



Ministério da Educação – Brasil
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM
Minas Gerais – Brasil
Revista Vozes dos Vales: Publicações Acadêmicas
ISSN: 2238-6424
QUALIS/CAPES – LATINDEX
Nº. 22 – Ano XI – 10/2022
<http://www.ufvjm.edu.br/vozes>

Desenvolvimento e validação de um método simples e rápido para determinação de hormônios 17 β -estradiol (E2) e 17 α -etinilestradiol (EE2) em amostras ambientais por Cromatografia Líquida De Alta Eficiência (HPLC)

MSc. Mayra Soares Santos
MSc. Amanda Oliveira Mourão
Dr. Elton Santos Franco
Dr^a. Márcia Cristina da Silva Faria
Dr^a Mariandry del Valle Rodriguez Rodriguez
Dr. Jairo Lisboa Rodrigues

Resumo: Atualmente, um dos maiores problemas mundiais é a poluição ambiental com a contaminação de solo, ar e água, sendo este um recurso essencial para a manutenção da vida. Dentre vários tipos de contaminantes emergentes tem-se a liberação dos desreguladores endócrinos 17 β -estradiol (E2) e 17 α -etinilestradiol (EE2) no esgotamento sanitário e consequentemente nos corpos hídricos, uma vez que os tratamentos convencionais não removem esse tipo de poluente. Visto isso, é necessário o desenvolvimento de estudos e tecnologias para determinação desses contaminantes orgânicos dos corpos hídricos. O presente estudo tem por objetivo o desenvolvimento de um método de determinação dos desreguladores endócrinos 17 β -estradiol (E2) e 17 α -etinilestradiol (EE2) em amostras ambientais. A quantificação dos hormônios E2 e EE2 por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência passou por processo de validação. Como resultados, a validação foi executada e alcançou resultados satisfatórios: $r^2=0,9976$ (E2), $r^2=0,9969$ (EE2), recuperação de 100,15% (E2) e 100,31% (EE2). Além disso, os

dados obtidos nos limites de detecção e quantificação apresentaram valores baixos, mostrando a eficácia do método desenvolvido.

Palavras-chave: 17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol, validação analítica, cromatografia líquida.

Introdução

Atualmente, um dos problemas mais graves que o mundo enfrenta é a poluição ambiental no ar, terra e água, sendo este último recurso o de maior importância e aquele que requer atenção especial (SALAZAR; 2009). Dada a importância da água para a vida de todos os seres vivos, e devido ao aumento das necessidades e consumo pelo desenvolvimento contínuo da humanidade, a geração de águas residuais também aumentou. Ao mesmo tempo, as sociedades têm aumentado o número de regulamentações e leis para controlar a poluição da água e essas leis exigem cada vez níveis mais altos de purificação, para os quais é necessária uma melhoria contínua desses processos. Além disso, a presença de microcontaminantes orgânicos em níveis de concentração de ultra traços (concentrações abaixo de ng/L) está forçando a criar legislações específicas para seu controle e tratamento.

Os microcontaminantes orgânicos, que estão incluídos entre um grande número dos produtos químicos que poluem as águas, compreendem substâncias orgânicas e inorgânicas de processos industriais, bem como pesticidas, medicamentos, produtos de higiene pessoal e hormônios naturais e de origem antropogênica. Embora os microcontaminantes sejam encontrados em concentrações reduzidas (níveis de concentração entre ng/L e μ g/L) muitos deles apresentam sérios problemas toxicológicos, porque estes compostos são biologicamente ativos e têm uma baixa taxa de biodegradabilidade. Por esse motivo, a poluição ambiental associada a esses microcontaminantes orgânicos são uma das preocupações existentes na atualidade. Entre os principais problemas ambientais relacionados com esta classe de compostos estão a contaminação da água potável, a bioacumulação de compostos xenobióticos em alimentos e a ameaça de biodiversidade devido a efeitos adversos no sistema endócrino dos seres vivos (SUN *et al.*, 2009).

Os desreguladores endócrinos (DEs) fazem parte de uma subclasse dentro dos microcontaminantes emergentes. Os contaminantes emergentes podem ser definidos como substâncias no ambiente que não são normatizados, mas têm potencial para causar danos à saúde ou ao meio ambiente, mesmo em baixas concentrações (MUÑOZ, 2012). Segundo a USEPA (2014) um contaminante emergente pode ser qualquer substância de origem natural ou sintética, que possa ser detectada no meio ambiente, e que pode causar algum dano à biota e aos seres humanos. Eles foram definidos, segundo Lintelmann *et al.* (2003), como “substâncias exógenas que causam efeitos adversos na saúde de um organismo intacto ou sua progênie, como consequência de alterações na função endócrina”. Se evidencia então que a quantidade de substâncias que entram dentro dessa classificação é muito ampla podendo envolver desde produtos de higiene pessoal até produtos agrícolas.

Ainda não existe uma lista definitiva de contaminantes emergentes no ambiente. Muñoz (2012), propôs uma lista de alguns contaminantes de grande importância no México, considerando o volume de uso, relevância na saúde pública e ação toxicológica. No Brasil, Montagner, Vidala e Acayaba (2017), publicaram uma revisão sobre o que acontece nas matrizes aquáticas brasileiras, considerando as águas residuais, superficiais, subterrâneas e potáveis, assim como uma discussão sobre os efeitos biológicos dos mesmos e a legislação envolvendo a presença dos contaminantes emergentes onde são incluídos produtos para o cuidado pessoal, compostos farmacêuticos, drogas ilícitas, hormônios, pesticidas e outras substâncias consideradas como disruptores endócrinos.

Naturalmente, os estrogênios (estradiol, estrona e estriol) são produzidos principalmente pelo desenvolvimento de folículos nos ovários, o corpo lúteo da placenta, córtex adrenal, cérebro, testículos, fígado e tecido adiposo (DIMOGERONTAS; LIAPI, 2014). Eles são hormônios produzidos tanto nos homens como nas mulheres, mas nelas em maior quantidade (HILEMAN, 1994). O principal papel dos estrogênios no organismo é regular o desenvolvimento, a manutenção e a função do sistema reprodutivo em ambos os sexos. Dimogerontas e Liapi (2014) indicaram que quando ocorre um desequilíbrio na quantidade de estrogênio transportado, pode haver implicações no desenvolvimento e progresso de doenças

como câncer de mama e cólon, osteoporose, condições cardiovasculares, neurodegenerativa, endometriose e obesidade.

Entre estes compostos, encontram-se o estrógeno natural 17- β -estradiol (E2) e o estrógeno sintético 17 α -etinilestradiol (EE2) os quais têm alta atividade estrogênica, mesmo em concentrações muito baixas (JOBLING; SUMPTER, 1993; GE *et al.*, 2009). Dependendo da dose e do metabolismo do organismo expostos ao disruptor endócrino, o 17 α -etinilestradiol (EE2) é responsável por muitos efeitos adversos nos organismos aquáticos, como masculinização de caracóis, feminização de peixes (DESBROW *et al.*, 1998; HALLING-SORENSEN, 2000) e inibição do crescimento (HALLING-SORENSEN, 2000; CLEUVERS, 2005), e estudos tem mostrado também que a exposição a estrógenos com níveis tão baixos como 1 ng/L é suficiente para causar a feminização da truta macho (XUAN *et al.*, 2008); os DES causam também distúrbios no desenvolvimento do sistema reprodutivo em seres humanos e animais (JIMÉNEZ-DÍAZ *et al.*, 2015).

Embora os estrógenos estejam presentes naturalmente em vertebrados e invertebrados, identificou-se que quando os seres humanos e animais selvagens são expostos a concentrações de estrogênio maiores do que as que um organismo produz normalmente, efeitos adversos são gerados em seu sistema endócrino. O E2 é o principal estrogênio em vertebrados; associado ao sistema reprodutivo feminino e é excretado em maior quantidade durante os períodos de gravidez e menstruais, mas fora destes períodos, mulheres e homens excretam praticamente a mesma quantidade/dia (COMBALBERT; HERNANDEZ-RAQUET, 2010; WELSHONS *et al.*, 2003; XU *et al.*, 2012).

Uma possível fonte de exposição de seres humanos a altas concentrações de estrogênio são os medicamentos usados nos tratamentos de reposição hormonal, regulação dos ciclos menstruais ou métodos contraceptivos. O etinilestradiol (EE2), por exemplo, é um hormônio sintético derivado do estrogênio natural E2 que é usado principalmente como contraceptivo oral, mas também é muito utilizado em tratamentos de reposição hormonal e na suspensão da amamentação (ARIS; SHAMSUDDIN; PRAVEENA, 2014). Os estrógenos também são usados em terapias hormonais em animais domésticos e de gado. O Registro de Especialidades Veterinárias (PEV, 2014) relata o uso de estrógenos com fins terapêuticos, como por exemplo a utilização do estradiol para a indução e sincronização de período de cio

nas vacas (Benzoato de Estradiol, Bioestrogen, Estrogenic) e estriol para o tratamento da incontinência urinária em cadelas (Incurin).

Os hormônios, esteroides e seus metabólitos encontram-se presentes nos recursos hídricos devido à descarga de efluentes domésticos e industriais que são constantemente despejados pelos seres humanos e animais (KOH *et al.*, 2007). O aparecimento destes compostos está diretamente relacionado com o progresso, as técnicas adotadas na pecuária, agricultura, indústrias e grandes centros urbanos (CABAN *et al.*, 2015; DIAMANTI-KANDARAKIS *et al.*, 2009; SCOGNAMIGLIO *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2021). Sendo os efluentes das estações de tratamento de águas residuais uma das principais fontes de estrogênio no ambiente aquático, sua degradação durante o tratamento de águas residuais e sua carga subsequente nas águas naturais receptoras é variável dependendo do tipo de tratamento aplicado, tempo de permanência hídrica, tempo de retenção no lodo e outros fatores operacionais (PEREIRA *et al.*, 2011).

Como mencionado anteriormente, a presença dos estrogênios no ambiente é de origem natural e antropogênica. Como fonte natural, a excreção diária humana de estradiol, estrona e estriol pelo homem são de 1.6, 3.9 e 1.5 µg, respectivamente e pela mulher de 3.5, 8, 4.8 µg, respectivamente. Mulheres que tomam o anticoncepcional baseados no etinilestradiol excretam 35 µg do mesmo por dia (PETROVIC, *et al.*, 2008). Como fonte antropogênica, a concentração de estrogênios no ambiente provavelmente está relacionada com o total da manufatura prescrita ou comprada para as terapias hormonais tanto para seres humanos como para o gado e animais domésticos.

Devido à sua comprovada presença no meio ambiente e seu potencial risco à saúde e à vida selvagem, foram desenvolvidas algumas iniciativas para regular a concentração de estrogênios em água. A USEPA (2012) incorporou na sua lista de avaliação de novos poluentes o estradiol, o estriol, a estrona e o etinilestradiol, pois há evidências que mostram seu potencial como desreguladores endócrinos. Gilbert (2012) relatou que a Comissão Europeia propôs aos seus Estados membros estabelecer um limite médio anual de concentração de etinilestradiol de 0,035 ng/L. No entanto, o autor afirma que existe uma forte oposição das indústrias farmacêuticas ao referido regulamento, porque eles garantem que há pouca evidência de danos à população dos peixes. Como esses compostos não são

totalmente removidos no tratamento das águas, nem em estações de tratamento de esgoto, eles podem atingir o ambiente aquático.

As concentrações dos hormônios no meio ambiente são muito baixas e por isso muitos métodos analíticos foram desenvolvidos para detectar e quantificar estas substâncias em matrizes ambientais, tais como, águas superficiais (GROVER *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2011; ZHOU *et al.*, 2012), água potável (KUSTER *et al.*, 2009; VERBINNEN; NUNES; VIEIRA, 2010), sedimentos (WANG *et al.*, 2011) e efluente de estações de tratamento de esgoto (MOHAGHEGHIAN *et al.*, 2014; PESSOA *et al.*, 2014). Estes métodos consistem em inicialmente realizar um preparo da amostra, por meio de filtração e extração e, posteriormente, analisá-la através de técnicas instrumentais (cromatografia gasosa ou líquida associada a um detector) ou não-instrumentais (imunoensaio ou bioensaio) (FANG *et al.*, 2016). Em relação às técnicas instrumentais, a cromatografia líquida e a cromatografia gasosa têm sido mais amplamente usadas para o monitoramento dos contaminantes emergentes em meio aquoso (CABAN *et al.*, 2012).

Visto isso, o presente estudo tem por objetivo desenvolver um método simples e rápido para determinação de hormônios 17 β -estradiol (E2) e 17 α -etinilestradiol (EE2) em amostras ambientais por Cromatografia Líquida De Alta Eficiência (HPLC).

Metodologia

Reagentes, Soluções e Equipamentos

Todas as soluções foram preparadas usando acetonitrila de grau de cromatografia líquida (Merck) e água ultrapura 18,2 M Ω .cm a 25°C (Merck). Nos ensaios de síntese e teste de fotodegradação foram utilizados a balança analítica Bioscale. Para quantificação dos hormônios estudados foi utilizado um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) com detector de fluorescência (FL) da marca Perkin Elmer.

Condições Cromatográficas

Para a determinação dos hormônios E2 e EE2 foram usadas as condições cromatográficas validadas por Carvalho *et. al* (2017). Foi utilizado um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de fluorescência, equipado

com uma coluna C18 NTS 18 100A (150 mm x 4,6 mm, 5 μ m), um injetor automático com volume de injeção programado em 20 μ L. A fase móvel utilizada no processo foi composta por acetonitrila:água (80:20, v/v). A operação do sistema foi realizada à 29 °C, utilizando uma velocidade de fluxo de 0,8 mL.min⁻¹, o comprimento de onda utilizado para a detecção dos hormônios foi 280 nm na excitação e 310 nm na emissão.

Validação Analítica

A validação analítica para o E2 foi realizada seguindo os seguintes parâmetros: linearidade (20, 50, 100, 200, 300, 400 e 500 μ g/L), precisão intradias (200, 400 e 500 μ g/L, com três injeções de cada), precisão intermediária (200, 400 e 500 μ g/L, com três injeções de cada), exatidão (100, 200 e 400 μ g/L), limite de detecção e limite de quantificação. Para o EE2 os seguintes parâmetros foram estudados: linearidade (20, 50, 100, 200, 300 μ g/L), precisão intradias (50, 100 e 200 μ g/L, com três injeções de cada), precisão intermediária (50, 100 e 200 μ g/L, com três injeções de cada), exatidão (50, 200 e 300), limite de detecção e limite de quantificação.

Todos os estudos foram realizados em concordância com as orientações do INMETRO (2020) e ANVISA (2017).

Resultados e discussão

Validação Analítica

As condições cromatográficas utilizadas foram baseadas na metodologia descrita por Carvalho *et. al* (2017) com tempo de retenção de 2,8 minutos (FIGURA 1) para os dois compostos, para a validação analítica dos disruptores endócrinos E2 e EE2.

Os parâmetros avaliados foram linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação e limite de detecção.

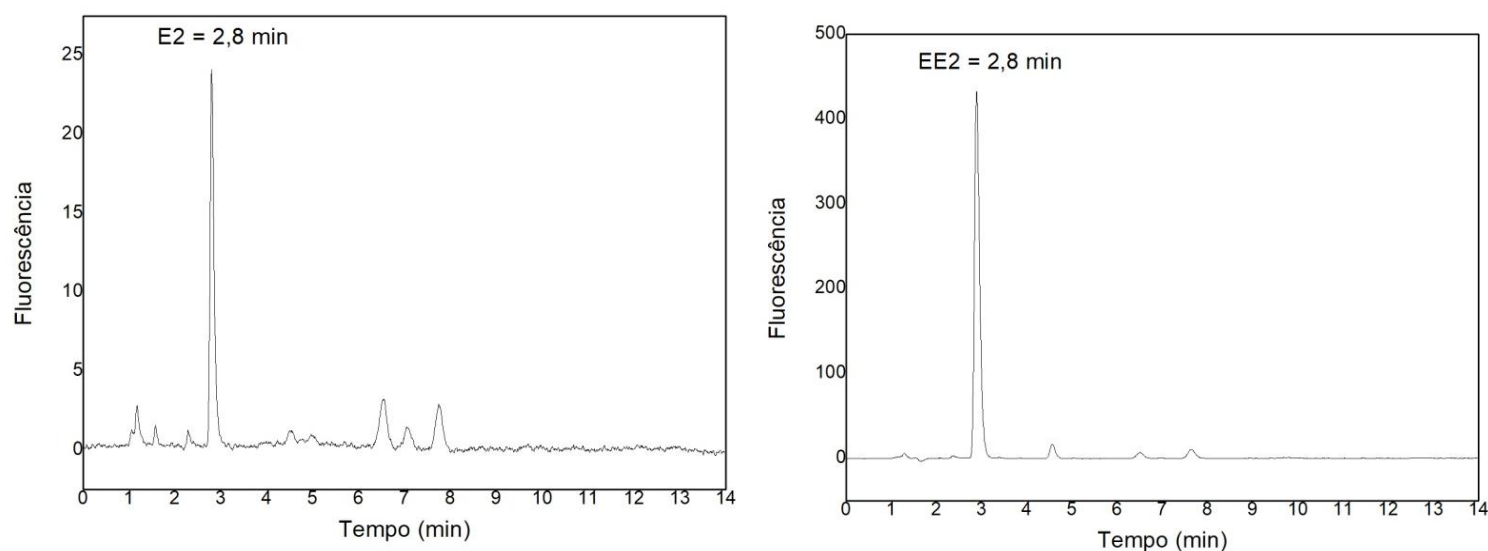


Figura 1 – Cromatograma dos hormônios E2 e EE2

Linearidade

Os valores obtidos para a curva analítica do E2 estão apresentados na Tabela 1 e a curva analítica na Figura 2, enquanto para o EE2 estão na Figura 3 e Tabela 2.

Tabela 1 – Resultados da análise de regressão linear obtidos a partir da curva analítica do E2

Parâmetros	HPLC
Coeficiente de determinação (r^2)	0,99758
Coeficiente de correlação (r)	0,9987
Coeficiente angular (a)	$351973,69 \pm 7081,53$
Coeficiente linear (b)	$-621780,66 \pm 1,99$
Faixa de concentração ($\mu\text{g/L}$)	20 - 500
Número de pontos	7

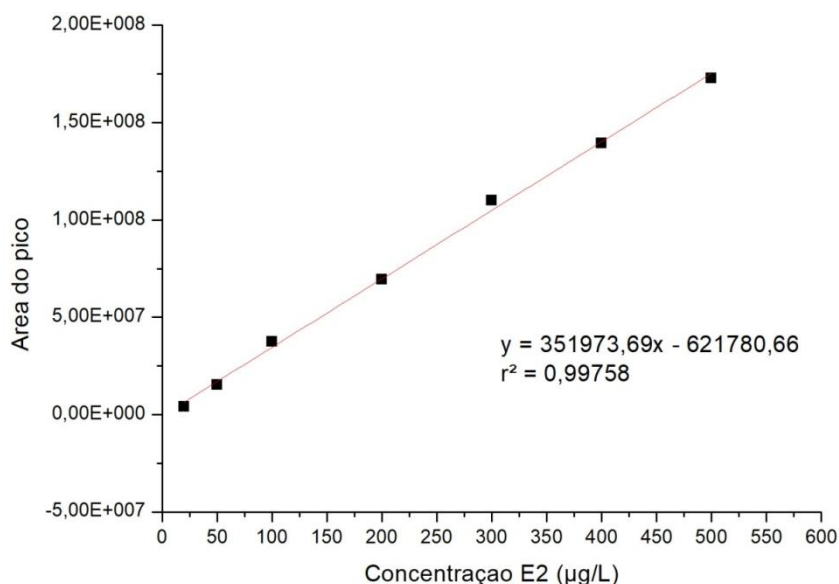


Figura 2 – Curva analítica do E2

A construção da curva analítica do E2 foi realizada utilizando concentrações de 20 a 500 µg/L, todas as análises em triplicata. Por meio dos resultados, obtiveram-se as regressões lineares ($Y = aX + b$), onde Y é a área do pico e X é a concentração do E2. Observou-se a similaridade dos resultados na faixa de trabalho estudada com as respostas e correlações obtidas. Alcançou-se também um valor do coeficiente de correlação satisfatório ($> 0,990$), o que reafirma a linearidade deste método analítico.

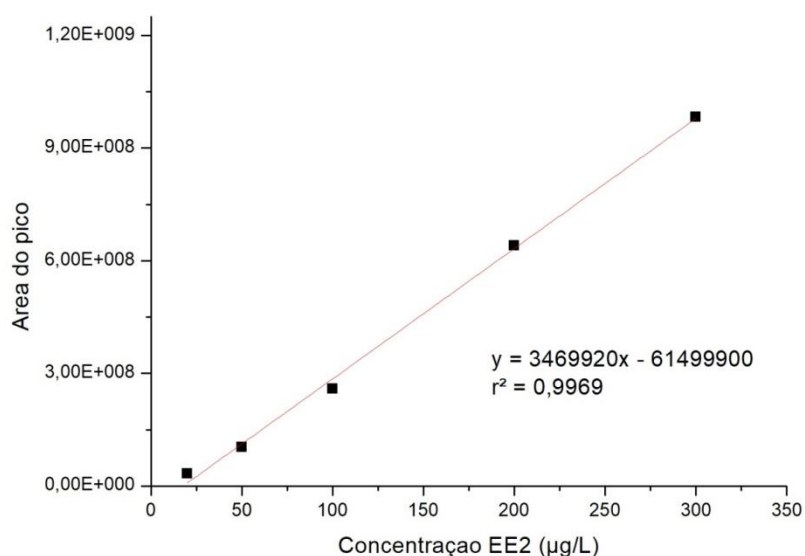


Figura 3 – Curva analítica do EE2**Tabela 2 – Resultados da análise de regressão linear obtidos a partir da curva analítica do EE2**

Parâmetros	HPLC
Coeficiente de determinação (r^2)	0,9969
Coeficiente de correlação (r)	0,9984
Coeficiente angular (a)	$3469920 \pm 96635,10$
Coeficiente linear (b)	-6149990 ± 16336800
Faixa de concentração ($\mu\text{g/L}$)	20 – 300
Número de pontos	5

Segundo a ANVISA (2017), a linearidade de um método mostra a capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra. Para o EE2, a curva analítica (FIG. 3) obtida a partir da faixa de trabalho estudada, demonstra uma relação linear entre as concentrações e as áreas dos picos obtidos nos cromatogramas. Essa relação de linearidade pode ser reafirmada observando-se que os coeficientes de correlação e determinação apresentam valores acima de 0,990.

Precisão

Nos estudos de precisão é avaliada a proximidade dos resultados obtidos de uma mesma concentração, realizados em triplicata. Tanto no mesmo dia (repetibilidade) quanto em dias diferentes (intermediária), esses resultados são expressos em coeficiente de variação (CV) ou desvio padrão relativo (DPR). Com isso, as tabelas abaixo apresentam os resultados obtidos a partir dos estudos de precisão do E2 (TABELA 3) e EE2 (TABELA 4).

Tabela 3 – Resultados da análise do coeficiente de variação do E2 nas concentrações de 200, 400 e 500 $\mu\text{g/L}$

Concentração ($\mu\text{g/L}$)	Coeficiente de Variação (%)	
	Repetibilidade	Intermediária
200	7,3127	11,3393

400	8,4965	3,3377
500	7,4633	9,5608
Limite recomendado (AOAC, 2016)	15	15

Na tabela 3 é possível observar que os coeficientes de variação nos testes de repetibilidade apresentaram valores abaixo de 8,5%, enquanto para os estudos de precisão intermediária os valores não ultrapassaram 11,4%. Sendo o limite recomendado pelo INMETRO (2020) e AOAC (2016) de 15%, os testes de precisão na quantificação do E2 encontram-se dentro do limite recomendado.

Tabela 4 – Resultados da análise do coeficiente de variação do EE2 nas concentrações de 50, 100 e 200 µg/L

Concentração (µg/L)	Coeficiente de Variação (%)	
	Repetibilidade	Intermediária
50	8,7034	5,2371
100	7,9037	5,5929
200	10,9725	4,7280
Limite recomendado (AOAC, 2016)	15	15

Para o EE2, os dados estão dispostos na Tabela 4, seguidos pelo limite máximo recomendado. Percebe-se que todos os resultados obtidos, tanto da repetibilidade quanto da precisão intermediária, encontram-se abaixo do limite de 15%.

Exatidão

No ensaio de exatidão, também conhecido como recuperação, avalia-se a concordância entre os resultados individuais em relação a um valor verdadeiro do Material de Referência Certificado (MRC).

Tabela 5 – Resultados do estudo de recuperação do E2

Concentração (µg/L)	Recuperação (%)
100	100,15

200	98,48
400	99,12
Recuperação média AOAC (2016)	80 - 110

Na tabela 5 encontram-se os valores de recuperação para as concentrações de 100, 200 e 400 µg/L para o E2. É possível inferir que os resultados de recuperação apresentaram valores satisfatórios, uma vez que atingiram variações menores que 2% da concentração real do MRC.

Tabela 6 – Resultados do estudo de recuperação do EE2

Concentração (µg/L)	Recuperação (%)
50	94,96
200	101,23
300	100,31
Recuperação média AOAC (2016)	80 - 110

Nos estudos para o hormônio EE2, obteve-se os dados apresentados na Tabela 6 nas concentrações de 50, 200 e 300 µg/L. Apesar da concentração de 50 µg/L ter atingido um valor de recuperação de 94,96%, todos os resultados ainda estão dentro do intervalo de 80 a 110% de recuperação preconizado pela AOAC e pelo INMETRO.

Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O limite de detecção e o limite de quantificação são os menores valores detectáveis e quantificáveis de um analito por um método específico, respectivamente. As concentrações desses parâmetros foram estimadas a partir do branco e da curva analítica.

Para E2 (TABELA 7), o desvio padrão do branco foi dividido pelo coeficiente angular da curva analítica (20 – 500 µg/L) e multiplicado por 3,3 para o limite de detecção e por 10 para o limite de quantificação. Como observado na Tabela 7, o método é capaz de detectar e quantificar baixas concentrações do E2.

Tabela 7 – Limites de detecção e quantificação do E2

Limite de detecção (µg/L)	5,01
Limite de quantificação (µg/L)	15,19

Nos testes para o EE2, o método apresentou grande confiabilidade, sendo apto a detectar e quantificar o analito estudado mesmo em concentrações muito baixas, conforme mostrado na Tabela 8.

Tabela 8 – Limites de detecção e quantificação do EE2

Limite de detecção (µg/L)	0,51
Limite de quantificação (µg/L)	1,54

Exposto isso, é possível afirmar que o método descrito por Carvalho *et. al* (2017) e adaptado por este estudo apresenta alto nível de confiabilidade para quantificação dos analitos E2 e EE2, baseado nos parâmetros preconizados pelo INMETRO (2020), ANVISA (2016) e AOAC (2016).

Conclusão

Com base nos resultados obtidos pode-se afirmar que a quantificação e validação dos hormônios E2 e EE2 por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de fluorescência (HPLC-FL) foi bem sucedida, alcançando resultados satisfatórios: $r^2=0,9976$ (E2), $r^2=0,9969$ (EE2), recuperação 100,15% (E2) e 100,31% (EE2), além de baixos valores de LOD e LOQ, que demonstram eficácia da metodologia. Sendo um método, rápido, eficaz, preciso e exato, estas são características necessárias para a determinação de analitos encontrados em amostras com concentração baixíssimas.

Referências

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, Resolução RE No. 899: Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasil, 2016. Disponível em <http://redsang.ial.sp.gov.br/site/docs_leis/vm/vm1.pdf> Acesso em 14 novembro de 2021.

AOAC International, Official methods of analysis of AOAC International, in Guidelines for Standard Method Performance Requirements (Appendix F). Gaithersburg: AOAC International, 2016.

ARIS, Ahmad Zaharin; SHAMSUDDIN, Aida Shamsuddin; PRAVEENA, Sarva Mangala. Occurrence of 17 α -ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review. *Environment International*. 2014. 69, 104-119.

CABAN, Magda; LIS, Ewa; KUMIRSKA, Jolanta e STEPNOWSKI, Piotr. Determination of pharmaceutical residues in drinking water in Poland using a new SPE-GC-MS(SIM) method based on Speedisk extraction disks and DIMETRIS derivatization. *Science of the Total Environment*. 2015. 538, 402–411.

CABAN, Magda; MIGOWSKA, Natalia; STEPNOWSKI, Piotr; KWIATKOWSKI, Marek e KUMIRSKA, Jolanta. Matrix effects and recovery calculations in analyses of pharmaceuticals based on the determination of β -blockers and β -agonists in environmental samples. *Journal of Chromatography A*. 2012. 1258, 117-127.

CARVALHO, Ricardo Valadão; ISECKE, Bruna; CARVALHO, Endrew e TERAN Francisco. Photocatalytic oxidation of 17 α -Ethinylestradiol by UVactivated TiO₂ in batch and continuous-flow reactor. *Journal of Chemical Engineering and Materials Science*. 2017. 8 (2), 10-16.

CLEUVERS Michael Initial risk assessment for three β -blockers found in the aquatic environment. *Chemosphere*. 2005. 59, 199–205.

COMBALBERT, Sarah e HERNANDEZ-RAQUET, Guillermina. Occurrence, fate, and biodegradation of estrogens in sewage and manure. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010. 86, 1671–1692.

DESBROW C; ROUTLEDGE E.J; BRIGHTY G.C; SUMPTER, J.P; WALDOCK M. Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 1. Chemical Fractionation and in Vitro Biological Screening. *Environmental Science & Technology*. 1998. 32, 1549–1558.

DIAMANTI-KANDARAKIS, Evanthia; BOURGUIGNON, Jean-Pierre; GIUDICE, Linda; HAUSER, Russ; PRINS, Gail; SOTO, Ana; ZOELLER, R. Thomas e GORE, Andrea. Endocrine-disrupting chemicals: An Endocrine Society 19 scientific statement. *Endocrine Reviews*. 2009. 30(4), 293-342.

DIMOGERONTAS, George e LIAPI, Charis. Endocrine Disruptors (Xenoestrogens): An Overview. In T. Eliades & G. Eliades (Eds.). *Plastics in Dentistry and Estrogenicity*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. 2014.

FANG, Ting Yien; PRAVEENA, Sarva Mangala; DEBURBURE, Claire; ARI, Ahmad Zaharin; ISMAIL, Sharifah Norkhadijah Syed RASDI, Irniza. Analytical techniques for steroid estrogens in water samples - A review. *Chemosphere*. 2016. 165, 358-368.

GILBERT, Natasha. Drug-Pollution Law All Washed Up. *Nature*. 2012. 491, 503-504.

GROVER, Darren P; ZHANG, Z.L., READMAN, J.W. e ZHOU, John L. A comparison of three analytical techniques for the measurement of steroidal estrogens in environmental water samples. *Talanta*. 2009. 78(3), 1204-1210.

HILEMAN, Bette. Environmental Estrogens Linked to Reproductive Abnormalities, Cancer. *Chemical & Engineering News*. 1994. 72(5), 19-23.

ICH: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, in *Q2(R1)*. ICH Harmonised Tripartite Guideline: London, 2005.

JOBLING, Susan e SUMPTER, J.P. Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: An in vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquatic Toxicology*. 1993. 27, 361-372.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos: Documento de caráter orientativo (DOQ-CGCRE-008). Revisão nº 09. Junho de 2020. 30p.

JIMÉNEZ-DÍAZ, Inmaculada; VELA-SORIA, Fernando; RODRÍGUEZ-GÓMEZ, Rócio; ZAFRA-GÓMEZ, Alberto; BALLESTEROS, Oscar; NAVALÓN, Alberto. Analytical methods for the assessment of endocrine disrupting chemical exposure during human fetal and lactation stages: A review. *Anal. Chim. Acta*. 2015. 892, 27-48.

KOH, Yoong Keat Kelvin; CHIU, T.Y., BOOBIS, A., CARTMELL, E., LESTER, J.N., SCRIMSHAW, Mark D. Determination of steroid estrogens in wastewater by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2007. 1173, 81-7.

KUSTER, Marina; AZEVEDO, D.A., ALDA, Miren López; NETO, Francisco Radler Aquino e BARCELÓ, Damiã. Analysis of phytoestrogens, progestogens and estrogens in environmental waters from Rio de Janeiro (Brazil). *Environment International*. 2009. 35(7), 997-1003.

LINTELMANN, Jutta; KATAYAMA, Arata; KURIHARA, N; SHORE, Laurence Stuart; WENZEL, Andrea. Endocrine Disruptors in the Environment (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem*. 2003. 75, 631-681.

MOHAGHEGHIAN, Azita; NABIZADEH, Ramin; MESDGHINIA, Alireza; RASTKARI, Noushin; MAHVI, Amir Houssein; ALIMOHAMMADI, Mahmood; YUNESIAN, Masoud; AHMADKHANIHA, Reza; NAZMARA, Shahrokh. Distribution of Estrogenic Steroids in Municipal Wastewater Treatment Plants in Tehran, Iran. *J Environ Health Sci Eng*. 2014. 12(1), 97-103.

MUÑOZ, C.J.E. Contaminantes emergentes: a aspectos químicos microbiológicos y de salud. In Moeller, Gabriela; Buelna, Gerardo (Eds.). *Contaminantes emergentes:*

su importancia, retos y perspectivas sobre la medición, el tratamiento y la reglamentación. 1. ed. Jiutepec, México. 2012. p. 19-27.

PEREIRA, Renata Oliveira; POSTIGO, Cristina; DE ALDA, Miren López; DANIEL, Luiz Antônio e BARCELO, Damià. Removal of estrogens through water disinfection processes and formation of by-products. *Chemosphere*, 2011. 82, 789-99.

PESSOA, Germana P.; DE SOUZA, Neyliane C.; VIDAL, Carla B.; ALVES, Joana A.C.; FIRMINO, Paulo Igor M.; NASCIMENTO, Ronaldo F. e DOS SANTOS, André B. Occurrence and removal of estrogens in Brazilian wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment*. 2014.490, 288-295.

PETROVIC, Mira; RADJENOVIC, Jelena; POSTIGO, Cristina; KUSTER, Marina; FARRÉ, Marinella; DE ALDA, Maria López e BARCELÓ, Damià. 21 Emerging Contaminants in Wastewaters: Sources and Occurrence. In O. Hutzinger, D. Barceló, & A. Kostianoy (Eds.). *The Handbook of Environmental Chemistry*. Berlin: Springer. 2008. pp. 1-35.

PEV (2014). *Prontuario de Especialidades Veterinaria 2014* [on line]. PLM México

SALAZAR, Margarita González. Sistemas integrales de tratamiento de aguas residuales, mediante el uso combinado de digestión anaerobia y micro algas. *Contactos*. 2009. 73, 16-22.

SILVA, Lucas Pinto da. Desenvolvimento de métodos baseados em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas para determinação de micotoxinas e agrotóxicos em alimentos. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2021. 137 f. Tese (Doutorado).

SCOGNAMIGLIO, Viviana; ANTONACCIA, Amina; PATROLECCO, Luisa; LAMBREVA, Maya D.; LITESCU, Simona C.; GHUGE, Sandip A. e REA, Giuseppina. Analytical tools monitoring endocrine disrupting chemicals. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 2016. 80, 555–567.

SUN, Li; YONG, Wei CHU, Xiaogan e LIN, Jin-Ming. Simultaneous determination of 15 steroidal oral contraceptives in water using solid-phase disk extraction followed by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr. A*. 2009. 1216, 5416-23.

USEPA (2012). CCL 3 List Chemical Contaminants [on line]. United States Environmental protection Agency. Disponível em: <http://water.epa.gov/scitech/drinkingwater/dws/ccl/ccl3.cfm>.

USEPA - United State Environmental Protection Agency. Contaminants of emerging concern. 2014. Disponível em: <<http://water.epa.gov/scitech/cec/>>.

VERBINNEN, Rafael Teixeira; NUNES, Gilvanda Silva e VIEIRA, Eny Maria. Determinação de hormônios estrógenos em água potável usando CLAE-DAD. Química Nova. 2010. 33(9), 1837-1842.

VOCABULÁRIO INTERNACIONAL DE METROLOGIA. Conceitos fundamentais e gerais e termos associados. Duque de Caxias, RJ: INMETRO, 2012. 94 p.

WANG, Li; YING, Guang-Guo; ZHAO, Jian-Liang; LIU, Shan; YANG, Bin; ZHOU, Li-Jun; TAO, Ran e SU, Hao-Chang. Assessing estrogenic activity in surface water and sediment of the Liao River system in northeast China using combined chemical and biological tools. Environmental Pollution. 2011. 159(1), 148-156.

WELSHONS, Wade V.; THAYER, Kristina A.; JUDY, Barbara M.; TAYLOR, Julia A.; CURRAN, Edward M. e VOM SAAL, Frederick S. Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity. Environ Health Perspect. 2003. 111(8), 994–1006.

XU, Nan; XU, Yi-Feng; XU, Shou; LI, Jing; TAO, Hu-Chun. Removal of estrogens in municipal wastewater treatment plants: A Chinese perspective. Environmental Pollution. 2012. 165, 215-224.

XUAN, Richeng; BLASSENGALE, Alma A. e WANG, Qiquan. Degradation of estrogenic hormones in a silt loam soil. J Agric Food Chem, 2008. 56, 9152-8.

ZHOU, Yiqi; ZHA, Jinmiao; XU, Yiping; LEI, Bingli e WANG, Zijian. Occurrences of six steroid estrogens from different effluents in Beijing, China. Environmental Monitoring and Assessment. 2012. 184, 1719-1729.

Processo de Avaliação por Pares: (*Blind Review* - Análise do Texto Anônimo)

Revista Científica Vozes dos Vales - UFVJM - Minas Gerais - Brasil

www.ufvjm.edu.br/vozes

QUALIS/CAPES - LATINDEX: 22524

ISSN: 2238-6424