



UFG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE QUÍMICA

NOVA ESTRATÉGIA PARA ANÁLISE DE CONTAMINANTES
EMERGENTES EM ÁGUAS RESIDUAIS INDUSTRIAIS POR
ESPECTROMETRIA DE MASSAS AMBIENTE (PSI-MS)

Marcella Ferreira Rodrigues

Orientador: Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz

Goiânia
2018

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES
ELETRÔNICAS DE TESES E
DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Marcella Ferreira Rodrigues
Título do trabalho: Nova estratégia para análise de contaminantes emergentes em águas residuais industriais por espectrometria de massas ambiente (PSI-MS).

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹
Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Marcella Ferreira Rodrigues

Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:

Daniel Fortes UFG

Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 02 / 04 / 2018

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente
- Submissão de artigo em revista científica
- Publicação como capítulo de livro
- Publicação da dissertação/tese em livro

²A assinatura deve ser escaneada.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE QUÍMICA

NOVA ESTRATÉGIA PARA ANÁLISE DE CONTAMINANTES
EMERGENTES EM ÁGUAS RESIDUAIS INDUSTRIAIS POR
ESPECTROMETRIA DE MASSAS AMBIENTE (PSI-MS)

Marcella Ferreira Rodrigues

Dissertação apresentada ao Instituto
de Química da Universidade Federal
de Goiás como exigência parcial,
para obtenção do título de Mestre
em Química.

Orientador: Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz

Goiânia
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Ferreira Rodrigues, Marcella

Nova estratégia para análise de contaminantes emergentes em águas residuais industriais por espectrometria de massas ambiente (PSI-MS). [manuscrito] / Marcella Ferreira Rodrigues. - 2018.
74 f.

Orientador: Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química (IQ), Programa de Pós-Graduação em Química, Goiânia, 2018.
Bibliografia.
Inclui siglas, tabelas, lista de figuras.

1. Espectrometria de massas ambiente. 2. Paper spray ionization.
3. Contaminantes emergentes. 4. Águas residuais industriais. I. Gontijo Vaz, Boniek, orient. II. Título.

CDU 54



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ-IQ)

Ata da defesa de Dissertação de Mestrado de Marcella Ferreira Rodrigues, aluna regularmente matriculada no Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, para a obtenção do título de Mestra em Química.

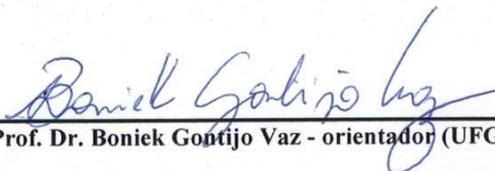
Ao dia 28 (vinte e oito) de fevereiro do ano de 2018 (dois mil e dezoito), com início às 09:00 hs (nove horas) no Instituto de Química da UFG, reuniu-se a Banca Examinadora designada pela Coordenadoria do Programa de Pós-Graduação em Química da UFG, composta pelos seguintes doutores: Prof. Boniek Gontijo Vaz (UFG), Prof. Eric de Souza Gil (UFG) e Prof. Wendell Karlos Tomazelli Coltro (UFG), sob a presidência do primeiro, para julgar a dissertação de MARCELLA FERREIRA RODRIGUES intitulada: "Nova estratégia para análise de contaminantes emergentes em águas residuais industriais por espectrometria de massas ambiente (PSI-MS)". O presidente da Banca Examinadora abriu a sessão prestando esclarecimentos sobre os trâmites da avaliação e, em seguida, passou a palavra à candidata para que a mesma fizesse uma exposição do seu trabalho. Terminada a exposição, a candidata foi arguida pelos membros da Banca Examinadora e, após as arguições, foi determinado um intervalo de tempo para que a banca, em sessão fechada, procedesse ao julgamento do trabalho. O resultado do julgamento foi o seguinte:

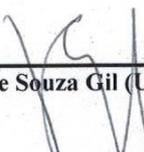
Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz: Aprovado

Prof. Dr. Eric de Souza Gil: Aprovado

Prof. Dr. Wendell Karlos Tomazelli Coltro: Aprovado

A seguir, na presença do público e da candidata, o presidente da Banca Examinadora declarou que Marcella Ferreira Rodrigues, candidata ao título de Mestra em Química foi: Aprovada (X); Reprovada (). Este resultado deverá ser homologado pela Coordenadoria de Pós-Graduação do Programa de Pós-Graduação em Química do IQ/UFG. Nada mais havendo a tratar, o Senhor Presidente cumprimentou a candidata e encerrou os trabalhos. E para constar, eu, Lídia dos Santos Ferreira de Freitas, lavrei a presente ata que segue assinada pelos membros da banca examinadora. Goiânia, 28 de fevereiro de 2018.


Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz - orientador (UFG)


Prof. Dr. Eric de Souza Gil (UFG)


Prof. Dr. Wendell Karlos Tomazelli Coltro (UFG)

A minha mãe Mariselma e ao meu
amado esposo Werlon!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por suas promessas.

À minha mãe Mariselma pelo amor incondicional e pela confiança em mim depositada.

Ao meu amado esposo Werlon, por todo companheirismo, dedicação, por toda ajuda, muito obrigada.

Aos meus irmãos Leandro e Luciano e minhas cunhadas pelo apoio e incentivo.

Ao meu orientador professor Dr. Boniek Gontijo Vaz, pela confiança, incentivo, pelo esforço em proporcionar um excelente local de trabalho e pela expectativa em mostrar que podemos ser melhores do que o que somos.

Aos meus colegas do LaCEM, pela ajuda e por compartilharem de seus conhecimentos.

Ao Ruiteir Lima pela colaboração.

Ao CNPQ, pelo apoio financeiro e ao programa de pós-graduação em Química do IQ-UFG.

A todos que de alguma forma contribuíram para a concretização deste trabalho, muito obrigada.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS, CÓDIGOS, SIGLAS E UNIDADE DE MEDIDAiv	
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Espectrometria de massas	2
1.2. Fontes de ionização.....	4
1.3. Analisadores de massa	8
1.4. Água e poluentes.....	11
2. OBJETIVOS	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1. Coleta da água	21
3.2. Materiais, reagentes e padrões	21
3.3. Papel parafinado.....	21
3.4. Preparo de amostra	22
3.5. PSI-MS	22
3.6. Curva de calibração.....	23
3.7. Figuras de mérito.....	23
3.8. Condições cromatográficas	25
3.9. Condições experimentais dos espectrômetros de massas	25

3.9.1.	Analisador orbitrap.....	25
3.9.2.	Analisador Q-TOF.....	26
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1.	Método PSI-MS.....	28
4.1.1.	Amostra.....	28
4.1.2.	Otimização do método.....	29
4.1.3.	Determinação quantitativa dos hormônios em águas residuais industriais.	35
4.1.4.	Figuras de mérito.....	39
4.2.	Método LC-MS.....	42
4.2.1.	Otimização do método.....	42
4.2.3.	Figuras de mérito.....	46
5.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	49
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema geral de um espectrômetro de massas.....	3
Figura 2: Esquema de uma fonte de ionização por electrospray (Adaptado de NANOTECHNOLOGY SOLUTIONS, 2013).....	5
Figura 3: Esquema do Paper Spray Ionization (Adaptado de Liu <i>et. al.</i> , 2010).	6
Figura 4: Ilustração de um analisador Orbitrap (Adaptado de ELIUK e MAKAROV, 2015).....	9
Figura 5: Representação do analisador de massas Q-TOF, adaptado (BRUKER Corporation, 2018).....	11
Figura 6: Possíveis rotas de entrada de fármacos no meio ambiente, adaptado de (ESPLUGAS <i>et al.</i> , 2007).....	13
Figura 7: Representação estrutural do levonorgestrel.	15
Figura 8: Fórmula estrutural do gestodene.	15
Figura 9: Fórmula estrutural da Algestona Acetofenida.	16
Figura 10: Esquema da fonte <i>homemade</i> de Paper Spray Ionization.....	23
Figura 11: Espectro de PSI(+) obtido com 15 µL da amostra de água residual.	29
Figura 12: Cromatograma de íon extraído para o analito levonorgestrel e o padrão interno gestodene (a) e cromatograma de íon extraído para o analito algestona acetofenida e o padrão interno gestodene (b).	31
Figura 13: Espectro de massas PSI(+) para levonorgestrel (a) e PSI(+) para algestona acetofenida (b).	33
Figura 14: Espectro de massas PSI(+)MS/MS para levonorgestrel (a) e PSI(+)MS/MS para algestona acetofenida (b).	34

Figura 15: Espectros de massa obtidos com levonorgestrel (2-20 ppm) usando padrão interno (IS) gestodene (10 ppm) para amostra 1 (a) e para amostra 2 (b).....	36
Figura 16: Espectros de massa obtidos com algestona acetofenida (2,2-20 ppm) usando padrão interno (IS) gestodene (10 ppm) para amostra 1 (a) e espectros de massa obtidos com algestona acetofenida (2,4-20 ppm) usando padrão interno (IS) gestodene (10 ppm) para amostra 2.	37
Figura 17: Curvas analíticas para o método PSI-MS(+) para os hormônios levonorgestrel e algestona acetofenida em amostra de água residual industrial.	38
Figura 18: Gráfico concentração teórica versus concentração medida para os hormônios levonorgestrel e algestona acetofenida.....	39
Figura 19: Cromatograma dos íons totais (a); espectro de massas relativo ao tempo 7,2 min (b) e espectro de massas relativo ao tempo 8,9 min adquiridos nas condições otimizadas de análise.	44
Figura 20: Curvas analíticas para o método LC-MS(+) para o hormônio levonorgestrel em amostra de água residual industrial.....	45
Figura 21: Gráfico concentração teórica <i>versus</i> concentração medida para o hormônio levonorgestrel.	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Método de preparação de amostras para diferentes EDCs em matrizes de água, adaptado de (LOCATELLI <i>et al.</i> , 2016).	17
Tabela 2: Métodos da literatura para análise de contaminantes emergentes.	40
Tabela 3: Valores de precisão e exatidão intra-dias e inter-dias e recuperação para o método de PSI-MS com papel cromatográfico parafinado.	41
Tabela 4: Condições cromatográficas avaliadas na otimização do método.	42
Tabela 5: Valores de precisão e exatidão intra-dias e inter-dias e recuperação para o método de LC-MS.	47
Tabela 6: Valores comparativos entre PSI-MS e LC-MS para o hormônio Levonorgestrel.	47

LISTA DE ABREVIATURAS, CÓDIGOS, SIGLAS E UNIDADE DE MEDIDA

A1	-	Amostra 1
A2	-	Amostra 2
ANVISA	-	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	-	Ionização química a pressão atmosférica
API	-	Ionização a pressão atmosférica
APPI	-	Fotoionização a pressão atmosférica
ASTM	-	American Society for Testing and Materials
CONAMA	-	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DAPCI	-	<i>Desorption Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>
DAPPI	-	<i>Desorption Atmospheric Pressure Photo-ionization</i>
DART	-	<i>Direct Analysis in Real Time</i>
DCBI	-	<i>Desorption Corona Beam Ionization</i>
DESI	-	<i>Desorption Electrospray Ionization</i>
EASI	-	<i>Easy Ambient Sonic-Spray Ionization</i>
ECs	-	Contaminantes emergentes
EDCs	-	Disruptores endócrinos
EICs	-	Cromatogramas dos íons extraídos
ESI	-	Ionização por Electrospray
HPLC	-	<i>High Performance Liquid Chromatograph</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
IS	-	Intenal Standard (Padrão interno)
LAESI	-	<i>Laser Ablation Electrospray Ionization</i>
LC	-	<i>Liquid Chromatograph</i> (Cromatografia Líquida)
LDESI	-	<i>Laser Desorption Electrospray Ionization</i>

LLE	-	Extração Líquido-Líquido
LOD	-	Limite de detecção
LOQ	-	Limite de quantificação
LTP	-	<i>Low-temperature Plasma Ionization</i>
[M+H] ⁺	-	Íon protonado
[M-H] ⁻	-	Íon desprotonado
<i>m/z</i>	-	massa-sobre-carga
MS	-	Espectrometria de massas
MS/MS	-	Espectrometria de massas tandem
PPCPs	-	Produtos de cuidados pessoais
PSI	-	Ionização por paper spray
ppm	-	Parte por Milhão
SPE	-	Extração em Fase Sólida
TOF	-	Analisador de massas <i>Time of Flight</i>

RESUMO

A água é um recurso natural essencial para vida que ultimamente está comprometido pela descarga de contaminantes emergentes, dentre os quais, hormônios sintéticos. Esses compostos podem ser lançados diretamente através de efluentes industriais e indiretamente através de esgoto doméstico. O monitoramento de contaminantes emergentes (ECs) no ambiente aquático tem se tornado uma prioridade, visto que eles apresentam riscos para a saúde humana e para meio ambiente devido a sua capacidade de desregular o sistema endócrino. Dessa forma, é necessário análises de verificação dos contaminantes emergentes produzidos pelas indústrias farmacêuticas. Os métodos analíticos mais comuns para análises dessa classe de compostos envolvem o uso de cromatografia líquida ou gasosa, acoplado a espectrometria de massas tandem (MS/MS) com procedimentos de preparos de amostras demorados e longas corridas cromatográficas. Neste trabalho desenvolveu-se uma metodologia para análise de contaminantes emergentes em água residual industrial bruta e tratada de uma linha de produção de hormônios de uma indústria local, por uma técnica de ionização ambiente conhecida como *Paper Spray Ionization* (PSI), cuja principal vantagem é o preparo mínimo de amostra. Neste trabalho, a técnica de PSI com papel contendo barreiras de parafinas foi empregada para análise de hormônios em águas residuárias. As análises dos hormônios sintéticos levonorgestrel e algestona acetofenida ocorreram através da adição da amostra sobre um papel triangular que foi umedecido com solução de metanol (0,1% de ácido fórmico). O papel foi fixado na entrada do espectrômetro de massas através de um clipe metálico que forneceu uma voltagem ao papel. As curvas analíticas apresentaram coeficiente de correlação linear acima de 0,99. Para o hormônio levonorgestrel a precisão intra-dias e inter-dias variou de 0,5 a 5,3%, a exatidão variou de -7,0 a 4,2% enquanto a recuperação variou de 82,2 a 101,3%. Para o hormônio algestona acetofenida a precisão intra-dias e inter-dias variou de 0,9 a 10,7%, a exatidão variou de -7,7 a 8,9% enquanto a recuperação variou de 88,4 a 101,6%. O hormônio levonorgestrel também foi analisado com o método clássico LC-MS, mostrando resultados consistentes entre as duas abordagens, confirmando assim a confiabilidade do método proposto.

ABSTRACT

Water is an essential natural resource for life that is compromised by the release of emerging contaminants, including synthetic hormones. These compounds can be released directly through industrial effluents and indirectly through domestic sewage. Monitoring emergent contaminants (ECs) in the aquatic environment has become a priority as they pose risks to human health and the environment because of their ability to deregulate the endocrine system. Thus, verification analyzes of the emerging contaminants produced by the pharmaceutical industries are required. The most common analytical methods for analysis of this class of compounds involve the use of liquid or gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry (MS / MS) with procedures for the preparation of long samples and long chromatographic runs. In this study, a methodology was developed for the analysis of emerging contaminants in raw and treated industrial wastewater from a local industry's hormone production line by an environmental ionization technique known as Paper Spray Ionization (PSI). Here, we have proposed an analytical approach based on the use of waxed papers. Analyzes of the synthetic hormones levonorgestrel and algestone acetophenide occurred by adding the sample to a triangular paper that was moistened with methanol solution (0.1% formic acid). The paper was fixed at the input of the mass spectrometer through a metal clip which provided a voltage to the paper. The analytical curves presented a linear correlation coefficient above 0.99. For the hormone levonorgestrel the intra-day and inter-day precision ranged from 0.5 to 5.3%, accuracy ranged from -7.0 to 4.2% while recovery ranged from 82.2 to 101.3%. For the hormone algestone acetophenide the intra-day and inter-day precision ranged from 0.9 to 10.7%, accuracy ranged from -7.7 to 8.9% while recovery ranged from 88.4 to 101.6%. The levonorgestrel hormone was also analyzed with the classic LC-MS method, showing consistent results between the two approaches, thus confirming the reliability of the proposed method.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Espectrometria de massas

A espectrometria de massas (MS) é uma técnica analítica capaz de detectar e determinar uma quantidade de um dado analito. A MS é também usada para determinar a composição elementar e alguns aspectos da estrutura molecular de um analito. Estas aptidões são realizadas pela determinação experimental da *massa/carga* (m/z) em fase gasosa dos íons produzidos das moléculas de um analito (HOFFMANN e STROOBANT, 2007).

A informação obtida por um espectro de massas pode ser útil tanto na identificação quanto na quantificação das mais variadas moléculas em diferentes tipos de matrizes. Um espectrômetro de massas (**Figura 1**) é constituído por fonte de ionização, um ou mais analisadores de massas, um sistema de detecção e um sistema para processar o sinal.

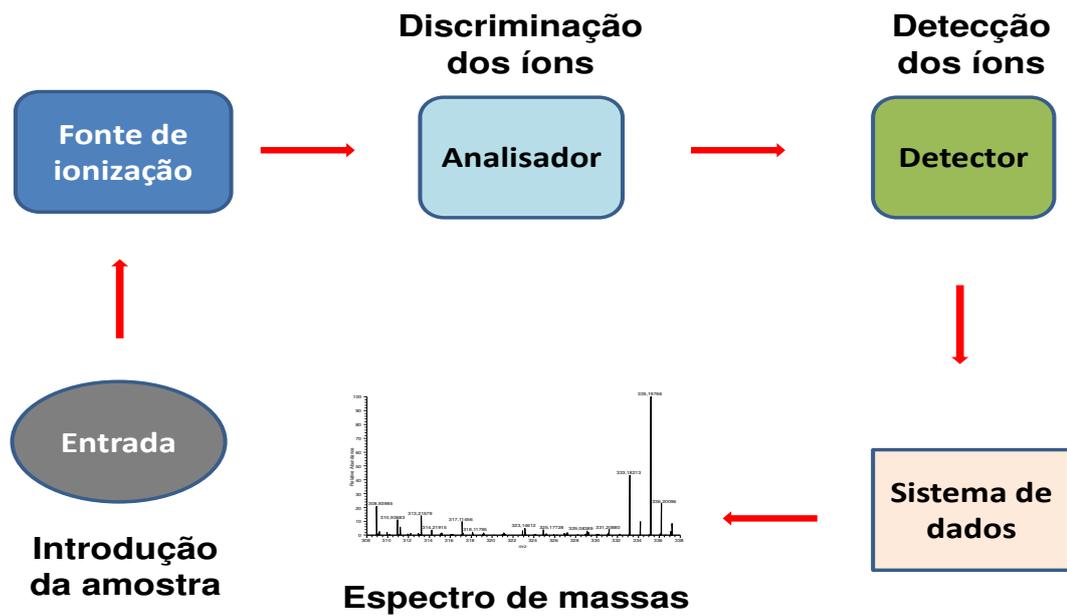


Figura 1: Esquema geral de um espectrômetro de massas.

Em MS, a etapa de ionização é uma etapa crítica. Sem íons não é possível determinar qualquer m/z , ou seja, não há um experimento de MS. É a fonte de ionização que dita a versatilidade da técnica.

1.2. Fontes de ionização

As primeiras fontes de ionização, *electron ionization* (EI) e *chemical ionization* (CI) (HOFFMANN e STROOBANT, 2007), por necessitarem das moléculas em fase gasosa e operarem em alto vácuo, se aplicavam apenas à moléculas de baixo peso molecular, voláteis e termicamente estáveis.

Com o advento de novas técnicas de ionização, como *electrospray ionization* (ESI) (ALBERICI *et al.*, 2010), *atmospheric pressure photon ionization* (APPI) (PURCELL *et al.*, 2006), *matrix-assisted laser ionization* (MALDI) (ZENOBİ e KNOCHENMUSS, 1998), onde os íons são gerados de forma mais branda e por estratégias que não necessitam de alto vácuo, uma revolução ocorreu na MS, sendo que agora é possível acessar praticamente quaisquer tipos de moléculas.

O método de ionização mais empregado na MS é o *electrospray ionization* (ESI) (ALBERICI *et al.*, 2010). A característica principal deste modo de ionização (**Figura 2**) é que os íons são gerados em solução e transferidos para fase gasosa por um modo muito brando, ou seja, geram pouco ou nenhum fragmento das moléculas (LI *et al.*, 2015).

Os compostos ácidos são analisados no modo de ionização negativo com a adição de hidróxido de amônio gerando íons $[M-H]^-$. A análise de moléculas com caráter básico ocorre no modo de ionização positivo com adição de ácido fórmico gerando íons $[M+H]^+$ (KEBARLE e VERKERK, 2009).

A diferença de potencial entre o capilar e a entrada do analisador forma um campo elétrico que promove a formação de um spray eletrolítico da solução da amostra. O gás de nebulização (N_2) auxilia na dessolvatação das gotas.

Existem dois processos para a evaporação dos íons presentes nas gotículas do spray. Através de sucessivas ficções dessas gotículas devido a alta repulsão entre elas devido à mesma carga vai haver a formação de

gotículas com apenas uma carga em seu interior que é o chamado modelo de carga residual (KEBARLE e VERKERK, 2009). O segundo modelo afirma que a dessolvatação dessas gotículas ocasiona a repulsão das cargas e o íon vai ser ejetado da gotícula para o estado gasoso sendo esse modelo conhecido como modelo de evaporação dos íons (KEBARLE e VERKERK, 2009).

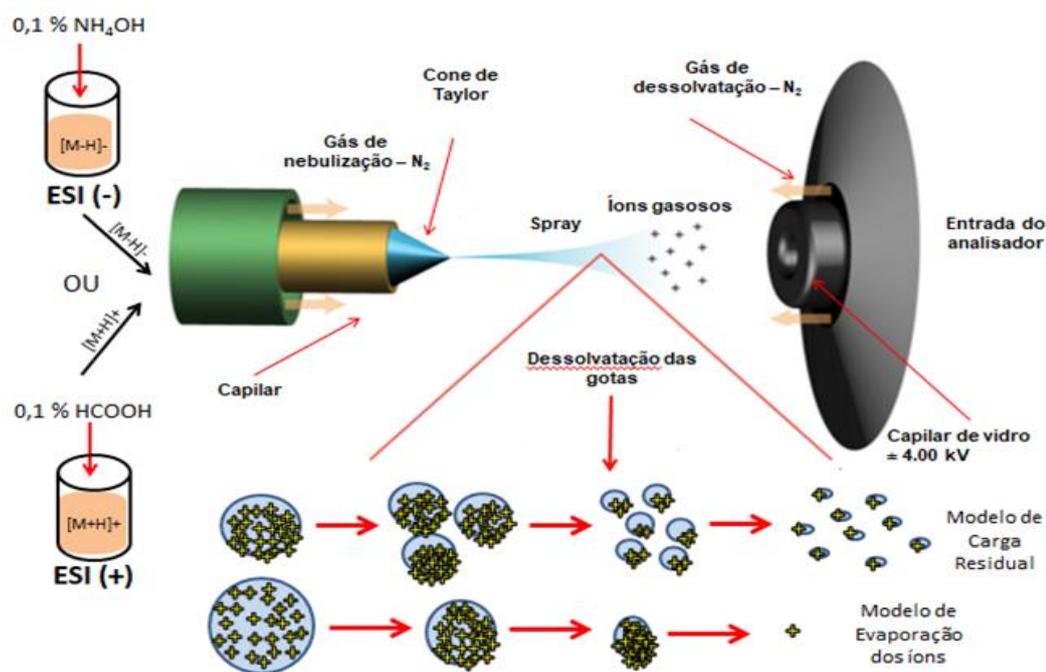


Figura 2: Esquema de uma fonte de ionização por electro spray (Adaptado de NANOTECHNOLOGY SOLUTIONS, 2013).

Recentemente ocorreu uma nova revolução na MS com a introdução de técnicas de ionização/dessorção conhecidas como espectrometria de massas ambiente (AMS) (ALBERICI *et al.*, 2010). Essas técnicas consistem na detecção e quantificação do analito no ambiente natural da amostra com pouco ou nenhum preparo de amostra (HUANG *et al.*, 2011). As primeiras fontes de ionização ambiente desenvolvidas foram *Direct Analysis in Real Time* (DART) e *Desorption Electrospray Ionization* (DESI). Em seguida várias outras técnicas de ionização ambiente surgiram como *Desorption Atmospheric Pressure Photo-ionization* (DAPPI), *Desorption Atmospheric Pressure Chemical Ionization* (DAPCI), *Desorption Corona Beam Ionization*

(DCBI), *Easy Ambient Sonic-Spray Ionization* (EASI), *Laser Ablation Electrospray Ionization* (LAESI), *Laser Desorption Electrospray Ionization* (LDESI), *Low-temperature Plasma Ionization* (LTP) and *Paper Spray Ionization* (PSI) (PEREIRA *et al.*, 2016).

Dentre essas técnicas de ionização ambiente a que tem ganhado destaque nos últimos anos é a PSI (**Figura 3**). A ionização ocorre adicionando a amostra em um pedaço de papel triangular e os íons são gerados a partir da aplicação de uma elevada voltagem no papel molhado (WANG *et al.*, 2010). A diferença de voltagem entre o papel e a entrada do espectrômetro de massas forma um campo elétrico. Esse campo elétrico permite que a solução com analitos chegue à ponta do papel formando spray na forma de cone de Taylor (YANG *et al.*, 2012). O método de ionização é similar ao ESI, sendo a diferença, é que no ESI a ionização é promovida no capilar e no PS a ionização é promovida no papel com efeito similar ao do capilar.

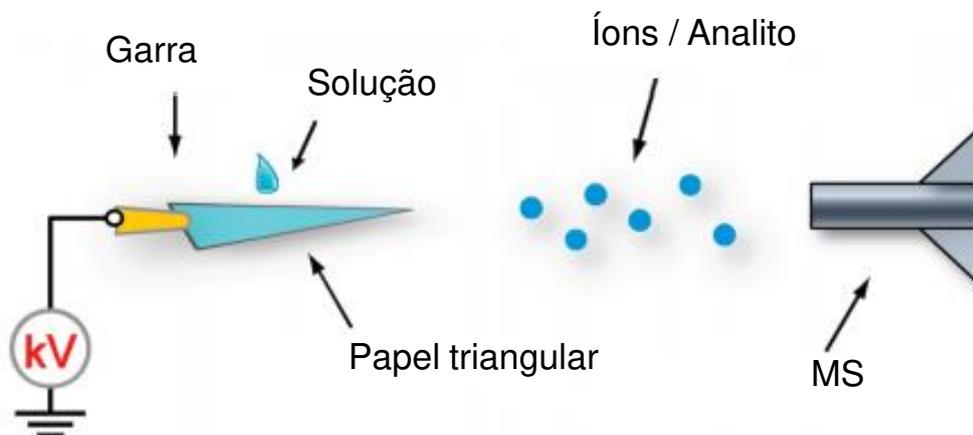


Figura 3: Esquema do Paper Spray Ionization (Adaptado de Liu *et al.*, 2010).

Uma das limitações do PS, principalmente para análises quantitativas, é que o spray é formado em todas as pontas do triângulo devido o espalhamento da solução sobre todo o papel. Uma abordagem para solucionar esta problemática, foi desenvolvida por COLLETES *et al.*, 2016,

que consistiu em construir um canal hidrofóbico no papel. Este canal, construído com parafina, tem a função de conduzir a solução na direção da entrada do MS, inibindo o espalhamento da mesma.

O PSI-MS já foi aplicado com sucesso em diversas áreas como: análises de agroquímicos (PEREIRA *et al.*, 2016), cafeína em bebidas e drogas (TAVERNA *et al.*, 2016), drogas de abuso (SU *et al.*, 2013), proteínas (ZHANG *et al.*, 2014), monitoramento de reações (HSU *et al.*, 2014) e qualidade de alimentos (TAVERNA *et al.*, 2013). A literatura registra análises de contaminantes emergentes em água por PSI-MS (REEBER *et al.*, 2015; MAHER *et al.*, 2016), porém não há registros quanto à aplicação do PSI na caracterização de hormônios em águas residuais industriais.

1.3. Analisadores de massa

Existem diversos tipos de analisadores em espectrometria de massas e aqueles com o maior poder de resolução são o de Ressonância Ciclotrônica de Íons (ICR) e *orbitrap* (**Figura 4**), sendo este o mais recente em espectrometria de massas.

No *orbitrap* a discriminação dos íons é realizada em função da frequência de oscilação do íon em um campo eletrostático (PERRY, COOKS e NOLL, 2008). O *orbitrap* é antecedido do C-trap, um dispositivo cuja função é introduzir os íons dentro da cela do *orbitrap* com a velocidade necessária para orbitarem ao redor do eletrodo central. Por meio de colisões com nitrogênio ainda no C-trap, os íons tem sua energia cinética (E_c) diminuída. Os íons serão ejetados tangencialmente para dentro do analisador quando tiverem E_c aproximadas, e serão aprisionados em torno do eletrodo central que está sob uma alta voltagem.

Devido ao forte campo eletrostático os íons são puxados para a região equatorial do analisador e iniciarão oscilações axiais evitando queda dos íons no eletrodo central (MAKAROV e SCIGELOVA, 2010).

Íons com mesma m/z oscilam com a mesma frequência e induzem uma corrente que é detectada por sensores presentes nas paredes externas do *orbitrap* – sinal no domínio de corrente. Este sinal é convertido em domínio de frequência pela transformada de Fourier e, em seguida, por outras operações matemáticas, no espectro de massas m/z .

Como um instrumento de alta resolução, o *orbitrap* fornece determinações de m/z com alta exatidão o que nos possibilita determinar a fórmula molecular para as m/z detectadas. Com isso, é possível análise de misturas complexas, e o mesmo tem sido muito empregado em áreas como proteômica, glicômica, lipidômica, análise de resíduos e contaminantes em água e alimentos, onde uma elevada resolução por parte da espectrometria de massas é necessária.

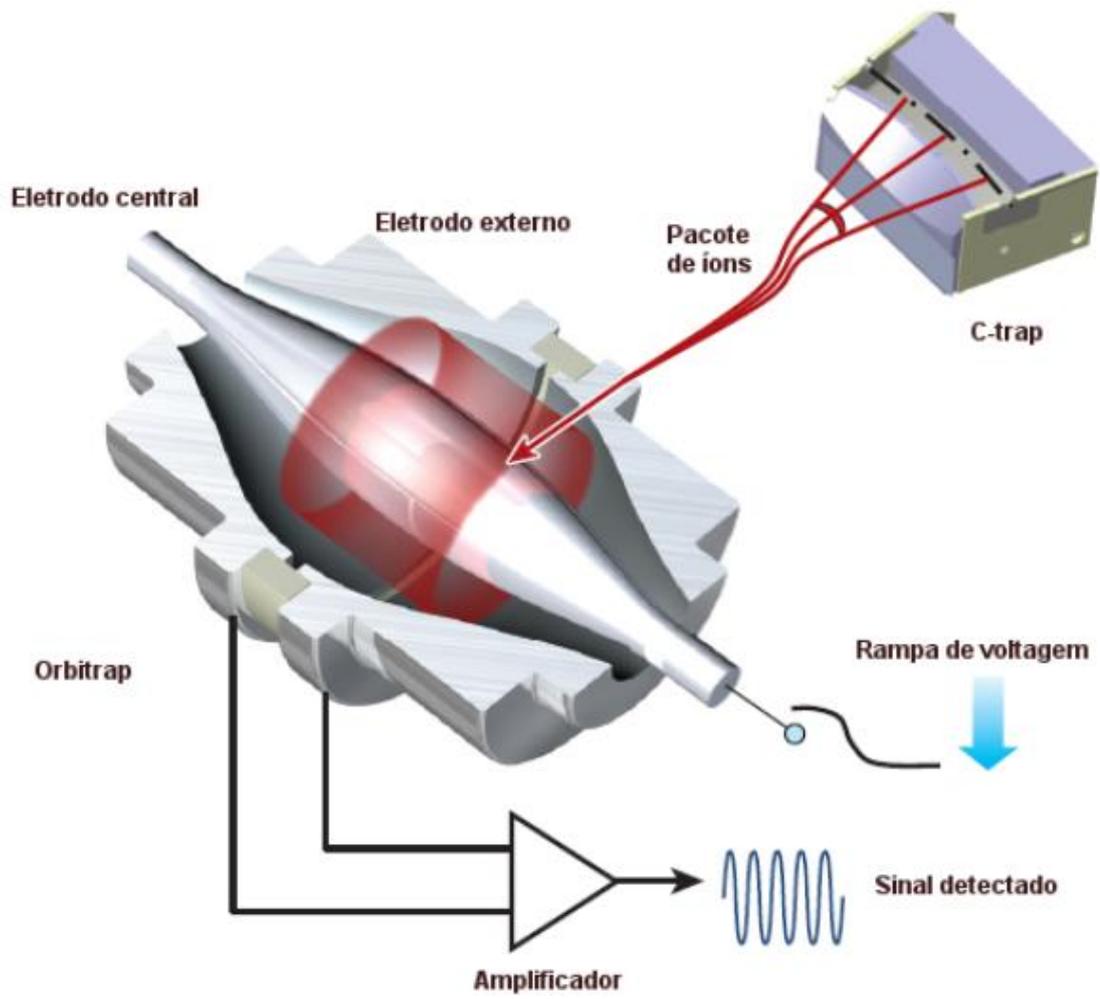


Figura 4: Ilustração de um analisador Orbitrap (Adaptado de ELIUK e MAKAROV, 2015).

Outro analisador que faz a discriminação das m/z com elevada resolução e exatidão é o *Time of Flight* (TOF). O princípio de operação do TOF é medir o tempo necessário para que íons de diferentes razões m/z viajem por um caminho de comprimento conhecido. No TOF todos os íons são acelerados na mesma voltagem (GROSS, 2011). Os íons iniciarão a sua jornada ao mesmo tempo, íons mais leves chegarão primeiro ao detector. O TOF é um analisador que não apresenta limite de massa. Pacotes de íons são mandados para dentro do tubo para chegarem até o analisador. A separação de massa ocorre pelo tempo.

O TOF se caracteriza como analisador viável para acoplamento com cromatografia líquida (LC).

A Cromatografia Líquida de Alta Performance (CLAE) do inglês *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) é uma técnica analítica de separação extremamente útil que consiste em uma fase estacionária e outra fase móvel (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006).

A fácil combinação de ESI com LC permitiu a análise de misturas complexas. Essa abordagem de alta capacidade para caracterização molecular também depende do alto poder de resolução dos sistemas LC-MS/MS, que inclui várias configurações de analisadores híbridos como o *quadrupole time-of-flight* (Q-TOF) (HERNÁNDEZ *et al.*, 2012). Seus componentes estão ilustrados na **Figura 5**.

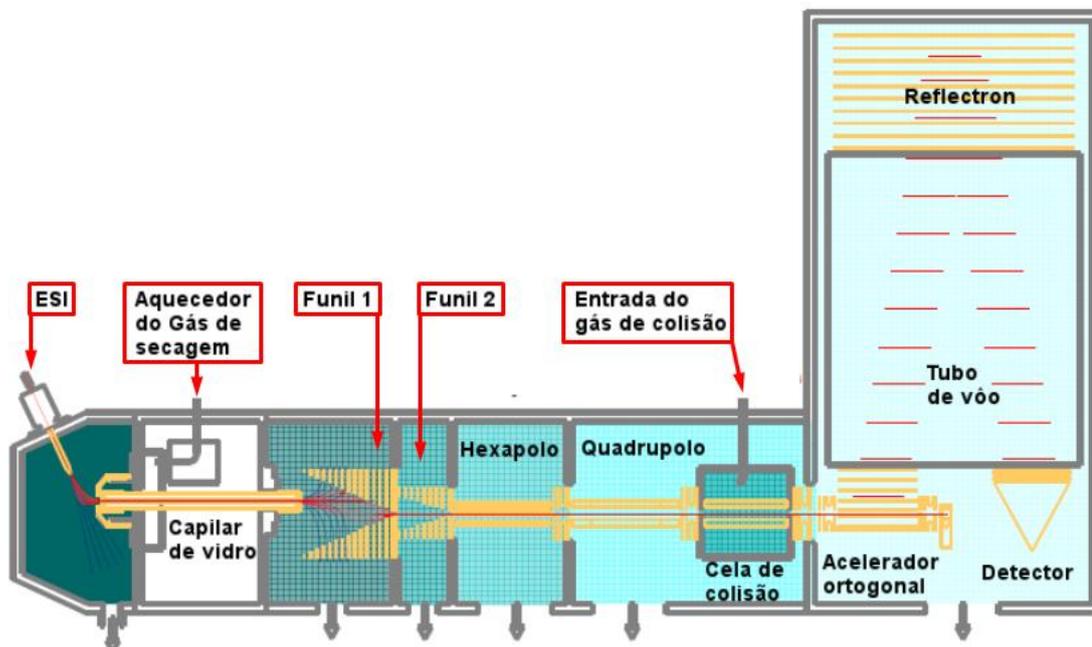


Figura 5: Representação do analisador de massas Q-TOF, adaptado (BRUKER Corporation, 2018).

1.4. Água e poluentes

A água é um recurso natural essencial para a vida, sendo atualmente um dos tópicos mais relevantes na química ambiental, com foco na qualidade deste recurso, pois o mesmo vem sendo comprometido pela descarga de contaminantes emergentes (ECs).

Os ECs incluem uma série de novas moléculas como os hormônios sintéticos, mas também incluem moléculas já conhecidas como os hormônios naturais. O termo emergente está relacionado ao fato de que recentemente a exposição humana a esses compostos passou a ser preocupante.

Atualmente, o desenvolvimento mundial é responsável pela descarga de poluentes orgânicos sintéticos e poluentes emergentes nos corpos da água (WHO, 1998; NÖDLER *et al.*, 2016; PEREIRA *et al.*, 2015). Estes poluentes são produzidos por atividades antropogênicas como indústria

química, farmacêutica, petroquímica, mineral dentre outras. Devido ao aumento dos poluentes na água, o monitoramento da qualidade da água é um marco para promover a sustentabilidade e deve ser uma prioridade em termos de pesquisa e desenvolvimento.

Nesse sentido, as indústrias farmacêuticas são uma fonte de poluição das águas superficiais. Os fármacos são descartados diretamente ou indiretamente na água após seu uso, por isso pode ser considerado como risco para a saúde humana e para o ecossistema (ARCHER *et al.*, 2017).

Em todo o mundo produtos farmacêuticos são detectados em águas residuais, desde produtos de cuidados pessoais (PPCPs), anti-inflamatórios não esteroidais, hormônios sintéticos ou fármacos anticancerígenos (LIU e WONG, 2013; YANG *et al.*, 2017; FERRANDO-CLIMENT, RODRIGUEZ-MOZAZ e BARCELÓ, 2014; CAUSANILLES *et al.*, 2017).

A principal rota de entrada de resíduos de fármacos no ambiente é o lançamento de esgotos domésticos, tratados ou não, em cursos de água. Os efluentes de indústrias farmacêuticas, efluentes rurais e a presença de fármacos no esterco animal utilizado para adubação de solos também devem ser considerados (ESPLUGAS *et al.*, 2007), conforme pode ser visto na **Figura 6**.

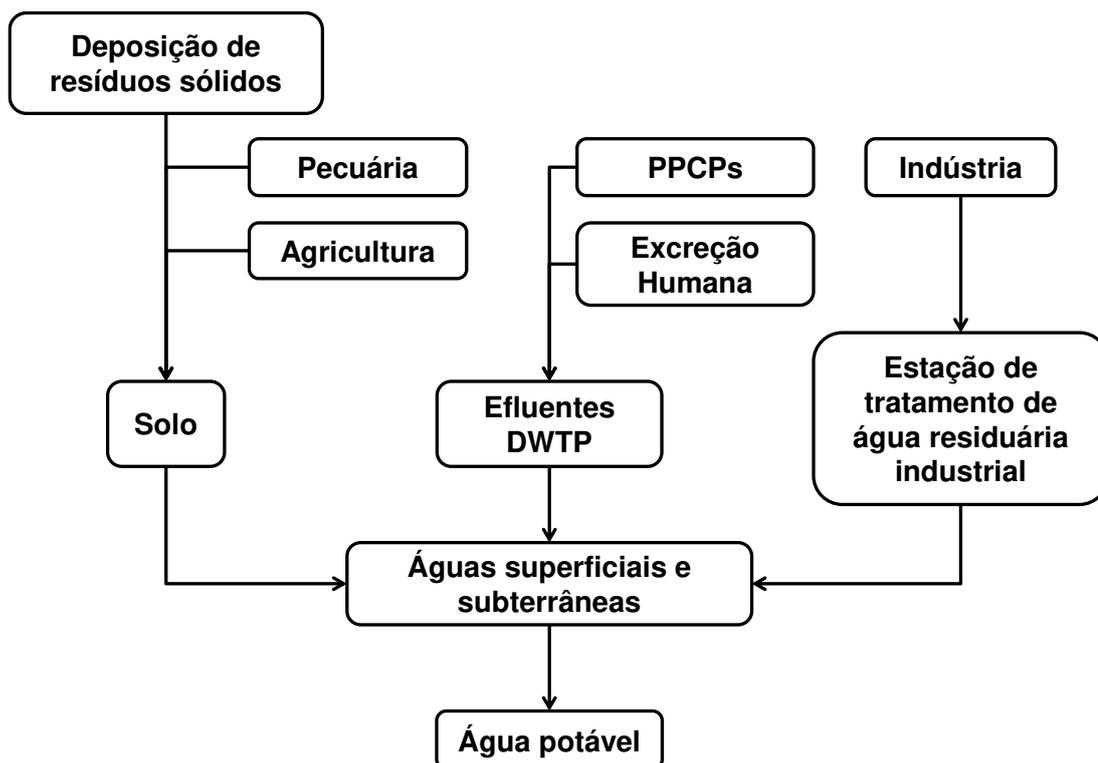


Figura 6: Possíveis rotas de entrada de fármacos no meio ambiente, adaptado de (ESPLUGAS *et al.*, 2007).

O monitoramento de ECs no ambiente aquático tem se tornado progressivamente uma prioridade para as agências reguladoras e para o público de forma geral. Dentre a variedade de compostos considerados como ECs houve preocupação crescente com os chamados disruptores endócrinos (EDCs), como hormônios esteroides que podem afetar a reprodução animal com possíveis implicações também na saúde reprodutiva humana (FAYAD, PRÉVOST e SAUVÉ, 2010).

Os processos convencionais de tratamento de águas, que envolve etapas de coagulação, floculação e sedimentação, têm sido descritos como ineficazes na remoção de fármacos, que incluem os disruptores endócrinos (PAN *et al.*, 2008).

Métodos como oxidação eletroquímica ou eletro-oxidação têm sido utilizados para remoção dos EDCs. Nesses métodos, os compostos orgânicos são removidos quando os elétrons são transferidos diretamente

para a superfície do ânodo, através de eletrólise direta, ou quando espécies reativas de oxigênio atuam na transferência de elétrons entre o composto orgânico e a superfície do eletrodo, através de eletrólise indireta. Na eletrólise indireta pode ocorrer adsorção física do radical hidroxila, promovendo combustão eletroquímica, ou formação de oxigênio ativo quimicamente adsorvido, gerando conversão eletroquímica dos poluentes em compostos biodegradáveis (SIRÉS e BRILLAS, 2012).

Os hormônios sintéticos são comumente usados em métodos contraceptivos, classificados como estrogênios, em tratamentos de infertilidade, reguladores de ciclo menstrual, classificados como progestagênios e apresentam uma variedade de princípios ativos como: enantato de noretisterona, valerato de estradiol, algestona acetofenida, enantato de estradiol, acetato de ciproterona, etinilestradiol, gestodene e levonorgestrel.

Os progestagênios como levonorgestrel, gestodene e algestona acetofenida em geral são rapidamente absorvidos pelo organismo, e então, metabolizados no fígado.

Levonorgestrel (**Figura 7**) é o hormônio contraceptivo feminino sintético mais utilizado na prevenção da gravidez em humanos. Tem forte atividades progestativas e anti-ovulativas sem efeitos estrogênicos. Levonorgestrel é rapidamente e completamente absorvido na circulação sistêmica após administração oral (biodisponibilidade de cerca de 100%) (WANG *et al.*, 2016).

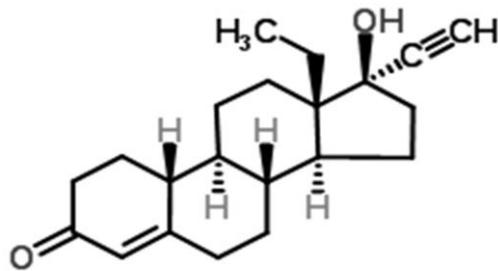


Figura 7: Representação estrutural do levonorgestrel.

Gestodene (**Figura 8**) é um progestagênio estruturalmente relacionado com o levonorgestrel. Ele é usado como o componente progestagênico de contraceptivos orais combinados e também na reposição hormonal na menopausa. Gestodene é amplamente utilizado em contraceptivos orais combinados de baixa dose por sua alta eficácia, segurança e aceitabilidade (ENRÍQUEZ *et al.*, 2017).

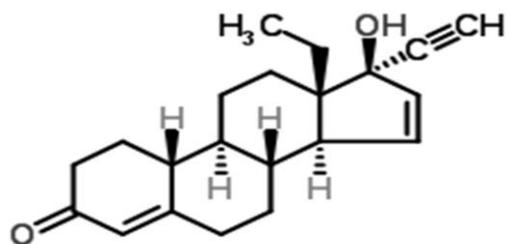


Figura 8: Fórmula estrutural do gestodene.

Algestona acetofenida (**Figura 9**) é um potente anticoncepcional injetável inibidor da ovulação. Os contraceptivos injetáveis são o segundo método mais utilizado no Brasil porque permite uma boa alternativa

terapêutica contraceptiva às mulheres. O mecanismo de ação ocorre através da supressão da ovulação, do espessamento do muco cervical, do desenvolvimento folicular e da redução de espessura endometrial (BORGES *et al.*, 2015).

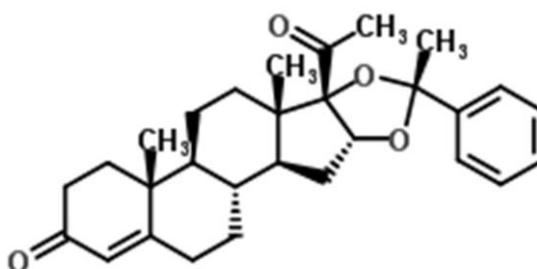


Figura 9: Fórmula estrutural da Algestona Acetofenida.

O crescente uso de contraceptivos orais e injetáveis é um indicador de poluição das águas ambientais, desde a produção industrial até a excreção humana. Como a detecção e quantificação do levonorgestrel, gestodene, algestona acetofenida e de outros desreguladores endócrinos são relativamente recentes, a legislação CONAMA 430/2011, que trata da gestão do lançamento de efluentes em corpos de águas receptores não estabelece limites das concentrações mínimas permitidas para o descarte de hormônios em águas superficiais e subterrâneas.

Numerosos métodos analíticos foram desenvolvidos para identificar e quantificar hormônios esteroides em matrizes de água. Classicamente as determinações de quantificação de hormônios são realizadas utilizando técnicas hífenadas como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada a um espectrômetro de massas. Essa técnica requer um preparo mais elaborado de amostras (FAYAD, PRÉVOST e SAUVÉ, 2010).

Tradicionalmente as análises são feitas por extração em fase sólida (SPE) ou extração líquido-líquido (LLE).

A **Tabela 1** apresenta métodos de preparo de amostra para determinação de hormônios em água segundo a descrição de Locatelli *et al.*, 2016.

Tabela 1: Método de preparação de amostras para diferentes EDCs em matrizes de água, adaptado de (LOCATELLI *et al.*, 2016).

Analito	Matriz	Preparo da amostra
E1,E2,E3	Água natural	SPE
E1,E2,E3,DES,PROG,NOR,LEV	Água de rio	SPE
17 α - EE	Efluentes	SPE; LLE
PROG	Efluentes	SPE, sílica gel 60, derivatização
E2,EE,E1	Efluentes e outros tipos de amostras	LLE

E1: estrona; E2: estradiol; E3: estriol; DES: dietilestilbestrol; PROG: progesterona; NOR: noretindrona; LEV: levonorgestrel; EE: etinilestradiol.

As análises de identificação e quantificação de hormônios esteroides requerem exaustivos e demorados protocolos de preparo de amostras além de longas corridas cromatográficas, o que é um empecilho para a realização de um grande número de amostras (FAYAD, PRÉVOST e SAUVÉ, 2010).

Neste sentido, a técnica de ionização ambiente PSI-MS aparece como alternativa simplificada para a detecção e quantificação de hormônios esteroides em seu ambiente natural, com o mínimo preparo de amostra.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo é o desenvolvimento e a validação de método PSI-MS com papel parafinado para análise dos hormônios levonorgestrel e algestona acetofenida em amostras de águas residuais industriais. Desta forma, os objetivos específicos deste estudo são:

- Otimização das condições de análise do PSI-MS.
- Otimização das condições de separação cromatográfica.
- Análise quantitativa de amostras de água residuais industriais do hormônio algestona acetofenida por PSI-MS.
- Análise quantitativa de amostras de água residuais industriais do hormônio levonorgestrel por PSI-MS e LC-MS.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Coleta da água

Amostras de águas residuais industriais foram cedidas por uma indústria farmacêutica local (Goiânia, Goiás, Brasil). As amostras foram coletadas pela própria indústria farmacêutica de uma linha onde somente hormônios são produzidos. As amostras foram identificadas como Amostra 1 (A1), referente ao efluente não tratado e Amostra 2 (A2), referente ao efluente tratado por um processo de eletro-oxidação.

3.2. Materiais, reagentes e padrões

Os reagentes analíticos Metanol grau HPLC e ácido fórmico foram adquiridos de J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA) e Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), respectivamente. Os padrões analíticos levonorgestrel e gestodene foram obtidos de Sigma-Aldrich e o padrão analítico algestona acetofenida foi obtido de Clearsynth. Papel cromatográfico grau 1 (porosidade de 11 micrometros) foi adquirido de Whatman (Whatman International Ltd., Maidstone, England).

3.3. Papel parafinado

A fabricação do papel parafinado foi realizada conforme estudo reportado por DE TARSO GARCIA, *et al.*, 2014. Inicialmente, uma folha de papel de filtro foi imersa em parafina líquida (a 90°C) durante 1 minuto. O papel foi então removido da parafina, solidificado a temperatura ambiente e depois colocado na superfície de outro papel nativo, sem parafina. Um carimbo metálico foi pré-aquecido a 150 °C em uma placa quente por 2 minutos e entrou em contato com o papel parafinado para estampar a

estrutura microfluídica no papel nativo, formando assim as barreiras hidrofóbicas.

Mediante essa metodologia, o papel cortado em triângulo equilátero com 1 cm de lado foi colocado entre a folha de papel sulfite e o papel de filtro parafinado. A seguir, um carimbo de metal pré-aquecido a 180^o C em estufa por 2 minutos foi utilizado para transferir por pressão a parafina para o papel triangular formando assim, a barreira hidrofóbica.

3.4. Preparo de amostra

Para a técnica de paper spray e técnica cromatográfica as amostras de águas residuais industriais não foram submetidas à extração. Solução estoque dos padrões analíticos levonorgestrel, algestona acetofenida e gestodene foram preparadas em metanol na concentração de 1ppm. As soluções a serem analisadas foram preparadas a partir de 500 μ L de cada amostra de água residual industrial (previamente identificadas em amostra 1 e amostra 2) adicionadas com 10 μ L de padrão interno gestodene a partir da solução estoque de 1ppm. Alíquotas das soluções estoque dos padrões analíticos foram adicionadas à solução para obter as concentrações de 2 - 20 ppm; 2,2 - 20 ppm e 2,4 - 20 ppm e completadas com metanol grau HPLC ao volume final de 1 mL.

Para a análise cromatográfica as amostras de levonorgestrel foram centrifugadas, o sobrenadante foi retirado, colocado no recipiente de vidro vial e então injetado no equipamento.

3.5. PSI-MS

A base do papel foi fixada a um clipe metálico onde uma alta tensão foi aplicada. A quantidade de 15 μ L da solução de metanol com 0,1% de ácido fórmico foi utilizada como solvente para formação do spray (**Figura 10**).

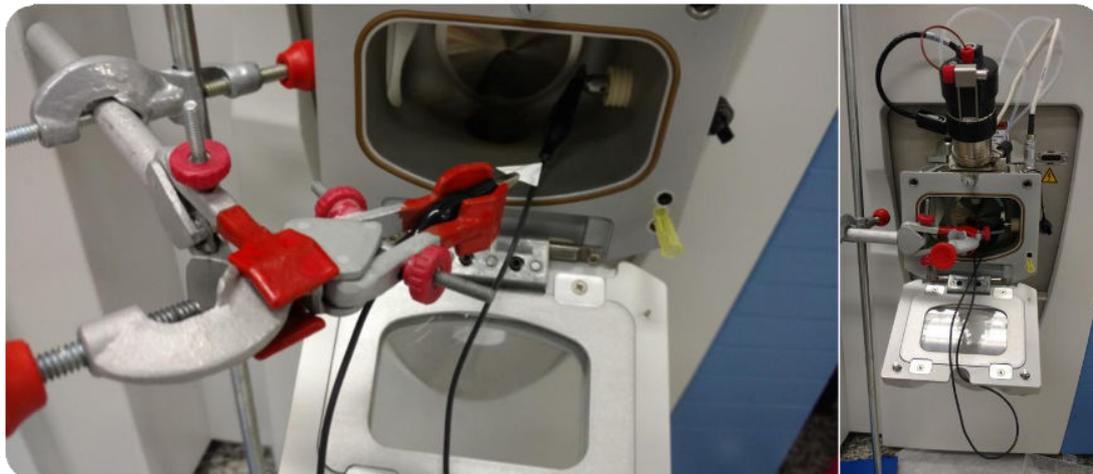


Figura 10: Esquema da fonte *homemade* de Paper Spray Ionization.

3.6. Curva de calibração

Curvas de calibração por adição de padrão foram construídas pela relação entre a área do cromatograma de íons extraídos (EICs) dos analitos de interesse e a área do cromatograma de íons extraídos do padrão interno. Gestodene (10 ppm) foi utilizado como padrão interno para análises com os hormônios levonorgestrel e algestona acetofenida. A quantidade de 15 μ L da amostra foi adicionada ao papel parafinado e submetida a secagem por aproximadamente três minutos. As análises foram realizadas em quintuplicata.

As curvas de calibração, realizadas em quintuplicata para as análises cromatográficas foram construídas em função das áreas dos picos cromatográficos do levonorgestrel e gestodene. O volume de 20 μ L foi utilizado para as injeções cromatográficas.

3.7. Figuras de mérito

O desempenho dos métodos de PSI-MS com a utilização de papel parafinado e LC-MS foram avaliados através da estimativa da precisão e exatidão (intra-dias e inter-dias), linearidade, recuperação, limite de quantificação (LOQ) e limite de detecção (LOD).

A normativa estabelecida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em resolução RDC nº 27 de 17 de maio de 2012 foi utilizada para verificar a validação do método proposto.

A precisão (equação 1) e exatidão (equação 2) intra-dias e inter-dias foram calculadas segundo as equações:

$$CV(\%) = \frac{DP}{CMD} \cdot 100 : \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

CV= coeficiente de variação

DP= desvio padrão entre as medidas

CMD= concentração média determinada

$$E(\%) = \frac{CME-CN}{CN} \cdot 100 : \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

E= exatidão

CME= concentração média experimental

CN= concentração nominal

Os valores de recuperação foram obtidos de acordo com a equação 3:

$$R(\%) = \frac{C_1-C_2}{C_3} \cdot 100 : \quad (\text{Equação 3})$$

Onde:

R= recuperação

C₁= concentração determinada na amostra adicionada

C₂= concentração determinada na amostra não adicionada

C₃= concentração adicionada

Para o estudo da linearidade, curvas analíticas foram construídas, sendo o eixo x o da concentração e o eixo y o da resposta obtida.

Os limites de quantificação (LOQ) e detecção (LOD) foram avaliados de acordo com a Resolução n° 899, de 29 de maio de 2003 e estão apresentados nas equações 4 e 5.

$$\text{LOQ} = \frac{10 \cdot \text{dp}}{a} : \quad (\text{Equação 4})$$

$$\text{LOD} = \frac{3 \cdot \text{dp}}{a} : \quad (\text{Equação 5})$$

Onde:

dp= desvio padrão de dez análises do branco

a= coeficiente angular da reta na curva analítica

3.8. Condições cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo líquido Shimadzu LC-20A, com detector por UV/VIS Shimadzu SPD-20A em comprimento de onda de 225 nm. As separações foram realizadas em coluna Phenomenex Luna C-8 (5 µm, 150 x 4,6 mm). A fase móvel empregada foi acetonitrila e água acidificada com 0,1% de ácido fórmico 50:50, v/v, no modo isocrático com vazão de 1000 µL.min⁻¹.

3.9. Condições experimentais dos espectrômetros de massas

3.9.1. Analisador orbitrap

Os espectros de massa foram obtidos utilizando um espectrômetro de massas Orbitrap Q Exactive da Thermo Scientific. Todas as análises de PSI-MS foram realizadas no modo de ionização positivo e o modo de aquisição

utilizado foi selected ion monitoring (SIM) com uma resolução de 70000. Outros parâmetros experimentais usados foram: voltagem do spray: 3,5 kV; Temperatura do capilar: 275 °C; S-lente Nível de RF: 50%; Média de 3 micro-scans para cada espectro; Resolução de 70.000; MS/MS: HCD (Higher Energy Collisional Dissociation), energia de colisão: 35 eV.

3.9.2. Analisador Q-TOF

O espectrômetro de massas utilizado nos experimentos cromatográficos foi o micrOTOF-Q III fabricado pela Bruker. Os experimentos foram realizados no modo de ionização positivo, com fluxo de 12 L.min⁻¹ do gás de secagem, temperatura do gás de secagem de 220°C, pressão do nebulizador foi de 5,5 bar, voltagem no capilar foi de 4000 V.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Método PSI-MS

4.1.1. Amostra

No primeiro momento para verificar espécies presentes na amostra de água e a eficiência de ionização do *paper spray* aplicou-se 15 µL da amostra de água cedida pela indústria farmacêutica sobre o papel triangular. A **figura 11** mostra que dois hormônios foram detectados como aduto de sódio $[M + Na]^+$, os íons de m/z 335,21790 e 471,25107, referentes , respectivamente ao levonorgestrel e algestona acetofenida.

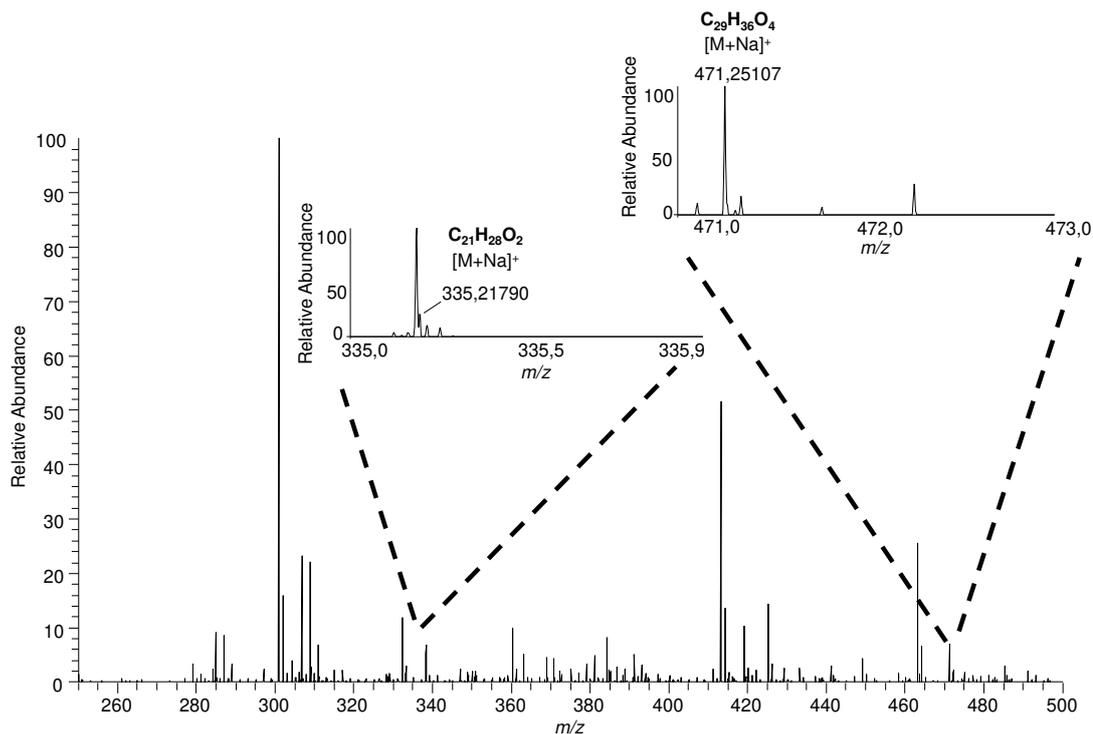


Figura 11: Espectro de PSI(+) obtido com 15 μ L da amostra de água residual.

4.1.2. Otimização do método

A distância entre o papel cromatográfico parafinado e a entrada do MS é um parâmetro muito importante no PSI-MS. Distâncias superiores a 5 mm possibilita que a intensidade do sinal decaia rapidamente e distâncias inferiores a 5 mm possibilita o risco de descargas elétricas que podem gerar danos ao equipamento (LIU, 2010). Portanto, o papel cromatográfico parafinado foi mantido a uma distância de 5 mm da entrada do espectrômetro de massas. As demais condições de operação foram baseadas no trabalho de Collettes *et. al.*, 2016.

Uma maneira de verificar a eficiência e a estabilidade da ionização da técnica PSI-MS é através dos cromatogramas de íons extraídos (EICs) realizados neste estudo. A **Figura 12** representa o cromatograma de íon extraído para o hormônio levonorgestrel e seu respectivo padrão interno

gestodene (**Figura 12a**) e para o hormônio algestona acetofenida e seu respectivo padrão interno gestodene (**Figura 12b**). Após a adição do solvente (metanol com 0,1 % de ácido fórmico), ligou-se a voltagem até o decaimento de sinal para cada ciclo de análise.

O decaimento de sinal é explicado pela evaporação do metanol acidificado que é utilizado para auxiliar no processo de ionização. Note que o perfil obtido dos EICs para ambos os hormônios avaliados sugere-se uma boa repetibilidade e a cada ciclo de análise, a magnitude da corrente iônica gerada é similar.

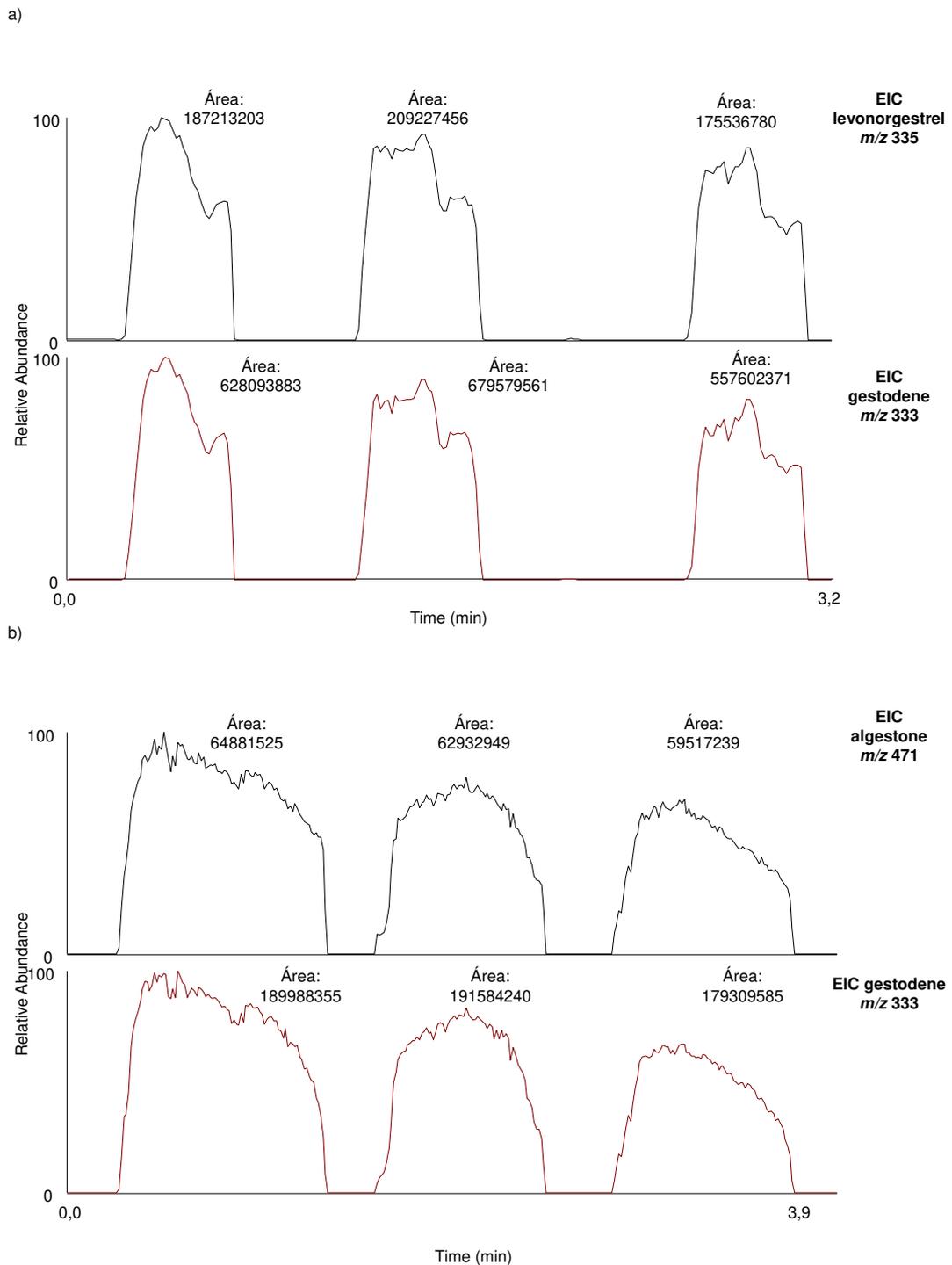


Figura 12: Cromatograma de íon extraído para o analito levonorgestrel e o padrão interno gestodene (a) e cromatograma de íon extraído para o analito algestona acetofenida e o padrão interno gestodene (b).

A Figura 13 ilustra os espectros de massas para o hormônio levonorgestrel (**Figura 13a**) e algestona acetofenida (**Figura 13b**) na

concentração de 20 ppm. Os dois hormônios analisados, foram detectados como aduto de sódio $[M+Na]^+$, com exatidão de massa menor que 1 ppm. A detecção majoritária como aduto de sódio deve-se a baixa basicidade dos hormônios. Já a Figura 14, ilustra os espectros de MS/MS para os dois hormônios analisados. O espectro de levonorgestrel (**Figura 14a**) apresenta um fragmento principal com m/z 149,02348 que diz respeito à perda de $C_{11}H_{15}ONa$ consistente com a clivagem do anel. O espectro de algestona acetofenida (**Figura 14b**) mostrou perda de $C_{22}H_{29}O_3$, clivagem do anel, gerando íon produto com m/z 130,15923.

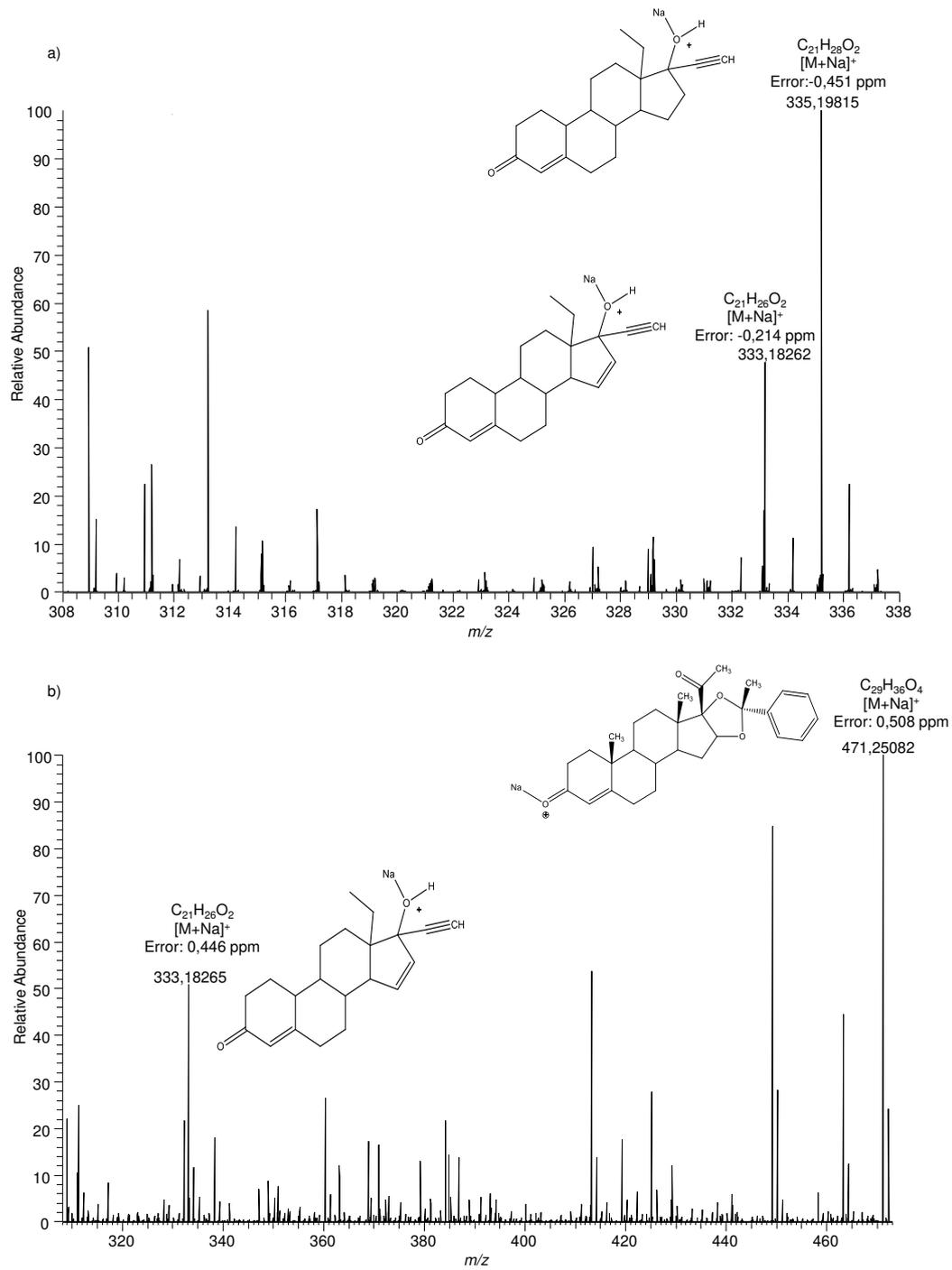


Figura 13: Espectro de massas PSI(+) para levonorgestrel (a) e PSI(+) para algestona acetofenida (b).

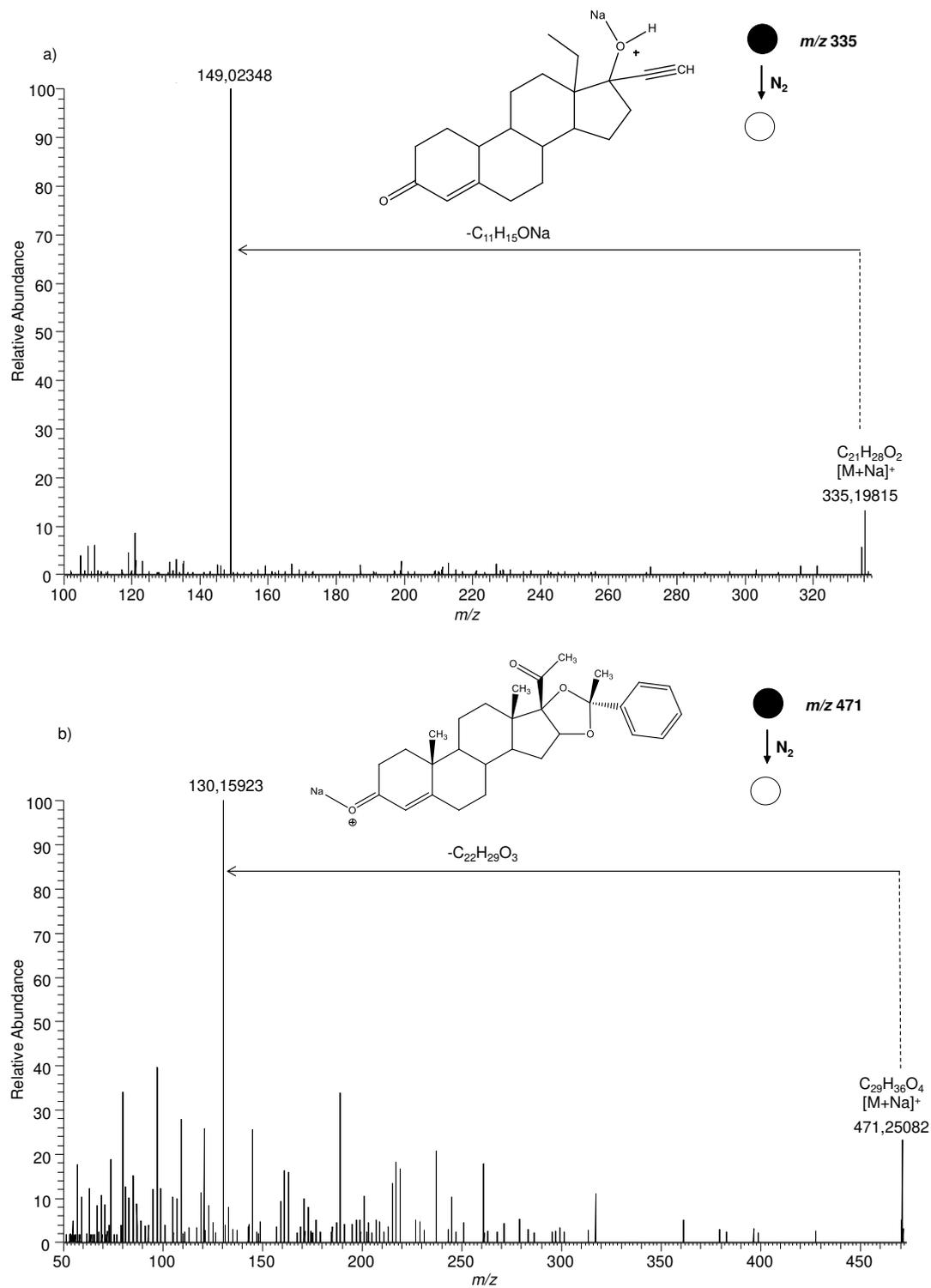


Figura 14: Espectro de massas PSI(+)*MS/MS* para levonorgestrel (a) e PSI(+)*MS/MS* para algestona acetofenida (b).

4.1.3. Determinação quantitativa dos hormônios em águas residuais industriais.

A **Figura 15a** mostra espectros de levonorgestrel (2-20 ppm) para amostra 1 e a **Figura 15b** mostra espectros de levonorgestrel (2-20 ppm) para amostra 2. A **Figura 16a** apresenta espectros de algestona acetofenida (2,2-20 ppm) para amostra 1 e a **Figura 16b** mostra espectros de algestona acetofenida (2,4-20 ppm) para amostra 2.

Observa-se que com o aumento da concentração dos analitos há um aumento da intensidade absoluta dos mesmos em relação ao padrão interno. Isso se dá pelo fato do padrão interno ser uma espécie de referência, química ou física similar ao analito. Sendo, portanto, considerada a razão entre o sinal do analito e o da espécie de referência (LANÇAS, 2004).

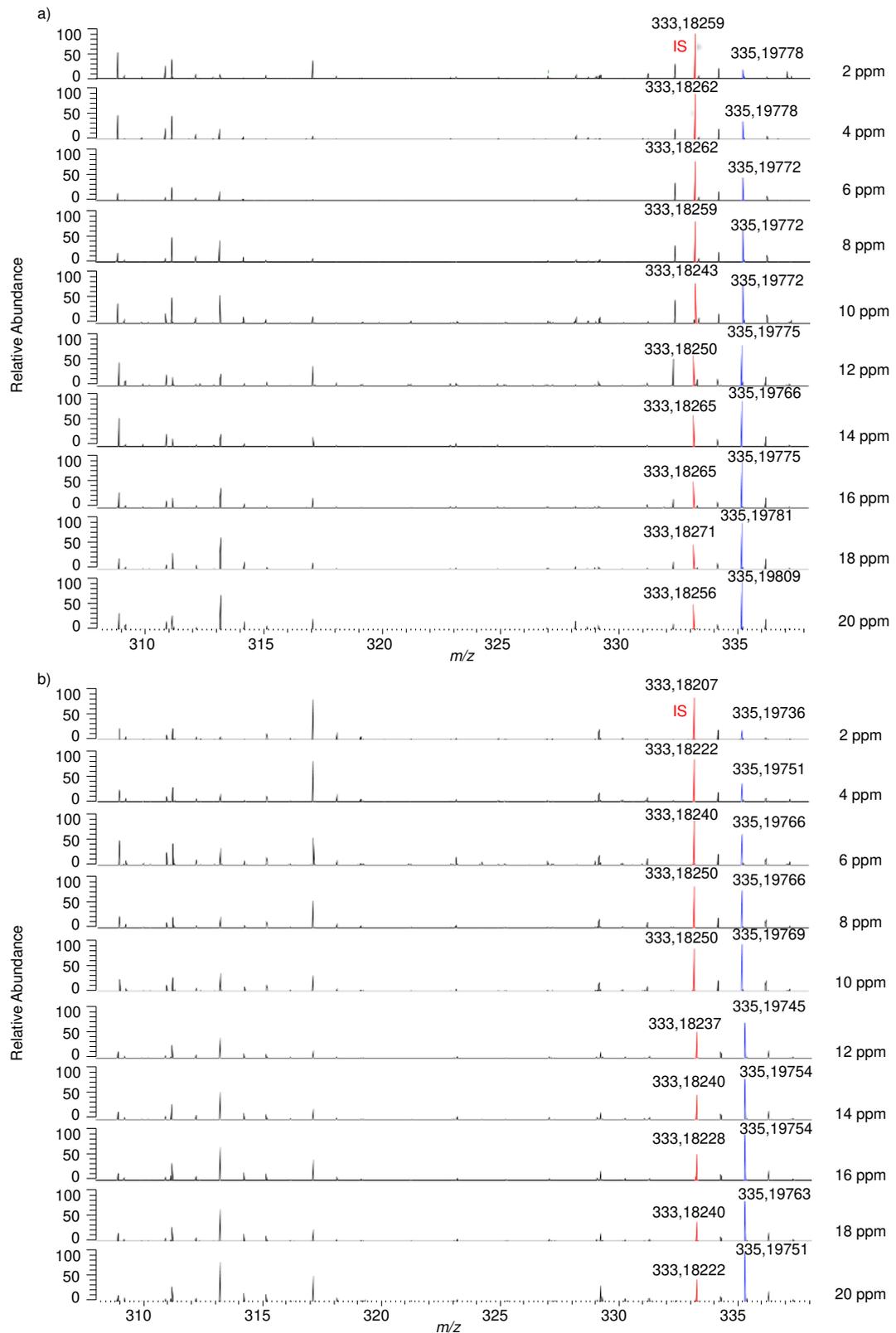


Figura 15: Espectros de massa obtidos com levonorgestrel (2-20 ppm) usando padrão interno (IS) gestodene (10 ppm) para amostra 1 (a) e para amostra 2 (b).

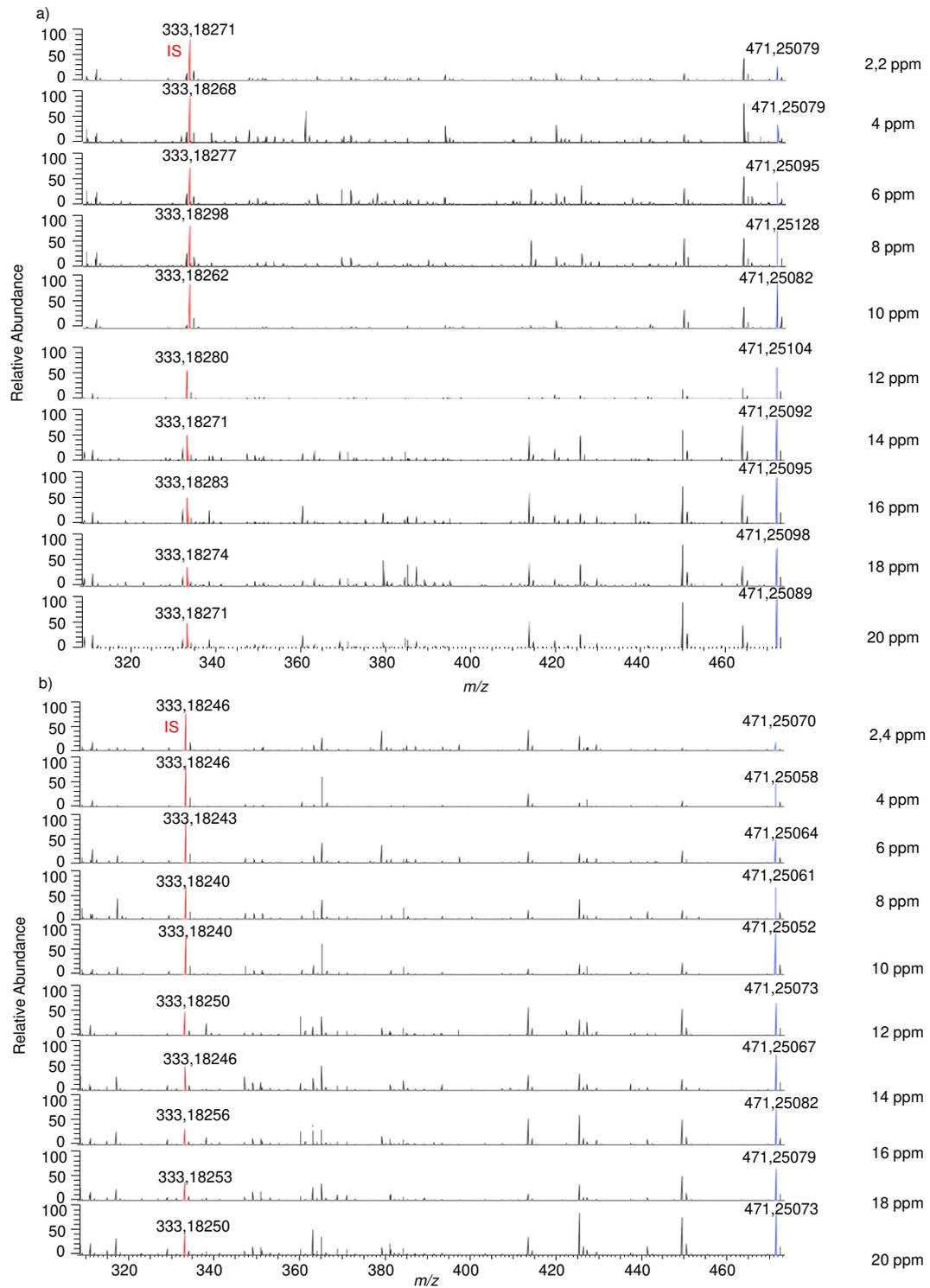


Figura 16: Espectros de massa obtidos com algestona acetofenida (2,2-20 ppm) usando padrão interno (IS) gestodene (10 ppm) para amostra 1 (a) e espectros de massa obtidos com algestona acetofenida (2,4-20 ppm) usando padrão interno (IS) gestodene (10 ppm) para amostra 2.

Através das curvas de calibração construídas (**Figura 17**) foi possível verificar que o quadrado do coeficiente de correlação foi maior do que 0,99, uma vez que os valores ideais esperados para o coeficiente de correlação (R) são 1 e -1 (LEITE, 2008). As curvas atendem com mérito o parâmetro linearidade.

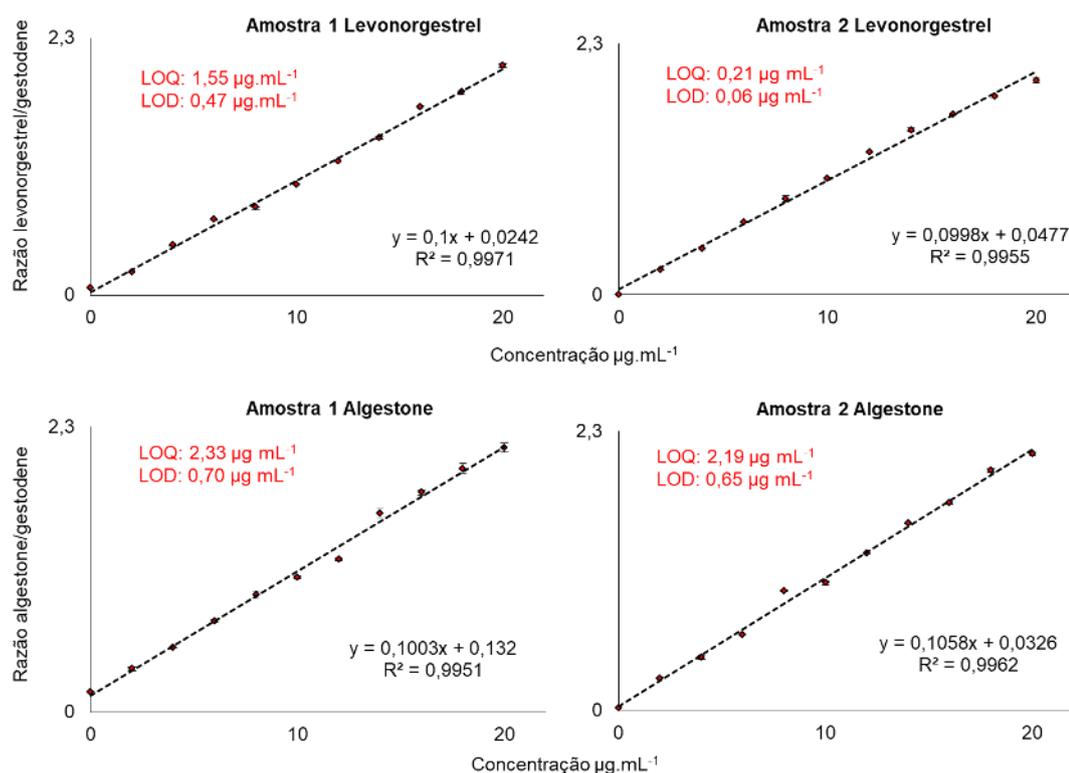


Figura 17: Curvas analíticas para o método PSI-MS(+) para os hormônios levonorgestrel e algestona acetofenida em amostra de água residual industrial.

A correlação entre as concentrações nominais *versus* concentrações medidas foram avaliadas utilizando-se amostras de água residual industrial por adição de padrão nas concentrações de 3; 7; 11; 15 e 19 ppm com concentração fixa de padrão interno de 10 ppm sendo cada um dos pontos avaliados em quintuplicata. Os gráficos (**Figura 18**) mostram que independente do analito os valores medidos se equiparam aos valores teóricos.

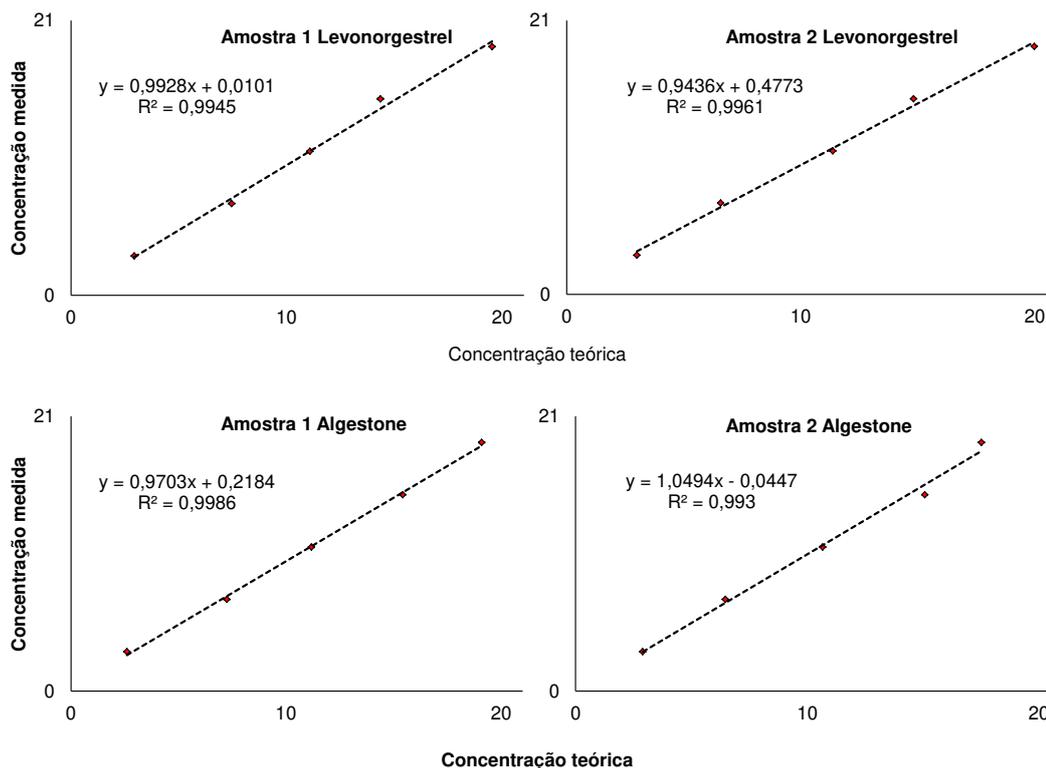


Figura 18: Gráfico concentração teórica versus concentração medida para os hormônios levonorgestrel e algestona acetofenida.

4.1.4. Figuras de mérito

Para o cálculo de LOD e LOQ foram realizadas dez medidas das amostras 1 e 2 preparadas com 500 μ L de água residual industrial acrescidas de 10 μ L de padrão interno gestodene e completadas com metanol grau HPLC ao volume final de 1 mL. As equações 4 e 5 descritas na seção de Materiais e Métodos foram utilizadas para realizar os cálculos. Os limites de quantificação para levonorgestrel foram de 1,51 ppm e 0,21 ppm e para algestona acetofenida foram de 2,33 ppm e 2,19 ppm. Os limites de detecção para levonorgestrel foram 0,47 ppm e 0,06 ppm e para algestona acetofenida foram de 0,70 ppm e 0,65 ppm.

A **Tabela 2** mostra métodos descritos na literatura para análise de contaminantes emergentes na matriz água. Os limites de detecção são encontrados em ng.L⁻¹ enquanto que o método verificado nesse trabalho apresenta limites de detecção na ordem de ppm. Esta diferença deve-se

principalmente pela não utilização da etapa de pré-concentração da amostra no presente estudo em relação aos trabalhos descritos na literatura.

Tabela 2: Métodos da literatura para análise de contaminantes emergentes.

Método	Matriz	Analito	LOD	Referência
SPE-LC-MS/MS	Água potável	Estrona 17 β -estradiol Estriol	0,1; 0,2; 0,2 ng.L ⁻¹	(JARDIM <i>et al.</i> , 2012)
SPE-LC-APPI-MS/MS	Água residual	Levonorgestrel Progesterona Estrone	5; 3; 10 ng.L ⁻¹	(VIGLINO <i>et al.</i> , 2008)
On-line SPE-LC-MS/MS	Água de rio	Estrone Estradiol 17 α -ethinylestradiol	5; 9,7; 49 ng.L ⁻¹	(NALDI <i>et al.</i> , 2016)

A precisão, exatidão e recuperação (**Tabela 3**) foram avaliadas através de três níveis de concentração, baixo (4 ppm), médio (10 ppm) e alto (16 ppm). Para o hormônio levonorgestrel a precisão intra-dias e inter-dias variou de 0,5 a 5,3%, a exatidão variou de -7,0 a 4,2% enquanto a recuperação variou de 82,2 a 101,3%. Para o hormônio algestona acetofenida a precisão intra-dias e inter-dias variou de 0,9 a 10,7%, a exatidão variou de -7,7 a 8,9% enquanto a recuperação variou de 88,4 a 101,6%.

Tabela 3: Valores de precisão e exatidão intra-dias e inter-dias e recuperação para o método de PSI-MS com papel cromatográfico parafinado.

	Amostra 1			Amostra 2			Amostra 1			Amostra 2		
	Levonorgestrel			Levonorgestrel			Algestona			Algestona		
Intradias												
Concentração nominal ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	4	10	16	4	10	16	4	10	16	4	10	16
Precisão (CV%)	1,0	0,9	0,9	2,2	0,5	0,8	0,9	1,3	1,9	10,1	2,6	1,8
Exatidão (E%)	4,2	-3,5	3,4	-7,0	1,7	0,9	-3,8	-5,1	3,3	2,5	-2,2	-2,1
Recuperação %	95,8	93,2	101,0	82,2	97,3	98,1	88,4	91,8	101,0	95,2	94,9	96,1
Interdias												
Concentração nominal ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	4	10	16	4	10	16	4	10	16	4	10	16
Precisão (CV%)	5,3	3,3	3,5	0,8	1,6	0,9	10,1	3,6	3,4	10,7	1,7	1,0
Exatidão (E%)	-1,9	-3,0	-0,5	-5,8	3,2	1,4	0,5	-7,7	1,3	8,9	-4,3	-2,0
Recuperação %	89,7	93,6	97,4	83,3	98,8	98,7	92,8	89,2	99,4	102,0	92,8	96,2

*CV= coeficiente de variação; E= erro relativo

Segundo a ANVISA (2012), são desejáveis valores de exatidão e precisão de -15 a 15 %. São desejáveis valores de recuperação próximos a 100%, porém valores entre 80 e 120% também são aceitáveis, desde que a recuperação seja precisa e exata. O método proposto apresentou valores dentro dos padrões estabelecidos pela ANVISA e mostrou aplicabilidade na análise de misturas complexas.

4.2. Método LC-MS

4.2.1. Otimização do método

Para a validação analítica do método LC-MS as condições cromatográficas foram avaliadas empregando três colunas diferentes, duas fases móveis e três comprimentos de onda, como mostrado na **Tabela 4**.

Tabela 4: Condições cromatográficas avaliadas na otimização do método.

Fase móvel	Coluna	Comprimento de onda
Acetonitrila: água acidificada com 0,1% de ácido fórmico (70:30 v/v)	Agilent XDB C8 (5µm, 150x4.6mm)	245nm
Metanol: água acidificada com 0,1% de ácido fórmico (70:30 v/v)	Agilent XDB C18 (5µm, 150x4.6mm)	245nm
Acetonitrila: água acidificada com 0,1% de ácido fórmico (70:30 v/v)	Phenomenex Luna C18 (5µm, 150x4.6mm)	215nm
Acetonitrila: água acidificada com 0,1% de ácido fórmico (50:50 v/v)	Phenomenex Luna C18 (5µm, 150x4.6mm)	225nm

A maior eficiência cromatográfica foi obtida com a coluna Phenomenex Luna C-18, a fase móvel acetonitrila: água acidificada com 0,1% de ácido fórmico (50:50, v/v) e comprimento de onda de 225 nm. Nessa condição o tempo de retenção para o padrão interno gestodene foi 7,2 min e para o padrão analítico levonorgestrel foi 8,9min. As condições experimentais do espectrômetro de massas foram ajustadas para se adequar ao fluxo e às condições cromatográficas. O cromatograma dos íons totais e os respectivos espectros de massas estão representados na **Figura 19**.

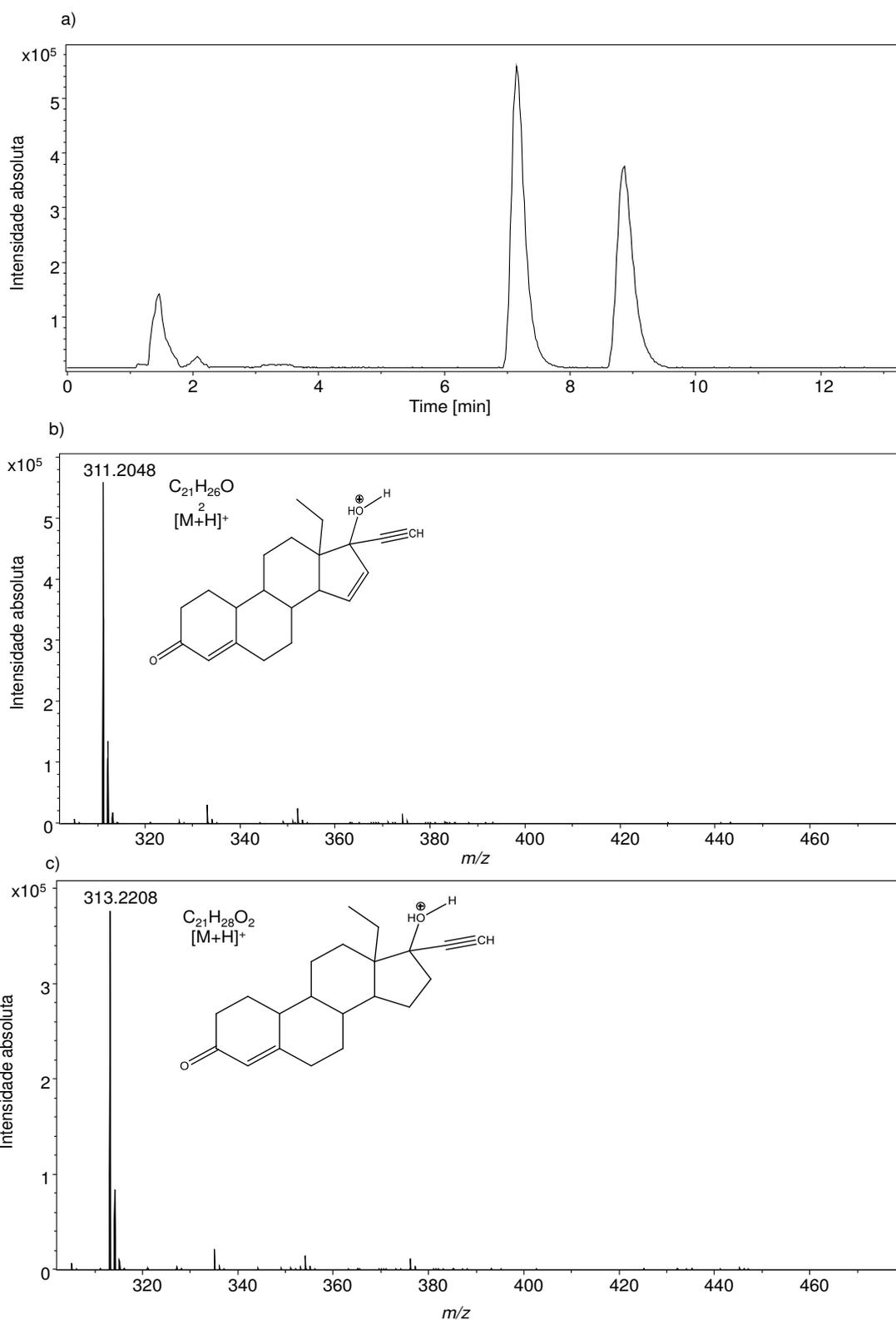


Figura 19: Cromatograma dos íons totais (a); espectro de massas relativo ao tempo 7,2 min (b) e espectro de massas relativo ao tempo 8,9 min adquiridos nas condições otimizadas de análise.

4.2.2. DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DO HORMÔNIO LEVONORGESTREL EM ÁGUAS RESIDUAIS INDUSTRIAIS

Para fins comparativos ao método de PSI-MS curvas de calibração para o hormônio levonorgestrel foram construídas (**Figura 20**) e apresentaram coeficiente de correlação maior do que 0,99.

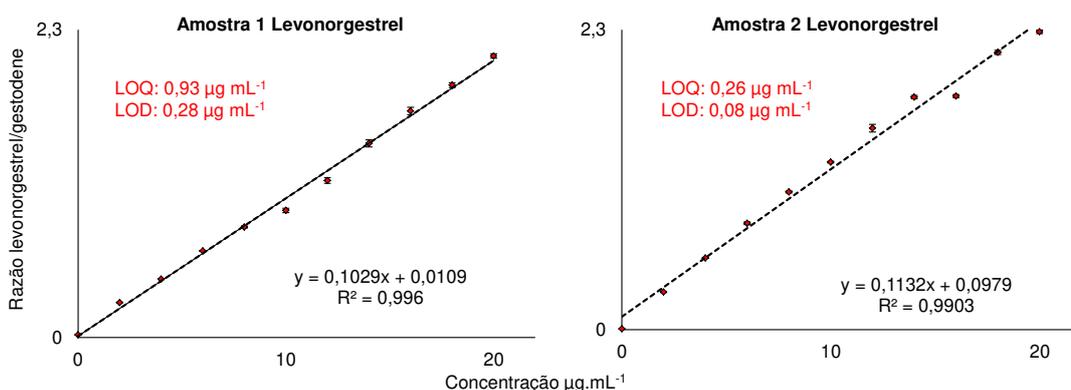


Figura 20: Curvas analíticas para o método LC-MS(+) para o hormônio levonorgestrel em amostra de água residual industrial.

Para verificar a linearidade das concentrações nominais *versus* concentrações medidas, foi realizado o mesmo procedimento para o método PSI-MS. Os gráficos (**Figura 21**) revelaram que os valores medidos para o hormônio levonorgestrel se equiparam aos valores teóricos.

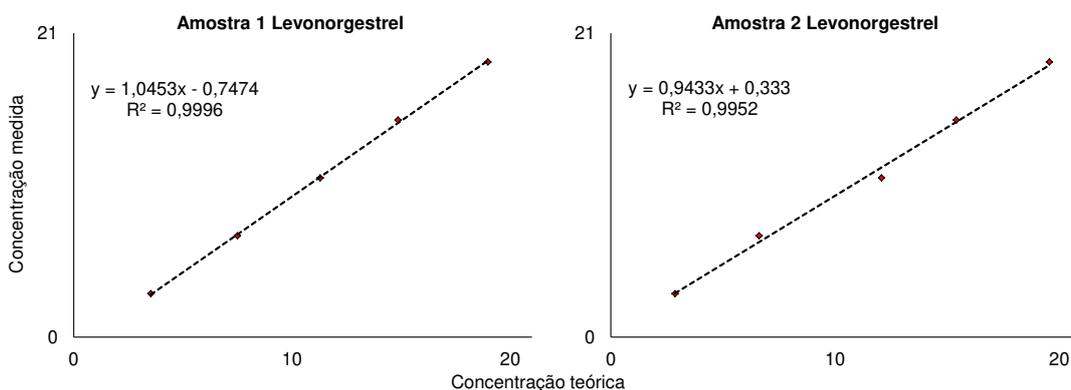


Figura 21: Gráfico concentração teórica *versus* concentração medida para o hormônio levonorgestrel.

4.2.3. Figuras de mérito

Os limites de quantificação para levonorgestrel foram de 0,93 ppm e 0,26 ppm, enquanto os limites de detecção foram de 0,28 ppm e 0,08 ppm. A precisão (**Tabela 5**) intra-dias e inter-dias variou de 0,2% a 12,1%, a exatidão variou de 8,8% a 11,3% com taxa de recuperação variando de 83,7% a 109,1%.

O método de LC-MS também apresentou valores dentro dos padrões estabelecidos pela ANVISA (**Tabela 6**) e mostrou aplicabilidade na análise de misturas complexas.

Os valores de precisão, exatidão e recuperação intra-dias e inter-dias variou menos nas análises de PSI-MS. Os limites de detecção e quantificação ficaram próximos e a recuperação variou menos no método de PSI-MS.

Mediante os resultados apresentados neste estudo, foi desenvolvido um método confiável, rápido e sustentável para o ensaio de hormônios presentes em águas residuais industriais. A estratégia apresentada aparece como um método alternativo e mais rápido para as abordagens clássicas para as análises quantitativas comumente usadas e relatadas na literatura, como os métodos LC-MS. Os parâmetros analíticos e a comparação direta com as medidas LC-MS suportam a confiabilidade da técnica PSI-MS

Tabela 5: Valores de precisão e exatidão intra-dias e inter-dias e recuperação para o método de LC-MS.

	Amostra 1			Amostra 2		
	Levonorgestrel			Levonorgestrel		
Intradias						
Concentração nominal ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	4	10	16	4	10	16
Precisão (CV%)	0,9	1,8	1,7	0,4	0,5	0,7
Exatidão (E%)	3,2	-8,8	2,1	4,4	4,9	-6,5
Recuperação %	100,9	90,3	101,6	84,0	96,7	88,4
Interdias						
Concentração nominal ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	4	10	16	4	10	16
Precisão (CV%)	7,3	12,1	4,1	0,2	3,8	0,7
Exatidão (E%)	11,3	5,7	7,2	4,1	4,4	-5,9
Recuperação %	109,1	104,8	106,6	83,7	96,3	89,0

*CV= coeficiente de variação; E= erro relativo

Tabela 6: Valores comparativos entre PSI-MS e LC-MS para o hormônio Levonorgestrel.

	Levonorgestrel	
	PSI-MS	LC-MS
Precisão	0,5 a 5,3%	0,2 a 12,1%
Exatidão	-7,0 a 4,2%	8,8 a 11,3%
Recuperação	82,2 a 101,3%	83,7 a 109,1%
LOQ	1,55 e 0,21ppm	0,93 e 0,26ppm
LOD	0,47 e 0,06ppm	0,28 e 0,08ppm

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O método PSI-MS com papel cromatográfico parafinado possibilitou detectar e quantificar contaminantes emergentes, especificamente os hormônios levonorgestrel e algestona acetofenida em água residual industrial.

Os resultados de LOQ (0,21-2,33 ppm) e LOD (0,06-0,70 ppm) juntamente com os resultados de precisão e exatidão (abaixo de 15%) e recuperação (entre 82,2-101,3%) com coeficientes de regressão linear acima de 0,99 mostram que o método proposto é promissor para identificar e quantificar contaminantes emergentes em matrizes complexas, uma vez que não há realização de procedimentos laboriosos de preparo de amostras.

Assim, o método desenvolvido neste trabalho mostra ser de grande aplicabilidade na análise de misturas complexas permitindo assim análises de forma mais simples, além de rapidez e eficiência.

Neste estudo foram validados dois métodos para análises de contaminantes emergentes, hormônios, em águas residuais industriais, o método PSI-MS com utilização do papel cromatográfico parafinado e o método LC-MS.

O uso do papel cromatográfico com barreira hidrofóbica de parafina melhorou a estabilidade do sinal, aumentou a sensibilidade e o tempo de spray.

Segundo os parâmetros da validação analítica, os métodos propostos são apropriados, pois seus valores de precisão, exatidão e recuperação estão dentro dos padrões estabelecidos pela ANVISA. Além disso, os métodos apresentam uma ampla faixa de linearidade e valores de correlação

linear, LOD e LOQ adequados. Porém o método de PSI-MS é menos laborioso quanto ao preparo de amostras, baixo consumo de solvente, rapidez e eficiência.

O método proposto é de suma importância, pois apresenta uma grande inovação na metodologia analítica para contaminantes emergentes em matriz água.

O método PSI-MS, também deverá ser avaliado para análises de outros contaminantes emergentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERICI, R. M.; SIMAS, R. C.; SANVIDO, G. B.; ROMÃO, W.; LALLI, P. M.; BENASSI, M.; CUNHA, I. B. S.; EBERLIN, M. N. Ambient mass spectrometry: bringing MS into the “real world”. **Anal. Bional. Chem**, 398, n. 1, 2010. 265-294.

ARCHER, E.; PETRIE, B.; KASPRZYK-HORDERN, B.; WOLFAARDT, G. M. The fate of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs), endocrine disrupting contaminants (EDCs), metabolites and illicit drugs in a WWTW and environmental waters. **Chemosphere**, 174, 2017. 437-446.

BORGES, A. L. V.; OLAOLORUN, F.; FUJIMORI, E.; HOGA, L. A. K.; TSUI, A. O. Contraceptive use following spontaneous and induced abortion and its association with family planning services in primary health care: results from a Brazilian longitudinal study. **Reproductive health**, 12, n. 1, 2015. 94.

BRASIL. RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. **Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos**, 2012. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 15 jul. 2017.

BRUKER Corporation, 2018. Disponível em: <www.bruker.com>. Acesso em: 30 jan. 2018.

CAUSANILLES, A.; RUEPERT, C.; IBÁÑEZ, M.; EMKE, E.; HERNÁNDEZ, F.; VOOGT, P. Occurrence and fate of illicit drugs and pharmaceuticals in wastewater from two wastewater treatment plants in Costa Rica. **Science of The Total Environment**, 599–600, 2017. 98-107.

COLLETES, T. C.; GARCIA, P. T.; CAMPANHA, R. B.; ABDELNUR, P. V.; ROMÃO, W.; COLTRO, W. K. T.; VAZ, B. G. A new insert sample approach to paper spray mass spectrometry: a paper substrate with paraffin barriers. **Analyst**, 141, 2016. 1707-1713.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp, 2006.

DE TARSO GARCIA, P.; CARDOSO, T. M. G.; GARCIA, C. D.; CARRILHO, E.; COLTRO, W. K. T. A handheld stamping process to fabricate microfluidic paper-based analytical devices with chemically modified surface for clinical assays. **Rsc Advances**, 4, n. 71, 2014. 37637-37644.

ELIUK, S.; MAKAROV, A. Evolution of orbitrap mass spectrometry instrumentation. **Annual Review of Analytical Chemistry**, 8, 2015. 61-80.

ENRÍQUEZ, J.; GARCÍA, G.; HERRERO, B.; LARREA, F. The synthetic progestin, gestodene, affects functional biomarkers in neonatal rat osteoblasts through an estrogen receptor-related mechanism of action. **Endocrine research**, 42, n. 4, 2017. 269-280.

ESPLUGAS, S.; BILA, D. M.; KRAUSE, L. G. T.; DEZOTTI, M. Ozonation and advanced oxidation technologies to remove endocrine disrupting chemicals (EDCs) and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in water effluents. **Journal of hazardous materials**, 149, n. 3, 2007. 631-642.

FAYAD, P. B.; PRÉVOST, M.; SAUVÉ, S. Laser Diode Thermal Desorption/Atmospheric Pressure Chemical Ionization Tandem Mass Spectrometry Analysis of Selected Steroid Hormones in Wastewater: Method Optimization. **Anal. Chem.**, 82, 2010. 639–645.

FERRANDO-CLIMENT, L.; RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; BARCELÓ, D. Incidence of anticancer drugs in an aquatic urban system: From hospital effluents through urban wastewater to natural environment. **Environmental Pollution**, 193, 2014. 216-223.

GROSS, J. H. **Mass Spectrometry: A Textbook**. Berlin: Springer-Verlag, 2011.

HERNÁNDEZ, F.; SANGHO, J. V.; IBÁÑEZ, M.; ABAD, E.; PORTOLÉS, T.; MATTIOLI, L. Current use of high-resolution mass spectrometry in the environmental sciences. **Analytical and bioanalytical chemistry**, 403, n. 5, 2012. 1251-1264.

HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Mass spectrometry: principles and applications**. 3^a. ed. Chichester: John Willey & Sons, 2007.

HSU, F. J.; LIU, T. L.; LASKAR, A. H.; SHIEA, J.; HUANG, M. Z. Gravitational sampling electrospray ionization mass spectrometry for real-time reaction monitoring. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 28, n. 18, 2014. 1979-1986.

HUANG, M. Z.; CHENG, S.; CHO, Y.; SHIEA, J. Ambient ionization mass spectrometry: A tutorial. **Anal. Chim. Acta**, 702, 2011. 1-15.

JARDIM, W. F.; MONTAGNER, C. C.; PESCARA, I. C.; UMBUZEIRO, G. A.; BERGAMASCO, A. M. D. D.; ELDRIDGE, M. L.; SODRÉ, F. F. An integrated approach to evaluate emerging contaminants in drinking water. **Separation and Purification Technology**, 84, 2012. 3-8.

KEBARLE, P.; VERKERK, U. H. Electrospray: From Ions in Solution to Ions in the Gas Phase, What We Know Now. **Mass Spectrometry Reviews**, 28, n. 6, 2009. 898-917.

LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: RiMa, 2004. 46 p.

LEITE, F. **Validação em análise química**. 5^a. ed. Campinas: Editora Átomo, 2008. 357 p.

LI, D.-X.; GAN, L.; BRONJA, A.; SCHMITZ, O. J. Gas chromatography coupled to atmospheric pressure ionization mass spectrometry (GC-API-MS): Review. **Analytica Chimica Acta**, 891, 2015. 43-61.

LIU, J. . W. H. . M. N. E. . L. J.-M. . C. R. G. . O. Z. Development, Characterization, and Application of Paper Spray Ionization. **Anal. Chem.**, 82, 2010. 2463-2471.

LIU, J.-L.; WONG, M.-H. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs): A review on environmental contamination in China. **Environment International**, 59, 2013. 208-224.

LOCATELLI, M.; SCIASCIA, F.; CIFELLI, R.; MALATESTA, L.; BRUNI, P.; CROCE, F. Analytical methods for the endocrine disruptor compounds determination in environmental water samples. **Journal of Chromatography A**, 1434, 2016. 1-18.

MAHER, S.; JJUNJU, F. P.; DAMON, D. E.; GORTON, H.; MAHER, Y. S.; SYED, S. U.; HEEREN, R. A.; YOUNG, I. S.; TAYLOR, S.; BADU-TAWIAH, A. K. Direct Analysis and Quantification of Metaldehyde in Water using Reactive Paper Spray Mass Spectrometry. **Scientific reports**, 6, 2016. 35643.

MAKAROV, A.; SCIGELOVA, M. Coupling liquid chromatography to Orbitrap mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1217, 2010. 3938–3945.

NALDI, A. C.; FAYAD, P. B.; PRÉVOST, M.; SAUVÉ, S. Analysis of steroid hormones and their conjugated forms in water and urine by on-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Chemistry Central Journal**, 10, 2016.

NANOTECHNOLOGY SOLUTIONS. **Electrospray Ionization (ESI)**, 2013. Disponível em: <<https://nanotechnologysolutions.wordpress.com/category/>>. Acesso em: 01 fev. 2018.

NÖDLER, K.; TSAKIRI, M.; ALOUPI, M.; GATIDOU, G.; A.S., S.; LICHA, T. Evaluation of polar organic micropollutants as indicators for wastewater-related coastal water quality impairment. **Environ. Pollut**, 211, 2016. 282-290.

PAN, B.; LIN, D.; MASHAYEKHI, H.; XING, B. Adsorption and hysteresis of bisphenol and 17 α -ethinylestradiol on carbon nanomaterials. **Environmental Science & Technology**, 42, n. 15, 2008. 5480-5485.

PEREIRA, I.; RODRIGUES, S. R. M.; CARVALHO, T. C.; CARVALHO, V. V.; LOBÓN, G. S.; BASSANE, J. F. P.; DOMINGOS, E.; ROMÃO, W.; AUGUSTI, R.; VAZ, B. G. Rapid screening of agrochemicals by paper spray ionization and leaf spray mass spectrometry: which technique is more appropriate? **Anal. Methods**, 8, 2016. 6023-6029.

PEREIRA, L. C.; DE SOUZA, A. O.; F., F. B. M.; PAZIN, M.; TASSO, M. J.; PEREIRA, P. H.; J., D. D. A perspective on the potential risks of emerging contaminants to human and environmental health. **Environ. Sci. Pollut. Res. Int.**, 22, 2015. 13800-23.

PERRY, R. H.; COOKS, R. G.; NOLL, R. J. Orbitrap Mass Spectrometry: Instrumentation, Ion Motion And Applications. **Mass Spectrometry Reviews**, 27, 2008. 661-699.

PURCELL, J. M.; HENDRICKSON, C. L.; RODGERS, R. P.; MARSHALL, A. G. Atmospheric Pressure Photoionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry for Complex Mixture Analysis. **Analytical Chemistry**, 78, 2006. 5906-5912.

REEBER, S. L.; GADI, S.; HUANG, S. B.; GLISH, G. L. Direct analysis of herbicides by paper spray ionization mass spectrometry. **Analytical Methods**, 7, n. 23, 2015. 9808-9816.

SIRÉS, I.; BRILLAS, E. Remediation of water pollution caused by pharmaceutical residues based on electrochemical separation and degradation technologies: A review. **Environment International**, 40, 2012. 212–229.

SU, Y.; WANG, H.; LIU, J.; WEI, P.; COOKS, R. G.; OUYANG, Z. Quantitative paper spray mass spectrometry analysis of drugs of abuse. **Analyst**, 138, n. 16, 2013. 4443-4447.

TAVERNA, D.; DI DONNA, L.; MAZZOTTI, F.; POLICICCHIO, B.; SINDONA, G. High-throughput determination of Sudan Azo-dyes within powdered chili pepper by paper spray mass spectrometry. **Mass Spectrom.**, 48, 2013. 544-547.

TAVERNA, D.; DONNA, L. D.; BARTELLA, L.; NAPOLI, A.; SINDONA, G.; MAZZOTTI, F. Fast analysis of caffeine in beverages and drugs by paper spray tandem mass spectrometry. **Anal Bioanal Chem.**, 408, n. 14, maio 2016. 3783-3787.

VIGLINO, L.; ABOULFADL, K.; PRÉVOST, M.; SAUVÉ, S. Analysis of natural and synthetic estrogenic endocrine disruptors in environmental waters using online preconcentration coupled with LC-APPI-MS/MS. **Talanta**, 76, n. 5, 2008. 1088-1096.

WANG, H.; LIU, J.; COOKS, R. G.; OUYANG, Z. Paper spray for direct analysis of complex mixtures using mass spectrometry. **Angew. Chem. Int. Ed.**, 49, 2010. 877-880.

WANG, R.; ZHANG, L.; ZHANG, Z.; TIAN, Y. Comparison of ESI–and APCI–LC–MS/MS methods: A case study of levonorgestrel in human plasma. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, 6, n. 6, 2016. 356-362.

WHO. Guidelines for Drinking-Water Quality, second edition, Health Criteria and Other Supporting Information. **World Health Organization**, Geneva, v. 2, p. adendum to, 1998.

YANG, Q.; WANG, H.; MAAS, J. D.; CHAPPELL, W. J.; MANICKE, N. E.; COOKS, R. G.; OUYANG, Z. Paper spray ionization devices for direct, biomedical analysis using mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, 312, 2012. 201-207.

YANG, Y.-Y.; LIU, W.-R.; LIU, Y.-S.; ZHAO, J.-L.; ZHANG, Q.-Q.; ZHANG, M.; ZHANG, J.-N.; JIANG, Y.-X.; ZHANG, L.-J.; YING, G.-G. Suitability of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and artificial

sweeteners (ASs) as wastewater indicators in the Pearl River Delta, South China. **Science of The Total Environment**, 590–591, 2017. 611-619.

ZENOBI, R.; KNOCHENMUSS, R. Ion formation in MALDI mass spectrometry. **Mass spectrometry reviews**, 17, n. 5, 1998. 337-366.

ZHANG, Y.; JU, Y.; HUANG, C.; WYSPCKI, V. H. Paper Spray Ionization of Noncovalent Protein Complexes. **Anal. Chem.**, 86, 2014. 1342-1346.