold\\_xviews\\_-\\_prodRecCold10-8](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/900682?lang=pt&region=BR&cm_sp=Insite_-_prodRecCold_xviews_-_prodRecCold10-8). Acesso em: 12 de setembro de 2017.
  25. SIGMA-ALDRICH. Methanol, for HPLC . Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigald/34860?lang=pt&region=BR>. Acesso em: 12 de setembro de 2017.
  26. SIGMA-ALDRICH. Ethyl acetate, for HPLC. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigald/34858?lang=pt&region=BR>. Acesso em: 12 de setembro de 2017.
  27. SIGMA-ALDRICH. 2,2,4-Trimethylpentane, for HPLC. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigald/34862?lang=pt&region=BR>. Acesso em: 12 de setembro de 2017.

28. SIGMA-ALDRICH. N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide activated III for GC derivatization, activated with imidazole. Disponível em:  
<<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/12124?lang=pt&region=BR>>.  
Acesso em: 12 de setembro de 2017.
29. SIGMA-ALDRICH. Supel<sup>TM</sup>-Select HLB SPE Tube bed wt. 200 mg, volume 6 mL. Disponível em:  
<<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/supelco/54183u?lang=pt&region=BR>>.  
Acesso em: 12 de setembro de 2017.
30. SIGMA-ALDRICH. Certified screw thread vials. Disponível em:  
<[https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/supelco/29371u?lang=pt&region=BR&cm\\_sp=Insite-\\_-prodRecCold\\_xorders-\\_-prodRecCold2-1](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/supelco/29371u?lang=pt&region=BR&cm_sp=Insite-_-prodRecCold_xorders-_-prodRecCold2-1)>.  
Acesso em: 12 de setembro de 2017.
31. SIGMA-ALDRICH. Acetonitrile Acetonitrile hypergrade for LC-MS. Disponível em:  
<<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/mm/100029?lang=pt&region=BR>>.  
Acesso em: 12 de setembro de 2017.
32. SINE. Média Salarial de Técnico Químico no Brasil. Disponível em:  
<<https://www.sine.com.br/media-salarial-para-tecnico-quimico>>.  
Acesso em: 12 de setembro de 2017.
33. Sindicato dos Químicos e Engenheiros Químicos do Rio de Janeiro. Disponível em:  
<<http://sqeqrj.org/tabela-salarial/>>.  
Acesso em: 12 de setembro de 2017.
34. Zhang, K. & Fent, K. Determination of two progestin metabolites (17 $\alpha$ -hydroxypregnanolone and pregnanediol) and different classes of steroids (androgens, estrogens, corticosteroids, progestins) in rivers and wastewaters by high-performance liquid chromatography-tandem mass spe. *Sci. Total Environ.* **610–611**, 1164–1172 (2018).
35. Čelić, M., Insa, S., Škrbić, B. & Petrović, M. Development of a sensitive and robust online dual column liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the analysis of natural and synthetic estrogens and their conjugates in river water and wastewater. *Anal. Bioanal. Chem.* **409**, 5427–5440 (2017).
36. Goh, S. X. L. & Lee, H. K. An alternative perspective of hollow fiber-mediated extraction: Bundled hollow fiber array-liquid-phase microextraction with sonication-assisted desorption and liquid chromatography-tandem mass spectrometry for determination of estrogens in aqueous matrix. *J. Chromatogr. A* **1488**, 26–36 (2017).
37. Goh, S. X. L., Duarah, A., Zhang, L., Snyder, S. A. & Lee, H. K. Online solid phase



- extraction with liquid chromatography–tandem mass spectrometry for determination of estrogens and glucocorticoids in water. *J. Chromatogr. A* **1465**, 9–19 (2016).
38. Torres, N. H. *et al.* Detection of hormones in surface and drinking water in Brazil by LC-ESI-MS/MS and ecotoxicological assessment with *Daphnia magna*. *Environ. Monit. Assess.* **187**, (2015).
  39. Backe, W. J. An Ultrasensitive (Parts-Per-Quadrillion) and SPE-Free Method for the Quantitative Analysis of Estrogens in Surface Water. *Environ. Sci. Technol.* **49**, 14311–14318 (2015).
  40. Socas-Rodríguez, B., Hernández-Borges, J., Salazar, P., Martín, M. & Rodríguez-Delgado, M. Á. Core-shell polydopamine magnetic nanoparticles as sorbent in micro-dispersive solid-phase extraction for the determination of estrogenic compounds in water samples prior to high-performance liquid chromatography-mass spectrometry analysis. *J. Chromatogr. A* **1397**, 1–10 (2015).
  41. You, L. *et al.* Investigation of pharmaceuticals, personal care products and endocrine disrupting chemicals in a tropical urban catchment and the influence of environmental factors. *Sci. Total Environ.* **536**, 955–963 (2015).
  42. Martín, J., Santos, J. L., Aparicio, I. & Alonso, E. Determination of hormones, a plasticizer, preservatives, perfluoroalkylated compounds, and a flame retardant in water samples by ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction based on the solidification of a floating organic drop. *Talanta* **143**, 335–343 (2015).
  43. Kozłowska-Tylingo, K., Namieśnik, J. & Górecki, T. Determination of estrogenic endocrine disruptors in environmental samples—a review of chromatographic methods. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **40**, 194–201 (2010).
  44. Aftafa, C. *et al.* Ionic liquid intercalated clay sorbents for micro solid phase extraction of steroid hormones from water samples with analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1361**, 43–52 (2014).
  45. Iparraguirre, A. *et al.* Matrix effect during the membrane-assisted solvent extraction coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry for the determination of a variety of endocrine disrupting compounds in wastewater. *J. Chromatogr. A* **1356**, 163–170 (2014).
  46. Matějčíček, D., Vlček, J., Burešová, A. & Pelcová, P. Online molecularly imprinted solid-phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of hormones in water and sediment samples. *J. Sep. Sci.* **36**, 1509–1515 (2013).

47. Guedes-Alonso, R., Sosa-Ferrera, Z. & Juan Santana-Rodriguez, J. Simultaneous Determination of Hormonal Residues in Treated Waters Using Ultrahigh Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J. Anal. Methods Chem.* **2013**, (2013).
48. Ciofi, L. *et al.* Fully-automated on-line solid phase extraction coupled to high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric analysis at sub-ng/L levels of selected estrogens in surface water and wastewater. *J. Chromatogr. A* **1283**, 53–61 (2013).
49. Guo, F. *et al.* Simultaneous determination of five estrogens and four androgens in water samples by online solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1281**, 9–18 (2013).
50. Chen, B., Huang, Y., He, M. & Hu, B. Hollow fiber liquid-liquid-liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography-ultraviolet detection for the determination of various environmental estrogens in environmental and biological samples. *J. Chromatogr. A* **1305**, 17–26 (2013).
51. Jardim, W. F. *et al.* An integrated approach to evaluate emerging contaminants in drinking water. *Sep. Purif. Technol.* **84**, 3–8 (2012).
52. Komesli, O. T., Bakirdere, S., Bayören, C. & Gökçay, C. F. Simultaneous determination of selected endocrine disrupter compounds in wastewater samples in ultra trace levels using HPLC-ES-MS/MS. *Environ. Monit. Assess.* **184**, 5215–5224 (2012).
53. Chen, W. L., Wang, G. S., Gwo, J. C. & Chen, C. Y. Ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry determination of feminizing chemicals in river water, sediment and tissue pretreated using disk-type solid-phase extraction and matrix solid-phase dispersion. *Talanta* **89**, 237–245 (2012).
54. Wang, C. & Gardinali, P. R. Comparison of multiple API techniques for the simultaneous detection of microconstituents in water by on-line SPE-LC-MS/MS. *J. Mass Spectrom.* **47**, 1255–1268 (2012).
55. Luo, X., Li, G. & Hu, Y. In-tube solid-phase microextraction based on NH<sub>2</sub>-MIL-53(Al)-polymer monolithic column for online coupling with high-performance liquid chromatography for directly sensitive analysis of estrogens in human urine. *Talanta* **165**, 377–383 (2017).
56. de Amorim, K. P. & Andrade, L. S. Development and application of a cloud point method for the extraction of natural estrogens E1 and E2 from urine samples and their

- simultaneous determination by HPLC-EC using a BDD electrode. *Anal. Methods* **9**, 1627–1633 (2017).
57. Liao, K., Mei, M., Li, H., Huang, X. & Wu, C. Multiple monolithic fiber solid-phase microextraction based on a polymeric ionic liquid with high-performance liquid chromatography for the determination of steroid sex hormones in water and urine. *J. Sep. Sci.* **39**, 566–575 (2016).
  58. Moon, Y.-J. & Myung, S.-W. Determination of Estrogens in Environmental Aqueous Samples Using Dispersive Liquid-Liquid Microextraction and HPLC/UV-Vis System. *Bull. Korean Chem. Soc.* **37**, 2009–2014 (2016).
  59. Wang, P., Xiao, Y., Liu, W., Wang, J. & Yang, Y. Vortex-assisted hollow fibre liquid-phase microextraction technique combined with high performance liquid chromatography-diode array detection for the determination of oestrogens in milk samples. *Food Chem.* **172**, 385–390 (2015).
  60. Almeida, C. & Nogueira, J. M. F. Determination of steroid sex hormones in real matrices by bar adsorptive microextraction (BA $\mu$ E). *Talanta* **136**, 145–154 (2015).
  61. Pérez, R. L. & Escandar, G. M. Multivariate calibration-assisted high-performance liquid chromatography with dual UV and fluorimetric detection for the analysis of natural and synthetic sex hormones in environmental waters and sediments. *Environ. Pollut.* **209**, 114–122 (2015).
  62. Jiang, Y., Tang, T., Cao, Z., Shi, G. & Zhou, T. Determination of three estrogens and bisphenol A by functional ionic liquid dispersive liquid-phase microextraction coupled with ultra-high performance liquid chromatography and ultraviolet detection. *J. Sep. Sci.* **38**, 2158–2166 (2015).
  63. Kozłowska-Tylingo, K., Konieczka, P., Gustaw, E., Wasik, A. & Namieśnik, J. Comparison of High Performance Liquid Chromatography Methods with Different Detectors for Determination of Steroid Hormones in Aqueous Matrices. *Anal. Lett.* **47**, 1449–1464 (2014).
  64. Zhu, H. *et al.* Extraction of natural estrogens in environmental waters by dispersive multiwalled carbon nanotube-based agitation-assisted adsorption and ultrasound-assisted desorption. *Anal. Methods* **6**, 1235 (2014).
  65. Zou, Y. *et al.* Hollow-fiber-supported liquid-phase microextraction using an ionic liquid as the extractant for the pre-concentration of bisphenol A, 17- $\beta$ -estradiol, estrone and diethylstilbestrol from water samples with HPLC detection. *Water Sci. Technol.* **69**, 1028–1035 (2014).

66. 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. *Anal. Chim. Acta* **835**, 19–28 (2014).
67. Lisboa, N. S. *et al.* A simple and sensitive UFLC-fluorescence method for endocrine disrupters determination in marine waters. *Talanta* **117**, 168–175 (2013).
68. Xiao, X., Chen, X., Xu, X. & Li, G. Co-precipitation assisted cloud point extraction coupled with high performance liquid chromatography for the determination of estrogens in water and cosmetic samples. *Anal. Methods* **5**, 6376 (2013).
69. Hu, Y., Zhang, M., Tong, C., Wu, J. & Liu, W. Enrichment of steroid hormones in water with porous and hydrophobic polymer-based SPE followed by HPLC-UV determination. *J. Sep. Sci.* **36**, 3321–3329 (2013).
70. Hu, C., He, M., Chen, B., Zhong, C. & Hu, B. Polydimethylsiloxane/metal-organic frameworks coated stir bar sorptive extraction coupled to high performance liquid chromatography-ultraviolet detector for the determination of estrogens in environmental water samples. *J. Chromatogr. A* **1310**, 21–30 (2013).
71. Sadowski, R. & Gadzała-Kopciuch, R. Isolation and determination of estrogens in water samples by solid-phase extraction using molecularly imprinted polymers and HPLC. *J. Sep. Sci.* **36**, 2299–2305 (2013).
72. Patrolecco, L. *et al.* Simultaneous determination of human pharmaceuticals in water samples by solid phase extraction and HPLC with UV-fluorescence detection. *Microchem. J.* **107**, 165–171 (2013).
73. Lima, D. L. D., Silva, C. P., Otero, M. & Esteves, V. I. Low cost methodology for estrogens monitoring in water samples using dispersive liquid-liquid microextraction and HPLC with fluorescence detection. *Talanta* **115**, 980–985 (2013).
74. Wu, C.-Q. *et al.* Determination of Estrogens in Water Samples by Ionic Liquid-Based Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Combined with High Performance Liquid Chromatography. *Anal. Lett.* **45**, 1995–2005 (2012).
75. Zou, Y. *et al.* Determination of estrogens in human urine by high-performance liquid chromatography/diode array detection with ultrasound-assisted cloud-point extraction. *Anal. Biochem.* **421**, 378–384 (2012).
76. Zhang, S. *et al.* A sensitive method for extraction and determination of endocrine-disrupting compounds from wastewater using 10-ethyl-acridone-2-sulfonyl chloride as pre-column labeling reagent by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Microchem. J.* **103**, 90–96 (2012).

77. Česen, M. & Heath, E. Disk-based solid phase extraction for the determination of diclofenac and steroidal estrogens E1, E2 and EE2 listed in the WFD watch list by GC-MS. *Sci. Total Environ.* **590–591**, 832–837 (2017).
78. Sghaier, R. B. *et al.* Simultaneous Detection of 13 Endocrine Disrupting Chemicals in Water by a Combination of SPE-BSTFA Derivatization and GC-MS in Transboundary Rivers (France-Belgium). *Water. Air. Soil Pollut.* **228**, (2017).
79. Pérez, R. A., Albero, B., Tadeo, J. L. & Sánchez-Brunete, C. Determination of endocrine-disrupting compounds in water samples by magnetic nanoparticle-assisted dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **408**, 8013–8023 (2016).
80. Albero, B., Sánchez-Brunete, C., Miguel, E. & Tadeo, J. L. Rapid determination of emerging contaminants in water and herbal infusions by in situ derivatization and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Methods* **7**, 3006–3014 (2015).
81. González, A., Avivar, J. & Cerdà, V. Estrogens determination in wastewater samples by automatic in-syringe dispersive liquid-liquid microextraction prior silylation and gas chromatography. *J. Chromatogr. A* **1413**, 1–8 (2015).
82. Melo, A., Ferreira, I. M. P. L. V. O. & Mansilha, C. Application of a fast and cost-effective in situ derivatization method prior to gas chromatography with mass spectrometry to monitor endocrine disruptors in water matrices. *J. Sep. Sci.* **38**, 1983–1989 (2015).
83. Pérez, R. A., Albero, B., Tadeo, J. L., Molero, E. & Sánchez-Brunete, C. Analysis of steroid hormones in water using palmitate-coated magnetite nanoparticles solid-phase extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Chromatographia* **77**, 837–843 (2014).
84. Gunatilake, S. R., Clark, T. L., Rodriguez, J. M. & Mlsna, T. E. Determination of five estrogens in wastewater using a comprehensive two-dimensional gas chromatograph. *Anal. Methods* **6**, 5652–5658 (2014).
85. D’Orazio, G., Asensio-Ramos, M., Hernández-Borges, J., Fanali, S. & Rodríguez-Delgado, M. Á. Estrogenic compounds determination in water samples by dispersive liquid-liquid microextraction and micellar electrokinetic chromatography coupled to mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1344**, 109–121 (2014).
86. Zuo, Y., Zhang, K. & Zhou, S. Determination of estrogenic steroids and microbial and photochemical degradation of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2) in lake surface water, a case study. *Environ. Sci. Process. Impacts* **15**, 1529 (2013).

87. Xu, X. *et al.* Determination of hormones in milk by hollow fiber-based stirring extraction bar liquid-liquid microextraction gas chromatography mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **790**, 39–46 (2013).
88. Migowska, N., Caban, M., Stepnowski, P. & Kumirska, J. Simultaneous analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs and estrogenic hormones in water and wastewater samples using gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography with electron capture detection. *Sci. Total Environ.* **441**, 77–88 (2012).
89. Azzouz, A. & Ballesteros, E. Gas chromatography-mass spectrometry determination of pharmacologically active substances in urine and blood samples by use of a continuous solid-phase extraction system and microwave-assisted derivatization. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **891–892**, 12–19 (2012).
90. Moneris, M. J. *et al.* Electrochemical immunosensor based on gold nanoparticles deposited on a conductive polymer to determine estrone in water samples. *Microchem. J.* **129**, 71–77 (2016).
91. Brocenschi, R. F., Rocha-Filho, R. C., Duran, B. & Swain, G. M. The analysis of estrogenic compounds by flow injection analysis with amperometric detection using a boron-doped diamond electrode. *Talanta* **126**, 12–19 (2014).
92. Li, P., Zhao, W., Wang, X., Shi, G. & Zhou, T. Stacking and simultaneous determination of estrogens in water samples by CE with electrochemical detection. *J. Sep. Sci.* **36**, 334–340 (2013).
93. Gan, P., Compton, R. G. & Foord, J. S. The Voltammetry and Electroanalysis of Some Estrogenic Compounds at Modified Diamond Electrodes. *Electroanalysis* **25**, 2423–2434 (2013).
94. Dharuman, V., Hahn, J. H., Jayakumar, K. & Teng, W. Electrochemically reduced graphene-gold nano particle composite on indium tin oxide for label free immuno sensing of estradiol. *Electrochim. Acta* **114**, 590–597 (2013).
95. Wang, L., Yuan, F., Chen, H. Q., Ling, B. & Xu, J. Chemiluminescence of CdTe nanocrystals catalyzed by sodium hexametaphosphate and its sensitive application for determination of estrogens. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **91**, 295–300 (2012).
96. McCulloch, R. D. & Robb, D. B. Field-Free Atmospheric Pressure Photoionization-Liquid Chromatography-Mass Spectrometry for the Analysis of Steroids within Complex Biological Matrices. *Anal. Chem.* **89**, 4169–4176 (2017).

97. Faqehi, A. M. M. *et al.* Derivatization of estrogens enhances specificity and sensitivity of analysis of human plasma and serum by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Talanta* **151**, 148–156 (2016).
98. Yi, X. *et al.* High-Sensitivity Micro LC-MS / MS Assay for Serum Estradiol without Derivatization. 14–24 (2016). doi:10.1373/jalm.2016.020362
99. Wooding, K. M. *et al.* Measurement of estradiol, estrone, and testosterone in postmenopausal human serum by isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry without derivatization. *Steroids* **96**, 89–94 (2015).
100. Ke, Y., Bertin, J., Gonthier, R., Simard, J. N. & Labrie, F. A sensitive, simple and robust LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of seven androgen- and estrogen-related steroids in postmenopausal serum. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **144**, 523–534 (2014).
101. Guedes-Alonso, R., Montesdeoca-Esponda, S., Sosa-Ferrera, Z. & Santana-Rodríguez, J. J. Liquid chromatography methodologies for the determination of steroid hormones in aquatic environmental systems. *Trends Environ. Anal. Chem.* **3**, 14–27 (2014).
102. Keski-Rahkonen, P. *et al.* LC-MS analysis of estradiol in human serum and endometrial tissue: Comparison of electrospray ionization, atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization. *J. Mass Spectrom.* **48**, 1050–1058 (2013).
103. Vega-Morales, T., Sosa-Ferrera, Z. & Santana-Rodríguez, J. J. Development and optimisation of an on-line solid phase extraction coupled to ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry methodology for the simultaneous determination of endocrine disrupting compounds in wastewater samples. *J. Chromatogr. A* **1230**, 66–76 (2012).
104. Dai, W. *et al.* Comprehensive and Highly Sensitive Urinary Steroid Hormone Profiling Method Based on Stable Isotope-Labeling Liquid Chromatography – Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **84**, 10245–10251 (2012).
105. Fiers, T. *et al.* Development of a highly sensitive method for the quantification of estrone and estradiol in serum by liquid chromatography tandem mass spectrometry without derivatization. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **893–894**, 57–62 (2012).

APÊNDICE A – RESUMO DAS PUBLICAÇÕES SOBRE DETERMINAÇÃO DE HORMÔNIOS EM AMOSTRAS AQUOSAS NOS ÚLTIMO CINCO ANOS (2012 - 2017).

	<b>Analitos</b>	<b>Matriz</b>	<b>Técnica</b>	<b>LD (ng L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Ano</b>	<b>Ref.</b>
<b>LC-MS</b>	E1, E2, E3, EE2, GES, DRS, PRO e outros	AR, EF e AF de ETE	LC-MS/MS	0,01 - 3	2017	34
	E1, E2, E3, EE2 e outros	AR, EF e AF de ETE	LC-MS/MS	0,030 - 0,063	2017	35
	E1, E2, E3, EE2	EF e AF de ETE	LC-MS/MS	0,251 - 0,440	2017	36
	E1, E2, E3, EE2	AT	LC-MS/MS	0,008 - 0,241	2016	18
	E1, E2, E3, EE2 e outros	EF e AF de ETE	LC-MS/MS	0,16 - 2,14	2016	37
	E1, E2, E3, EE2, PRO e outros	AR	LC-MS/MS	0,3 - 0,7	2015	38
	E1, E2, E3, EE2 e outros	AR	LC-MS/MS	0,030 - 0,086	2015	39
	E1, E2, EE2 e outros	AM, AT, AR	LC-MS/MS	100 - 330	2015	40
	E1, E3 e outros	AS	LC-MS/MS	0,15 - 2,5	2015	41
	E1, E2, E3, EE2 e outros	AS e AT	LC-MS/MS	53 - 1446	2015	42
	E1, E2, E3, EE2, PRO	AP, AF e EF de ETE	LC-MS/MS	0,17 - 0,32	2014	43
	E1, E2, E3, EE2	AS	LC-MS/MS	0,012 - 0,693	2014	44



	E1, E2, EE2, PRO e outros	AR	LC-MS/MS	0,4 - 100	2014	45
	E1, E2, E3, EE2 e outros	AS e SR	LC-MS/MS	0,6 - 1,3	2014	46
	E1, E2, E3, EE2 e outros	AF e EF de ETE	LC-MS/MS	0,51 - 9,35	2013	47
	E1, E2, E3, EE2	AS e AR	LC-MS/MS	0,15 - 0,95	2013	48
	E1, E2, E3, EE2, PRO e outros	AF e EF de ETE	LC-MS/MS	8 - 60	2013	11
	E1, E2, E3, EE2 e outros	AS e AF e EF de ETE	LC-MS/MS	0,1 - 2	2013	49
	E1, E2, E3, EE2 e outros	LA e SR	LC-MS/MS	50 - 200	2012	50
	E1, E2, E3, EE2 e outros	AS AP	LC-MS/MS	0,1 - 1	2012	51
	E1, PRO e outros	AF e EF de ETE	LC-MS/MS	120 - 130	2012	52
	E1, E2, E3, EE2, PRO e outros	AS e AP	LC-MS	0,28 - 0,42	2012	19
	E1, E2, E3, EE2 e outros	AS	LC-MS/MS	1,27 - 45,6	2012	53
	E1, E2, E3, EE2, PRO e outros	AR	LC-MS/MS	4,2 - 11	2012	54
<b>LC-outros detectores</b>	E1, E2, E3, EE2, PRO	Urina (humano)	LC-FLD/UV	2,0 - 40	2017	55
	E1, E2	Urina (humano)	LC-EC	53400 - 57100	2017	56

E1, E2, E3, EE2, PRO e outros	AT, AS e urina (humano)	LC-DAD	27 - 120	2016	57
E1, E2, E3, EE2	AS	LC-UV	30000 - 70000	2016	58
E1, E2 e outros	Leite	LC-DAD	60 - 170	2015	59
E1, E2, E3, EE2, PRO	AS, AR e urina	LC-DAD	50 - 100	2015	60
E1, E2, E3, EE2, PRO e outros	SR, AT, AS e Asubt	LC-DAD/FLD	6 - 16	2015	61
E1, E2, E3 e outros	AR	LC-UV	1700 - 3400	2015	62
E1, E2, E3, EE2, PRO	AP, AF e EF de ETE	LC-DAD/FLD	3,6 - 14	2014	63
E1, E2, E3	AS	LC-DAD	49 - 76	2014	64
E1, E2 e outros	AS	LC-UV	50 - 100	2014	65
E1, E2, E3, EE2	AT, AM, AS e Asubt	LC-DAD	6 - 13	2014	66
E1, E2, E3, EE2 e outros	AS	LC-FLD	2 - 23	2014	67
E1, E2, EE2 e outros	AS	LC-UV	200 - 700	2013	68
E1, E2, E3, PRO e outros	AS	LC-UV	70 - 610	2013	69
E1, E2, EE2 e outros	AS	LC-UV	280 - 350	2013	70

	E1, E2, E3	AS	LC-ED	71 - 193	2013	71
	E1, E2, EE2 e outros	AS, EF e AF de ETE	LC-UV/FLD	10 - 800	2013	72
	E2, EE2	AS e AT	LC-FLD	11 - 12	2013	73
	E1, E2, E3, EE2 e outros	AS e AR	LC-DAD/FLD	80 - 500	2012	74
	E1, E2 e outros	Urina (humano)	LC-DAD	100 - 200	2012	75
	E1, E2, E3, EE2 e outros	AS	LC-FLD	0,3 - 0,4	2012	76
<b>GC-MS</b>	E1, E2, EE2 e outros	AS	GC-MS	0.131 - 1,120	2017	77
	E1, E2, E3, EE2, PRO e outros	AR	GC-MS	1,66 - 3,33	2017	78
	E1, EE2 e outros	AT, AP e AR	GC-MS/MS	69 - 180	2016	79
	E1, E2, PRO e outros	AS e AP	GC-MS/MS	30	2016	80
	E1, E2, E3, EE2	AF e EF de ETE	GC-MS	11 - 82	2015	81
	E1, E2, EE2 e outros	AS, AM, AT e Asubt	GC-MS	3 - 5	2015	82
	E1, PRO e outros	AS, AT e Asubt	GC-MS/MS	4 - 8	2014	83
	E1, E2, E3, EE2	AF e EF de ETE	GCxGC-MS	1,4 - 8,6	2014	84

	E1, E2, E3, EE2	AF e EF de ETE	GC-MS	5,7 - 12,6	2014	84
	E1, E2, E3, EE2 e outros	AS, AM e AR	GC-MS/MS	730 - 1100	2014	85
	E1, E2, E3, EE2 e outros	AS, AT e AR	GC-MS	1,6 - 2,1	2013	13
	E1, E2, E3, EE2 e outros	AS e AR	GC-MS	0,6 - 2,6	2013	16
	EE2	AS	GC-MS	0,1	2013	86
	E1, E2, E3, EE2, PRO e outros	Leite	GC-MS	20 - 60	2013	87
	E1, E2, E3, EE2 e outros	AS, AT, AF e EF de ETE	GC-MS	3,4 - 3,8	2012	88
	E1, E2, E3 e outros	Sangue e urina (humano)	GC-MS	1,1 - 5,6	2012	89
	E1	AT	EI	0,061	2016	90
	E1, E2, E3	AT e AS	FIA-EC	27	2014	91
<b>Outros</b>	E1, E2, E3	AT, AS e Asubt	t-ITP-CE-ED	26 - 30	2013	92
	E1, E2, E3, EE2 e outros	AUP	CB/BDD-SWV	5 - 100 nM	2013	93
	E2	AD	ITO/ErG/AuNP-CV	0,1 fmol	2013	94
	E1, E2, E3	AT	FI-CL	3,8 - 16	2012	95

AS = água superficial; AR = água residual; AF = afluente; EF = efluente; ETE = estação de tratamento de esgoto; AT = água da torneira; AM = água mineral; Asubt = água subterrânea; SR = sedimento de rio; AUP = água ultrapura; AD = água deionizada

**APÊNDICE B – RESUMO DAS PUBLICAÇÕES SOBRE DETERMINAÇÃO DE HORMÔNIOS EM AMOSTRAS AQUOSAS  
UTILIZANDO GC-MS.**

<b>Analitos</b>	<b>Matriz</b>	<b>Pré-concentração</b>	<b>Derivatizante</b>	<b>Coluna</b>	<b>Detector</b>	<b>LD (ng L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Ano</b>	<b>Ref.</b>
E1, E2, EE2 e outros	AS	SPE (HLB Disk)	MSTFA	DB-5MS (30 m × 0,25 mm, 0,25 µm)	MS - EI-Q (SIM)	0,131 - 1,12	2017	77
E1, E2, E3, EE2, PRO e outros	AS	SPE (HLB)	BSTFA	XLB (60 m x 0,25 mm, 0,25 µm)	MS/MS - IT (MRM)	1,66 - 3,33	2017	78
E1, EE2 e outros	AT, ASubt e AS	DLLME + D-µ-SPE (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> )	BSTFA	ZB-5MS (30 m × 0,25 mm, 0,25 µm)	MS/MS - EI (MRM)	69 - 180	2016	79
E1, E2, PRO e outros	AS e AP	UA-DLLME (CHCl <sub>3</sub> )	ECF	ZB-5MS (30 m × 0,25 mm, 0,25 µm)	MS/MS - EI-QqQ (MRM)	30	2016	80
E1, E2, E3, EE2	AF e EF de ETE	MSA-DLLME	BSTFA	DB-5 (30 m × 0,25 mm, 0,25 µm)	MS - EI-Q (SIM)	11 - 82	2015	81
E1, E2, EE2 e outros	AS, AM, AT e ASubt	DLLME	Anidrido Acético	ZB-5MS (30 m × 0,25 mm, 0,25 µm)	MS - EI-Q (SIM)	3 - 5	2015	82
E1, PRO e outros	AS, AT e ASubt	mSPE (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /PA NPs)	MSTFA/TMIS	ZB-5MS (30 m × 0,25 mm, 0,25 µm)	MS/MS - EI-QqQ (MRM)	4 - 8	2014	83

E1, E2, E3, EE2	AF e EF de ETE	SPE (HLB)	BSTFA	BPX 50 (30 m × 0,25 mm, 0,50 µm)	MS - EI-Q (SIM)	1,4 - 8,6	2014	84
E1, E2, E3, EE2	AF e EF de ETE	SPE (HLB)	BSTFA	BPX 50 (30 m × 0,25 mm, 0,50 µm)	MS/MS- EI-Q (SIM)	5,7 - 12,6	2014	84
E1, E2, E3, EE2 e outros	AS, AT e AR	SPE (HLB)	BSTFA + TMCS	RTX-5 (30 m × 0,25 mm, 0,25 µm)	MS - EI-Q (SIM)	1,6 - 2,1	2013	13
E1, E2, E3, EE2 e outros	AS e AR	SPE (Strata-X)	DIMETRIS	RTX-5 (30 m × 0,25 mm, 0,25 µm)	MS - EI-Q (SIM)	0,6 - 2,6	2013	16
EE2	AS	SPE (C18)	BSTFA + TMCS	DB-5 (30 m × 0,32 mm, 0,25 µm)	MS - EI-Q (SCAN)	0,1	2013	86
E1, E2, E3, EE2, PRO e outros	Leite	HF-SEBALLME	HFBA	DB-5MS (30 m × 0,25 mm, 0,25 µm)	MS - EI-Q (SIM)	20 - 60	2013	87
E1, E2, E3, EE2 e outros	AS, AT, AF e EF de ETE	SPE (HLB)	BSTFA + TMCS	RTX-5 (30 m × 0,25 mm, 0,25 µm)	MS - EI-Q (SIM)	3,4 - 3,8	2012	88
E1, E2, E3 e outros	AS, AT, AF e EF de ETE	SPE (HLB)	PFPOH + PFPA	DB-1 (30 m × 0,25 mm, 0,25 µm)	ECD	0,7 - 2,1	2012	88
E1, E2, E3 e outros	Sangue e urina (humano)	SPE (HLB)	BSTFA + TMCS	DB-5 (30 m × 0,25 mm, 0,25 µm)	MS - EI-Q (SIM)	1,1 - 5,6	2012	89

AS = água superficial; AR = água residual; AF = afluente; EF = efluente; ETE = estação de tratamento de esgoto; Asubt = água subterrânea; AT = água da torneira; AM = água mineral.

**APÊNDICE C – RESUMO DAS PUBLICAÇÕES SOBRE DETERMINAÇÃO DE HORMÔNIOS EM AMOSTRAS AQUOSAS  
UTILIZANDO LC-MS.**

<b>Analitos</b>	<b>Matriz</b>	<b>Pré-concentração</b>	<b>Coluna</b>	<b>Modo de ionização</b>	<b>Fase móvel</b>	<b>Detector</b>	<b>LD (ng L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Ano</b>	<b>Ref.</b>
E1, E2, E3, EE2, GES, DRS, PRO e outros	AS, EF e AF de ETE	SPE (HLB + NH <sub>2</sub> )	Fenil-Hexil (2,1 x 100 mm, 2,5 µm)	ESI (-)	H <sub>2</sub> O 0,1 mM NH <sub>4</sub> F e MeOH/ACN 1:3	QqQ (MRM)	0,01 - 3	2017	34
E1, E2, E3, EE2 e conjugados	AS, EF e AF de ETE	SPE Online (C18)	C18 (2,1 x 50 mm, 1,7 µm)	ESI (-)	H <sub>2</sub> O e MeOH	QqQ (SRM)	0,030 - 0,063	2017	35
E1, E2, PRO e outros	Soro, plasma e urina (humano)	Precipitação de proteína	C18 (2 x 100 mm, 3 µm)	FF-APPI (+)	MeOH/H <sub>2</sub> O 90:10 0,05% Ácido Fórmico + Tolueno (dopante APPI)	QqQ (MRM)	0,2 - 1,0	2017	96
E1, E2, E3, EE2	EF e AF de ETE	HF-LPME	C18 (2 x 50 mm, 3 µm)	ESI (-)	H <sub>2</sub> O e MeOH (0,2% NH <sub>4</sub> OH)	QqQ (MRM)	0,251 - 0,440	2017	36
E1, E2, E3, EE2	AT	SPE (C18)	C18 (2,1 x 50 mm, 1,9 µm)	ESI (-)	H <sub>2</sub> O/ACN 60:40 (3% NH <sub>4</sub> OH 0,2 M)	QqQ (SRM)	0,008 - 0,241	2016	18
E1, E2	Soro e plasma (humano)	SPE (MCX) e Derivatização (FMP-TS)	C18 (2,1 x 50 mm, 1,7 µm)	ESI (+)	H <sub>2</sub> O e MeOH (0,1% ácido fórmico)	QqQ (MRM)	0,001	2016	97
E1, E2, E3, EE2 e outros	EF e AF de ETE	SPE (PEP)	C18 (4,6 x 100 mm, 2,6 µm)	ESI (-)	ACN, MeOH e 0,1% NH <sub>4</sub> OH	QqQ (SRM)	0,16 - 2,14	2016	37
E2	Soro (humano)	LLE	C18 (0,5 x 50 mm, 3 µm)	ESI (-)	H <sub>2</sub> O e MeOH (0,05% NH <sub>4</sub> OH)	QqQ (MRM)	3	2016	98

E1, E2, E3, EE2, PRO e outros	AS	SPE (HLB)	? (3,0 × 100 mm, 3,5 μm)	ESI (+)	H2O/MeOH 20:80 + 5 mM NH4HCO2 e 0,1 % ácido fórmico	QqQ (MRM)	0,3 - 0,7	2015	38
E1, E2, E3, EE2 e outros	AS	LLE e Derivatização (DNCS)	C18 (3,0 × 100 mm, 2,7 μm)	ESI (+)	H2O e ACN	QqQ (MRM)	0,030 - 0,086	2015	39
E1, E2, E3, EE2 e outros	AS e AT	UA-DLLME-SPO	C18 (4,6 × 50 mm, 1,8 μm)	ESI (-)	MeOH e H2O 5 mM (NH4)2Ac	QqQ (MRM)	53 - 1446	2015	42
E1, E2, EE2 e outros	AM, AT, AR	m-μSPE (Fe3O4@PDA)	C18 (4,6 × 100 mm, 3,5 μm)	ESI (-)	ACN e H2O	IT (MRM)	100 - 330	2015	40
E1, E2, E3, EE2, PRO e outros	Soro (humano)	SLE (Isolute)	C18 (3,0 × 100 mm, 100 Å)	ESI (-) e ESI (+)	ACN e H2O + ACN 10% NH4OH pós-coluna	QTrap (MRM)	0,1 - 0,3	2015	99
E1, E3 e outros	AS	SPE (HLB)	C18 (4,6 × 100 mm, 2,7 μm)	ESI (-) e ESI (+)	H2O 5mM NH4Ac e ACN/MeOH 1:1	QTrap (MRM)	0,15 - 2,5	2015	41
E1, E2 e outros	Soro (humano)	LLE e Derivatização (DNCS)	C18 (2,1 × 30 mm, 2,7 μm)	ESI (+)	H2O 0,2% Ácido Fórmico e MeOH	QTrap (MRM)	0,001 - 0,004	2014	100
E1, E2, E3, EE2, PRO	AP, AF e EF de ETE	SPE (C18 ou C18XF)	C18 (4,6 × 100 mm, 3,5 μm)	ESI (-) e ESI (+)	MeOH e H2O	QTrap (MRM)	0,17 - 0,32	2014	43
E1, E2, E3, EE2	AS	UAE-μSPE (IL-MMT)	C18 (2,1 × 50 mm, 1,9 μm)	ESI (-)	ACN/H2O/NH4OH 0,20 M 44:53:3	QqQ (SRM)	0,012 - 0,693	2014	44
E1, E2, EE2, PRO e outros	AR	MASE	C18 (2,1 × 50 mm, 1,8 μm)	ESI (-)	MeOH e H2O (0,05% NH4OH)	QqQ (SRM)	0,4 - 100	2014	45
E1, E2, E3, EE2 e outros	AS e SR	SPE (HLB)	C14-amide (4,6 × 75 mm, 3,5 μm)	APCI (+)	MeOH e H2O (0,1% ácido fórmico)	IT (SRM)	0,6 - 1,3	2014	46



E1, E2, E3, EE2 e outros	AF e EF de ETE	SPE (C18)	C18 (2,1 × 50 mm, 1,7 µm)	ESI (-)	MeOH e H2O (0,1% NH4OH + 15 mM NH4Ac)	QqQ (MRM)	0,51 - 9,35	2013	101
E2	Soro (humano)	LLE (MTBE)	C18 (2,1 × 50 mm, 2,7 µm)	APPI (-)	MeOH/H2O + Tolueno (dopante APPI)	QqQ (MRM)	13,6	2013	102
E1, E2, E3, EE2	AS e AR	SPE (C18)	C18 (4,6 × 100 mm, 2,6 µm)	ESI (-)	ACN e MeOH	QTrap (MRM)	0,15 - 0,95	2013	48
E1, E2, E3, EE2, PRO e outros	AF e EF de ETE	SPE (C18, 2,0 × 20 mm, 12 µm)	C18 (2,1 × 100 mm, 1,9 µm)	APCI (+)	MeOH e H2O (0,1% ácido fórmico)	QqQ (SRM)	8 - 60	2013	11
E1, E2, E3, EE2 e outros	AS e AF e EF de ETE	SPE (NG1, 4 mm × 35 mm)	C18 (3,0 × 150 mm, 3,0 µm)	ESI (-)	ACN e H2O 1% NH4OH	QqQ (MRM)	0,1 - 2	2013	49
E1, E2, E3, EE2, PRO e outros	AS e AP	SPE (HLB)	C18 (2,1 × 100 mm, 1,8 µm)	ESI (-) e ESI (+)	H2O 10 mM NH4HCO2 e MeOH (+) ou H2O e ACN (-)	Q-TOF (EIC)	0,28 - 0,42	2012	19
E1, E2, E3, EE2 e outros	LA e SR	ASE + LLE + SPE (Florisil) + AAE + SPE (HLB)	C18 (3,9 × 150 mm, 4,0 µm)	ESI (-)	ACN, MeOH e H2O 1% NH4OH	QTrap (MRM)	50 - 200	2012	53
E1, E2, E3, EE2 e outros	AS AP	SPE (HLB)	C18 (2,1 × 30 mm, 3,5 µm)	ESI (-)	MeOH e H2O (0,1% NH4OH)	QqQ (MRM)	0,1 - 1	2012	51
E1, PRO e outros	AF e EF de ETE	SPE (HLB)	C8 (2,1 × 100 mm, 3,5 µm)	ESI (+)	H2O e MeOH (0,1% AF + 5 mM NH4HCO2)	QqQ (MRM)	120 - 130	2012	52
E1, E2, E3, EE2 e outros	AS	SPE (C8)	C18 (2,1 × 50 mm, 1,7 µm)	ESI (-)	H2O 10 mM N-methylmorpholine e MeOH	QqQ (SRM)	1,27 - 45,6	2012	53

E1, E2, E3, EE2 e outros	AR	on-line SPE (HLB, 2,1 x 30 mm, 20 µm)	C18 (2,1 × 50 mm, 1,7 µm)	ESI (-)	MeOH e H2O (0,1% NH4OH + 15 mmol NH4Ac)	QqQ (MRM)	0,9 - 1,3	2012	103
E1, E2, E3 e outros	Urina (humano)	SPE (HLB) e Derivatização (DMAB)	C18 (2,1 × 100 mm, 1,7 µm)	ESI (+)	H2O 0,1% AF e ACN	Orbitrap (EIC)	5 - 10	2012	104
E1, E2	Soro (humano)	LLE + SPE (C8)	C18 (2,1 × 330 mm, 3,0 µm)	ESI (-)	H2O 0,2 mM NH4F e MeOH	QqQ (MRM)	0,3 - 0,5	2012	105
E1, E2, E3, EE2, PRO e outros	AR	on-line SPE (C18, 2,1 × 20 mm, 12 µm)	C18 (2,1 × 50 mm, 1,9 µm)	APPI (+)	H2O/MeOH 50:50 0,1% AF	QqQ (SRM)	4,2 - 11	2012	54

AS = água superficial; AR = água residual; AF = afluyente; EF = efluente; ETE = estação de tratamento de esgoto; AT = água da torneira; AM = água mineral; Asubt = água subterrânea; SR = sedimento de rio;

**APÊNDICE D – RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DE HORMÔNIOS POR GC-MS NO ARROIO DILÚVIO.**

<b>Setembro - 2016</b>						
<b>Arroio Dilúvio</b>						
<b>Hormônio</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
Estrona	31,4	56,9	94,3	96,3	154,7	191,9
Alopregnanolona	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
β-Estradiol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
17α-Etinilestradiol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Gestodeno	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Progesterona	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Estriol	34,0	28,0	42,3	25,2	37,1	23,8
<b>Dezembro - 2016</b>						
Estrona	184,7	49,8	83,9	30,8	n.d.	49,0
Alopregnanolona	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
β-Estradiol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
17α-Etinilestradiol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Gestodeno	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Progesterona	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Estriol	33,6	44,3	34,0	31,3	n.d.	n.d.
<b>Junho - 2017</b>						
Estrona	206,0	224,9	190,6	173,2	216,6	232,2
Alopregnanolona	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
β-Estradiol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
17α-Etinilestradiol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Gestodeno	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Progesterona	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Estriol	112,6	81,1	137,4	33,5	181,5	262,6
<b>Setembro - 2017</b>						
Estrona	164,1	119,2	206,0	150,5	165,5	208,1
Alopregnanolona	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
β-Estradiol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
17α-Etinilestradiol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Gestodeno	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Progesterona	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Estriol	62,0	48,6	161,7	142,8	143,3	116,0

n.d. = não detectado

Concentração em ng.L<sup>-1</sup>

**APÊNDICE E – RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DE HORMÔNIOS POR GC-MS NO RIO DOS SINOS E RIO GRAVATAÍ.**

<b>Novembro - 2016</b>		
<b>Hormônio</b>	<b>Rio dos Sinos</b>	<b>Rio Gravataí</b>
Estrona	n.d.	n.d.
Alopregnanolona	n.d.	n.d.
$\beta$ -Estradiol	n.d.	n.d.
17 $\alpha$ -Etinilestradiol	n.d.	n.d.
Gestodeno	n.d.	n.d.
Progesterona	n.d.	n.d.
Estriol	n.d.	n.d.
<b>Dezembro - 2016</b>		
Estrona	n.d.	n.d.
Alopregnanolona	n.d.	n.d.
$\beta$ -Estradiol	n.d.	n.d.
17 $\alpha$ -Etinilestradiol	n.d.	n.d.
Gestodeno	n.d.	n.d.
Progesterona	n.d.	n.d.
Estriol	n.d.	n.d.
<b>Junho - 2017</b>		
Estrona	n.d.	n.d.
Alopregnanolona	n.d.	n.d.
$\beta$ -Estradiol	n.d.	n.d.
17 $\alpha$ -Etinilestradiol	n.d.	n.d.
Gestodeno	n.d.	n.d.
Progesterona	n.d.	n.d.
Estriol	n.d.	n.d.
<b>Setembro - 2017</b>		
Estrona	n.d.	n.d.
Alopregnanolona	n.d.	n.d.
$\beta$ -Estradiol	n.d.	n.d.
17 $\alpha$ -Etinilestradiol	n.d.	n.d.
Gestodeno	n.d.	n.d.
Progesterona	n.d.	n.d.
Estriol	n.d.	n.d.

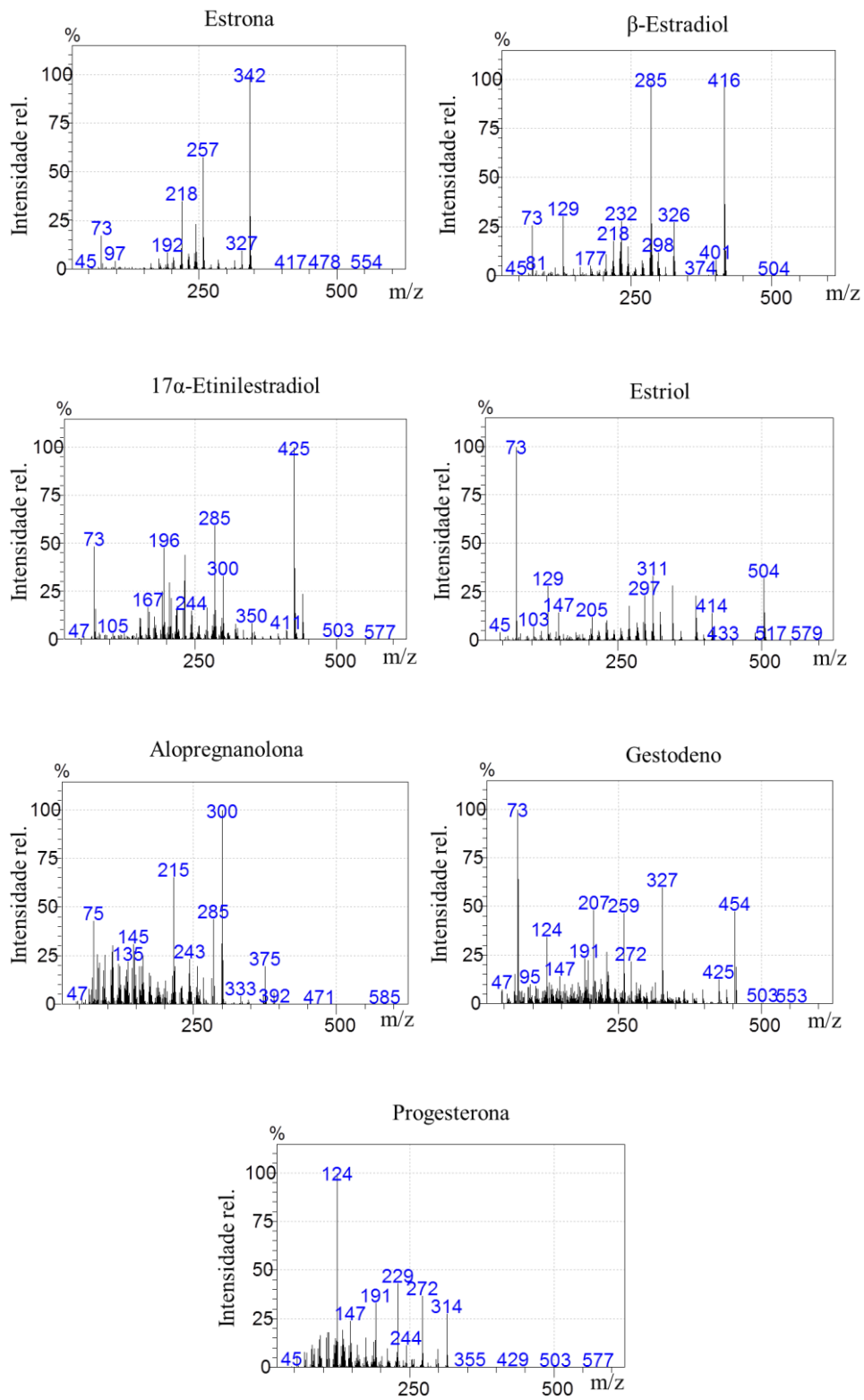
n.d. = não detectado

Concentração em ng.L<sup>-1</sup>

**APÊNDICE F – EQUIVALENTE ESTRADIOL (ng L<sup>-1</sup>) CALCULADO PARA O ARROIO DILÚVIO**

<b>Setembro - 2016</b>						
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
EEQ	10,5	19,0	31,4	32,1	51,6	64,0
<b>Dezembro - 2016</b>						
EEQ	61,6	16,6	28,0	10,3	-	16,3
<b>Junho - 2017</b>						
EEQ	68,7	75,0	63,5	57,7	72,2	77,4
<b>Setembro - 2017</b>						
EEQ	54,7	39,7	68,7	50,2	55,2	69,4

**APÊNDICE G – ESPECTROS DE MASSAS DOS ANALITOS OBTIDO POR GC-MS  
NO MODO SCAN.**



## APÊNDICE H – CURVAS ANALÍTICAS OBTIDAS PARA CADA HORMÔNIO POR GC-MS.

