



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS - EQA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA TECNOLÓGICA E
AMBIENTAL - PPGQTA**

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO
EMPREGANDO SPE E LC-APCI-MS/MS PARA
DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS EM ÁGUA DE
SUPERFÍCIE E DE ABASTECIMENTO PÚBLICO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Liziane Vaz Cardoso

Rio Grande - RS, Brasil

2011

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO EMPREGANDO SPE E LC-APCI-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS EM ÁGUA DE SUPERFÍCIE E DE ABASTECIMENTO PÚBLICO

por

Liziane Vaz Cardoso

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental, Linha de Pesquisa Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica, da Universidade Federal do Rio Grande (FURG, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **MESTRE EM QUÍMICA**

Orientador: Prof. Dr. Fábio Ferreira Gonçalves

**Rio Grande, RS, Brasil
2011**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS - EQA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA TECNOLÓGICA E
AMBIENTAL - PPGQTA**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação de Mestrado

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO
EMPREGANDO SPE E LC-APCI-MS/MS PARA
DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS EM ÁGUA DE
SUPERFÍCIE E DE ABASTECIMENTO PÚBLICO**

elaborada por
Liziane Vaz Cardoso

como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Química**

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Fábio Ferreira Gonçalves
(Orientador - Presidente)

Prof^a. Dr^a. Márcia Foster Mesko (UFPEL)

Prof. Dr. Márcio Raimundo Milani (FURG)

Rio Grande, 25 de fevereiro de 2011

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço à **Deus**, e ao **meu anjo da guarda** pela proteção, pelas oportunidades em meu caminho e dificuldades encontradas, que fizeram com que eu seguisse cada vez mais forte para enfrentá-las e jamais desistisse dos meus objetivos.

Á minha mãe, por acreditar em mim, sempre me dando forças para lutar pelos meus objetivos. Nos momentos de tristeza e de dificuldade sempre pude contar com você. Você foi incansável e não me deixou desistir nunca. Agradeço pelo sacrifício que a senhora sempre sozinha fez para que eu tivesse uma boa educação, só nós sabemos o que passamos, sei que sempre estarás ao meu lado, e essa conquista é sua. Tenho muito orgulho de ser filha de uma mulher guerreira e agradeço todos os dias a deus por te me dado uma mãe tão especial. Mãe te amo muito.

Ao meu irmão Marcos pela união e sempre me falando “Lizi tu és capaz”, mano te amo. Ao meu irmão Lizandro (*in memoriam*) que partiu muito cedo, mas tenho certeza que está sempre entre nós e torceu muito para que eu chega-se até aqui. A minha **cunhada Ananda** pelos momentos de diversão, pelo apoio nas horas difíceis. Você foi essencial. A melhor cunhada que já tive.

Ao meu esposo, **Newton**, que sempre esteve sempre ao meu lado do seu jeito paciente e calmo que às vezes me irritava, mas no fundo me passava tranqüilidade. Amor esse trabalho também é seu, sem dúvida, você foi o maior colaborador em todos os sentidos. Obrigada por aceitar os momentos distantes, os choros que não foram poucos, os momentos de estresse. **TE AMO MUITO BEBÊ**, Agradeço a Deus a cada momento que passo com você, Agradeço a Deus por ter conhecido a melhor pessoa do mundo.

Á minha família Ana, Cesar, Richele, Everson e Dhionatan crescemos juntos e hoje contamos os dias para Natal e Ano Novo em que podemos nos reunir, espero que seja sempre assim! A amizade de vocês me faz feliz e sei que é pra vida toda

Ao meu orientador Prof. Dr. Fábio Ferreira Gonçalves, por ter aceitado me orientar, pela aprendizagem que adquiri nestes anos pela confiança, por sempre ter

acreditado que eu conseguiria desenvolver este trabalho, pelos momentos de descontração e pela amizade também. Muito obrigada por tudo!

À Profª. Drª. Márcia Foster Mesko, por ter aceitado participar na defesa da dissertação, pelas suas valiosas sugestões para o final deste estudo.

Ao Prof. Dr. Márcio Raimundo Milani pelas contribuições no exame de qualificação, pela participação na defesa.

Ao Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel, também pelas contribuições no desenvolvimento do trabalho, sugestões na qualificação, pela aprendizagem que adquiri nestes anos pela confiança e momentos de descontração, juntamente com todo o pessoal do laboratório. E por ter me dado uma força no momento que eu mais precisava. Sem palavras para agradecer. Obrigada!

Drª. Márcia Helena Scherer Kurz, por contribuir com suas sugestões para o final deste estudo.

Às minhas amigas Juliane e Márcia, que comigo formam até hoje o trio inseparável da graduação, agradeço pelo companheirismo, pelos conselhos, momentos de alegria e tristeza compartilhados, pelo apoio, pela amizade verdadeira.

Aos meus amigos e colegas Débora e Maicon, pela amizade, pelo trabalho em equipe e pelo apoio nestes dois anos de convivência diária!

A minha amiga Sergi, pela amizade, pela confiança, pelos ensinamentos, pelo companheirismo, pelos momentos de descontração... obrigada! Você também tem grande participação neste trabalho! Pela paciência em me ensinar.

Aos colegas e amigos que fazem ou fizeram parte do LACOM: Adri, Fabi, Maria, Brunos, Renata, Ana Laura, Liziara, Cátia, Maristela, Augusto, Ana Luiza, Natiele, Guilherme, Sherol, Vivi. Obrigada pelos momentos convividos durante estes dois anos, pelo exemplo de trabalho em equipe, pelos churrascos... Obrigada também aos "associados" do LACOM.

Aos colegas do PPGQTA, pelos momentos de convivência e estudo durante o mestrado.

Aos professores do PPGQTA, pelos ensinamentos e por contribuírem para minha formação como mestre.

À FURG, pela oportunidade e pelo ensino gratuito e de qualidade.

À CAPES, CNPQ, FAPERGS e ao PPGQTA pelas bolsas de estudo.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental - PPGQTA
Universidade Federal do Rio Grande - FURG
OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO EMPREGANDO SPE E LC-APCI-
MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS EM ÁGUA DE SUPERFÍCIE E DE
ABASTECIMENTO PÚBLICO
AUTORA: LIZIANE VAZ CARDOSO
ORIENTADOR: PROF. Dr. FÁBIO FERREIRA GONÇALVES
Rio Grande, 25 de fevereiro de 2011

O uso mundial dos fármacos classificados como contaminantes emergentes tornou-se um novo problema ambiental devido à possível contaminação das águas de superfície e de abastecimento, podendo impactar o meio ambiente e causar danos à saúde pública. Na cidade de Rio Grande, RS, Brasil, o suprimento de água potável é realizado pela CORSAN (Companhia Riograndense de Saneamento), que capta a água do Canal São Gonçalo, o qual estabelece uma ligação entre as lagoas: dos Patos e Mirim. Neste trabalho um método analítico empregando Extração em Fase Sólida (SPE) e Cromatografia Líquida com Fonte de Ionização Química a Pressão Atmosférica acoplada a Espectrometria de Massas (LC-APCI-MS/MS) foi desenvolvido e validado para a determinação dos fármacos atenolol, cafeína, diclofenaco, fluoxetina e sulfametoxazol em amostras de água superficial e de abastecimento público. O método foi validado conforme parâmetros do INMETRO e SANCO. Os limites de detecção do método variaram entre 0,053 – 0,53 $\mu\text{g L}^{-1}$, enquanto para os limites de quantificação a variação foi de 0,16 – 1,6 $\mu\text{g L}^{-1}$. Todos os compostos apresentaram excelente linearidade, com coeficiente de correlação maior do que 0,99. Os valores de recuperação estiveram na faixa de 70 a 120%, com RSD menores que 20% para todos os compostos. Através do monitoramento de múltiplas reações (MRM), duas transições diferentes (íon precursor – íon produto) foram selecionadas para cada composto, uma para quantificação e outra para confirmação, o que aumentou a seletividade do método. O efeito de matriz foi avaliado, e dois compostos apresentaram supressão de sinal. O efeito de matriz foi compensado com calibração dos padrões na matriz.

Palavras-chave: Validação, SPE, LC-APCI-MS/MS, fármacos, água.

ABSTRACT

Master's Thesis

Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental – PPGQTA
Universidade Federal do Rio Grande – FURG
OPTIMIZATION AND VALIDATION METHOD FOR USING SPE LC-APCI-MS/MS
AND DETERMINATION OF PHARMACEUTICALS IN SURFACE WATER AND
PUBLIC WATER SUPPLY
AUTHOR: LIZIANE VAZ CARDOSO
ADVISOR: Dr. FABIO GONÇALVES FERREIRA.

February 25th, 2011, Rio Grande, RS, Brazil

The global use of drugs classified as emerging contaminants has become a new environmental problem due to possible contamination of surface and supply water and may impact the environment and cause harm to public health. In the city of Rio Grande, RS, Brazil, the supply of drinking water is accomplished by CORSAN (Companhia de Saneamento Riograndense), which collects water from the São Gonçalo Channel, which links two lagoons: Patos and Mirim lagoons. In this work an analytical method using solid phase extraction (SPE) and liquid chromatography coupled to a source at Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry (LC-APCI-MS/MS) was developed and validated for the determination of atenolol, caffeine, diclofenac, fluoxetine and sulfamethoxazole pharmaceuticals in samples of surface water and public supply water. The method was validated according to parameters by INMETRO and SANCO. The limits of detection ranged from 0.053 to 0.53 $\mu\text{g L}^{-1}$, while for the limits of quantification the range was 0.16 to 1.6 mg L^{-1} . All the compounds showed excellent linearity, with correlation coefficients greater than 0.99. Recoveries were in the range of 70 to 120%, with RSD lower than 20% for all compounds. Through multiple reaction monitoring (MRM), two different transitions (precursor ion - product ion) were selected for each compound, one for quantitation and the other for confirmation purposes, increasing the selectivity of the method. The matrix effect was evaluated, and two of the compounds presented suppressed signal. The matrix effect was offset by superimposing the array calibration

Keywords: Validation, SPE, LC-APCI-MS/MS, pharmaceuticals, water

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Possíveis rotas de contaminação por fármacos no ambiente.	26
Figura 2 - Dispositivo básico de SPE	38
Figura 3 - Sequência de etapas na extração líquido-líquido e na extração em fase sólida	39
Figura 4 - Principais etapas empregadas em SPE visando o isolamento de um composto.....	40
Figura 5 - Interface do tipo APCI para LC-MS.....	45
Figura 7 - Sistema SPE para a pré-concentração das amostras.....	53
Figura 8 - Localização da região de estudo.	56
Figura 9 - Locais de amostragem.....	56
Figura 10 - Frascos âmbar e sistema de filtração das amostras	57
Figura 10 - Cromatogramas gerados em LC-APCI-MS para os compostos em estudo..	62
Figura 11 - Cromatogramas no modo MRM da fragmentação monitorada para a quantificação.	65
Figura 12 - Recuperações obtidas comparando diferentes materiais sorventes.	66
Figura 13 - Recuperações obtidas comparando diferentes solventes de eluição.....	68
Figura 14 - Recuperações obtidas comparando diferentes volumes de solvente de eluição.....	69
Figura 15 - Percentual de efeito matriz (EM) para a técnica empregando SPE e LC-APCI-MS/ MS para determinação de fármacos em água.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Fármacos emergentes mais contaminantes.....	24
Tabela 2 - Trabalhos publicados na literatura envolvendo a ocorrência de resíduos de fármacos no meio ambiente nos últimos cinco anos.	26
Tabela 3 - Condições empregadas no sistema cromatográfico.....	61
Tabela 4 - Resultado da otimização das condições de fragmentação para determinação dos fármacos no espectrômetro de massas	64
Tabela 5 - Resultados obtidos para calibração dos fármacos, empregando SPE no sistema LC-APCI-MS/MS	71
Tabela 6 - Resultados de LOD e LOQ, do instrumento e do método, para os fármacos estudados	72
Tabela 7 - Recuperação, RSDr e RSDpi do método empregando SPE e LC-APCI-MS/MS	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μ - micro (10^{-6})

A – Ampère

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APCI - Ionização Química a Pressão Atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*

API - Ionização a Pressão Atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Ionization*

API - Ingredientes farmacêuticos ativos, do inglês *Active Pharmaceutical Ingredients*

APPI – Fotoionização a Pressão Atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Photon Ionization*

CAS – Chemical abstracts service

C18 - Sílica modificada com hidrocarboneto linear C18, octadecilsilano

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

CORSAN – Companhia Riograndense de Saneamento

d.i. - Diâmetro interno

DLLME - Micro Extração Líquido-Líquido Dispersiva, do inglês *Dispersive Liquid-Liquid Extraction*

EM - Efeito Matriz, do inglês *matrix effect*

EMA - Agência Europeia para Produtos Medicinais, do inglês *European Medicines Agency*

EPA - Agência de Proteção Ambiental, do inglês *Environmental Protection Agency*

ESI - Ionização por *Electrospray*, do inglês *Electrospray Ionization*

ETE - Estações de Tratamento de Esgoto

eV - Elétron-Volt

FM – Fase móvel

FAD - Food and drugs administration

GC - Cromatografia Gasosa, do inglês *Gas Chromatography*

ICH - International Conference on Harmonisation

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

K_{ow} - Coeficiente de partição octanol-água

LC - Cromatografia Líquida, do inglês *Liquid Chromatography*

GC - Cromatografia Gasosa, do inglês *Gas Chromatography*

LC-MS/MS - Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas, do inglês *Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry*

LC-APCI-MS/MS - Cromatografia Líquida com Ionização Química a Pressão Atmosférica acoplada à Espectrometria de Massas *tandem* Espectrometria de

Massas, do inglês *Liquid Chromatography coupled with Atmospheric Pressure Chemical Ionization with Mass Spectrometry tandem Mass Spectrometry*

LLE - Extração Líquido-Líquido, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*

LOD - Limite de Detecção, do inglês *Limit of Detection*

LOQ - Limite de Quantificação, do inglês *Limit of Quantification*

m/z - Razão massa-por-carga

MRM - Monitoramento de Múltiplas Reações, do inglês *Multiple Reaction Monitoring*

MS - Espectrometria de Massas, do inglês *Mass Spectrometry*

NPD – Detector de Nitrogênio e Fósforo, do inglês *Nitrogen Phosphorus Detector*

OMS - Organização Mundial da Saúde, do inglês *World Health Organization*

p.a. - Grau pró-análise

pH - Potencial hidrogeniônico

pka - Potencial de dissociação ácida

PPCPs – Fármacos e Produtos de Higiene Pessoal, do inglês *Pharmaceuticals and Personal Care Products as Pollutants*

PTFE – Politetrafluoretileno (teflon), do inglês *Polytetrafluoroethylene*

r - Coeficiente de correlação linear

R - Recuperação

RSD - Desvio Padrão Relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*

RSD_{pi} - Desvio Padrão Relativo para Precisão Intermediária

RENAME - Relação Nacional de Medicamentos Essenciais

SNC - Sistema Nervoso Central, do inglês *Central Nervous System*

SPE - Extração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Extraction*

SPME - Microextração em fase sólida, do inglês

t_R - tempo de retenção

USFDA - Agência dos Estados Unidos para a Administração de alimentos e drogas, do inglês *U.S. Environmental Protection Agency*

V - Volt

v/v - Volume por volume

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
2.	OBJETIVOS	19
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1	Qualidade das águas	20
3.2	Fármacos	21
3.2.1	Produção e uso de fármacos	22
3.2.2	Fármacos: Contaminante Ambiental Emergente	23
3.2.3	Ocorrência de resíduos de fármacos no meio ambiente	25
3.2.4	Legislação e risco.....	28
3.2.5	Principais características dos fármacos estudados.....	29
3.2.5.1	Atenolol	30
3.2.5.2	Diclofenaco de sódio	31
3.2.5.3	Cafeína.....	32
3.2.5.4	Sulfametoxazol.....	33
3.2.5.5	Fluoxetina.....	35
3.3	Análise de fármacos.....	36
3.3.1	Técnicas de extração e pré-concentração de fármacos em água	36
3.3.2	Extração em fase sólida	37
3.4	Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria de massas	43
3.4.1	Efeito de Matriz em LC- APCI-MS/MS	45
3.4.2	Validação de métodos cromatográficos	47
3.4.3	Curva analítica e linearidade.....	47
3.4.4	Limite de quantificação e limite de detecção	48
3.4.5	Exatidão	49
3.4.6	Precisão	50
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	50
4.1	Compostos escolhidos para este estudo	50
4.2	Instrumentação	51
4.3	Reagentes, solventes, sorventes e materiais	51

4.4	Preparo das soluções analíticas.....	52
4.5	Otimização do sistema SPE para pré-concentração das amostras.....	53
4.5.1	Procedimento SPE para a extração e pré-concentração dos compostos	53
4.5.2	Escolha do adsorvente empregado	54
4.5.3	Volume da amostra.....	54
4.5.4	Escolha do solvente de condicionamento.....	55
4.5.5	Escolha do solvente e do volume de eluição dos analitos	55
4.5.6	Amostragem e conservação	55
4.6	Validação do método	57
4.6.1	Curva analítica e linearidade	57
4.6.2	Limites de detecção e quantificação.....	58
4.6.3	Recuperação (Exatidão)	58
4.6.4	Precisão.....	59
4.6.5	Efeito de Matriz.....	60
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1	Condições cromatográficas otimização no LC-APCI-MS/MS para determinação dos analitos	61
5.2	Separação cromatográfica e acidez da fase móvel	61
5.3	Otimização dos parâmetros para fragmentação dos compostos no MS..	63
5.4	Estudo da extração em fase sólida dos fármacos.....	65
5.4.1	Escolha do sorvente	65
5.4.2	Escolha do solvente de eluição	67
5.4.3	Volume do solvente de eluição.....	68
5.4.4	Efeito de matriz empregando SPE e determinação por LC-APCI-MS/MS.....	69
5.5	Validação do método	70
5.5.1	Curva analítica e linearidade	70
5.5.2	Limites de detecção e limites de quantificação.....	71
5.5.3	Exatidão.....	72
5.5.4	Precisão.....	72
5.5.5	Aplicabilidade.....	74

6.	CONCLUSÕES	76
7.	TRATAMENTO DE RESÍDUOS GERADOS.....	78
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
9.	PRODUÇÃO CIENTÍFICA REFERENTE AO TRABALHO.....	89

1. INTRODUÇÃO

A crescente preocupação com a disponibilidade mundial de água vem exigindo dos seres humanos uma nova consciência em relação à utilização desse recurso. A água, encontrada na natureza, é essencial para a vida no nosso planeta. Porém, esta riqueza tem se tornado cada vez mais escassa. Existe uma grande disponibilidade de recursos hídricos, no entanto a água doce é um prêmio. Preocupar-se com a escassez de água em um planeta que tem 75% de sua superfície coberta por água parece absurdo (BAIRD, 2002). Porém, mais de 97% da água do mundo é água salgada e é imprópria para o consumo humano e para produção de alimentos. Três quartas partes da água doce estão presas em geleiras e nas calotas polares. Lagos e rios são as principais fontes de água potável, mesmo contribuindo, em seu conjunto, com menos de 0,01% do suprimento total de água.

A água potável é um recurso finito, que se distribui na superfície terrestre de forma desigual sendo que a tendência para os próximos anos é um aumento ainda maior no seu consumo, devido à demanda e o crescimento populacional acentuado e desordenado, principalmente nos grandes centros urbanos.

Antigamente a contaminação da água era abordada sob 2 aspectos: a microbiológica e os dejetos industriais. Atualmente o mundo se depara com outros tipos de poluição, como por exemplo, a contaminação das águas com ingredientes farmacêuticos ativos (API, do inglês *Active Pharmaceutical Ingredients*) (ONESIOS *et al*, 2009).

Atualmente 100.000 substâncias químicas diferentes são registradas na União Européia, dos quais 30.000 são comercializados em quantidades superiores a 1 ton/ano. Estima-se que cerca de 3.000 substâncias diferentes são usadas como ingredientes farmacêuticos, incluindo analgésicos, antibióticos, antidiabéticos, β -bloqueadores, anticoncepcionais, reguladores de lipídios, antidepressivos e drogas para impotência (RICHARDSON, 2009). Os fármacos contaminam o ambiente aquático devido suas características: as moléculas são biologicamente ativas, a maioria dos fármacos possuem características lipofílicas e baixa biodegradabilidade no ambiente. Por isso, apresentam grande potencial de bioacumulação e persistência no ambiente (ONESIOS *et al*, 2009).

O uso mundial dos fármacos, de produtos de higiene pessoal e alguns agrotóxicos, classificados como contaminantes emergentes, tornou-se um novo problema ambiental, que despertou grande preocupação entre os cientistas nos últimos anos. Muitos deles são facilmente distribuídos no ambiente aquático e podem apresentar efeitos adversos em organismos aquáticos e terrestres.

As drogas humanas são introduzidas primeiramente no ambiente após a medicação através da excreção pela urina e das fezes, por eliminação direta de fabricantes através dos resíduos. E as drogas veterinárias que são eliminadas pelos animais (WEIL *et al*, 2006).

Mesmo após o tratamento da água realizado nas Estações de Tratamento de Esgotos (ETEs), ainda se encontram concentrações de fármacos na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$ ou ng L^{-1} . Estudos demonstram que várias dessas substâncias parecem ser persistentes no meio ambiente e não são completamente removidas nas ETEs. A eficiência da remoção é afetada por diferentes fatores, como por exemplo, propriedades físico-químicas, atividade microbiana, circunstâncias ambientais e processo do tratamento (ROBINSON, 2007).

No Brasil, a Portaria nº 518/04 do Ministério da Saúde, e a Resolução nº 357/05 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) não estabelecem Limites Máximos de Resíduos de fármacos para águas subterrâneas, residual e potável.

Devido ao fato de não existir um padrão estabelecido pelas agências regulamentadoras é necessário o desenvolvimento de métodos analíticos sensíveis, seletivos, exatos e precisos que permitam determinar esses contaminantes em água.

Devido às baixas concentrações que se encontram essas substâncias na água é necessário o uso de técnicas de extração e pré-concentração para a sua determinação. Nesse sentido, técnicas de preparo de amostras como Extração em Fase Sólida (SPE) vêm sendo amplamente utilizadas.

Para determinação destas substâncias, técnicas cromatográficas bem estabelecidas, como a Cromatografia Líquida (LC, do inglês *Liquid Chromatography*) e a Cromatografia Gasosa (GC, do inglês *Gas Chromatography*) são usadas. Apesar da Cromatografia Gasosa ser útil para métodos multi-resíduos na determinação de alguns poluentes emergentes, é necessário um processo de derivatização, porque muitos contaminantes ambientais

são polares, sendo termicamente instáveis e tendo uma baixa volatilidade, e alguns são pouco adequados à derivação (ZHANG *et al*, 2007).

Devido à maioria dos fármacos existentes apresentarem características polares e serem termicamente instáveis, o emprego da Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS/MS, do inglês *Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry*) tornou-se a principal ferramenta analítica para análise destes compostos em amostras ambientais.

Desta forma, a inexistência de dados em relação à ocorrência de fármacos nas águas residuais e de abastecimento público na cidade do Rio Grande-RS, como em várias regiões do país, justifica a importância desse trabalho.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver e validar um método empregando preparo de amostra através da otimização da técnica de extração em fase sólida (SPE) e determinação por cromatografia líquida com ionização química a pressão atmosférica acoplada à espectrometria de massas em *tandem* (LC-APCI-MS/MS), para determinação dos fármacos diclofenaco, fluoxetina, atenolol, sulfametoxazol e cafeína em água de superfície e de abastecimento público do município de Rio Grande.

Para desenvolver e validar os métodos foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- ❖ Selecionar os principais fármacos comercializados nas redes de farmácia de Rio Grande e também os que fazem parte da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME);
- ❖ Testar diferentes composições de fase móvel a fim de obter uma melhor separação cromatográfica dos analitos;
- ❖ Otimizar os parâmetros instrumentais do LC-APCI-MS/MS como fase móvel, pH, vazão, corrente da corona, voltagem do cone, vazão dos gases de nebulização e do cone; temperaturas da fonte e de dessolvatação para a determinação dos compostos em estudo;
- ❖ Otimizar a técnica SPE para extração dos fármacos em água a fim de obter boas recuperações para os analitos em estudo;
- ❖ Validar o método empregando SPE, LC-APCI-MS/MS para determinação dos fármacos em água avaliando limites de detecção (LOD, do inglês *limit of detection*) e de quantificação (LOQ, do inglês *limit of quantification*), curva analítica, linearidade, precisão e exatidão e avaliando a influência do efeito de matriz (EM) na exatidão do método. O método foi validado conforme parâmetros do INMETRO e SANCO.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Qualidade das águas

Durante séculos, a humanidade considerou a água como um recurso inesgotável e a utilizou de forma predatória e insustentável. No século XX, o uso inadequado foi agravado com a aceleração do crescimento populacional e o intenso uso pelos diversos ramos de atividades, dentre elas, doméstica, agrícola e industrial. Estes fatores levaram à constatação de que a água se torna cada vez um bem escasso, necessitando de um uso racional e equilibrado, de modo a garantir a sua conservação e sustentabilidade (BAIRD, 2002).

O planeta terra é um único do nosso sistema solar que apresenta as moléculas de água, em forma líquida, na maior parte de sua superfície. Cerca de 97% da água existente no nosso planeta é de fonte marinha. Dos 3% restantes, 2% consistem rios, lago e águas subterrâneas (água doce). Praticamente 1% é neve e geleiras permanentes e apenas 0,0005% é vapor de água presente na atmosfera. Do total de água doce, quase a metade encontra-se na América do Sul (ROCHA *et al*, 2009).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) relata que a qualidade da água potável é um problema de saúde universal, em razão da água servir como um meio de transmissão de doenças. Existem vários problemas de qualidade da água que afetam diversos países. Destes, a contaminação da água potável por fontes patogênicas continua a ser o mais importante, bem como a contaminação pela atividade industrial e agrícola. Atualmente, mais de 1 bilhão de pessoas no mundo não têm água suficiente para suprir as suas demandas domésticas, que segundo a Organização Mundial da Saúde é de 200 litros/dia. Estima-se que em 30 anos haverá 5,5 bilhões de pessoas vivendo em áreas com moderada ou elevada escassez de água.

Alguns eventos agravam o cenário, tanto da oferta como da demanda de água doce no mundo, tais como o crescimento demográfico associado a padrões de consumo não sustentáveis. Estima-se que o crescimento populacional aumentou três vezes no decorrer do século XX, passando de 2 para 6 bilhões de habitantes. Nesse mesmo período, a demanda de água aumentou sete vezes, isto é, passou de 580 km³/ano para aproximadamente 4.000 km³/ano. Esses dados tornam-se

relevantes na medida em que é previsto que a população mundial estabilize-se, por volta do ano 2050, entre 10 e 12 bilhões de habitantes, o que representa um aumento de cerca de 5 bilhões na população atual. Outro fator que agrava o cenário da utilização das águas no mundo é a gestão ineficiente dos recursos hídricos em basicamente todas as atividades antrópicas, tais como agricultura, indústria e sistemas de abastecimento público, onde o desperdício de água, pode ser superior a 60%, como em algumas regiões brasileiras (BARROS, 2008).

3.2 Fármacos

Até o século XIX a maioria dos fármacos eram naturais com estrutura química e natureza desconhecidas. No início do século XX foram introduzidos os primeiros barbitúricos, os derivados arsenicais e a insulina. Nos anos 30 surgiram a sulfamida, a fenitoína e a peditina. Nos anos 40 foram descobertas a penicilina, a estreptomicina, a clortetraciclina e o clorafenicol. Após 1940, houve a introdução maciça de novos fármacos que abririam possibilidades de cura até então inalcançáveis, sobretudo no campo das enfermidades infecciosas. Nos anos 50 surgiram entre outros a isotiazida e a procainamida (ROZENFELD, 1988).

Atualmente, a maioria dos fármacos existentes são de origem sintética e representam uma significativa parcela do mercado farmacêutico, estimado em 390 bilhões de dólares em 2000. Até 1991, aproximadamente 866 fármacos eram usados na terapêutica, dos quais 680 (79%) eram de origem sintética. Os restantes 186, correspondiam a produtos de origem natural ou semi-sintética (MENEGATTI, 2001).

Fármacos são moléculas complexas, com diferentes propriedades físicas e biológicas e com diversas funcionalidades. São definidos como substâncias responsáveis pela fisiologia ou ação farmacológica, utilizadas no diagnóstico e cura, tratamento ou prevenção de doenças, podendo afetar a estrutura ou função do corpo do homem ou de animais. Eles podem ser usados com a finalidade de: fornecer elementos carentes ao organismo, como vitaminas, sais minerais e hormônios; prevenir doença ou infecção; combater infecções; bloqueio temporário de uma função normal; corrigir uma função desregulada; desintoxicar o organismo e atuar como agentes auxiliares de diagnóstico. Os fármacos são desenvolvidos e utilizados pelas suas atividades biológicas específicas e sua classificação se dá de acordo com sua finalidade, por exemplo: antibióticos, analgésicos, antineoplásicos,

antiinflamatórias, anti-histamínicos, contraste de raios X, etc (KÜMMERER 2004; KHETAN *et. al* 2007; SUCHARA, 2007).

3.2.1 Produção e uso de fármacos

A indústria farmacêutica em vários países da Europa desenvolveu-se a partir da segunda guerra mundial, sobretudo nos Estados Unidos. A indústria farmacêutica passou a utilizar os recursos da química sintética para aumentar o arsenal terapêutico.

A indústria farmacêutica mundial é composta por mais de 10 mil empresas. Os EUA são, ao mesmo tempo, o maior produtor e consumidor desse mercado. As maiores multinacionais exportadoras estão sediadas na Suíça, Alemanha, Grã-Bretanha e Suécia. A Bélgica, Dinamarca e Irlanda também apresentam superávits em suas balanças comerciais de medicamentos. Por outro lado, países do Leste Europeu, Coréia, Austrália, Itália, Finlândia, Noruega e Japão são substanciais importadores (CALIXTO, 2008).

No Brasil, a indústria farmacêutica teve sua expansão a partir dos anos 40. Antes dos anos 1930 o grau de desenvolvimento até então alcançado pela indústria farmacêutica brasileira era semelhante ao de outros países latino-americanos (LOPÉZ, 1988).

Ao fim da Segunda Guerra Mundial, empresas subsidiárias de indústrias estrangeiras se instalaram no Brasil, movidas pela necessidade de novos mercados. Assim, a indústria farmacêutica brasileira, em sua etapa de maior desenvolvimento, é dominada pelos estrangeiros.

Existem hoje no Brasil cerca de 541 indústrias farmacêuticas cadastradas. O Brasil é o primeiro colocado mundial em número de farmácias - cerca de 50 mil lojas – o que corresponde a 3,34 lojas para cada 10 mil habitantes, ocupando a nona colocação no ranking dos maiores consumidores de medicamentos do mundo e movimenta cerca de US\$ 5 bilhões por ano. O Brasil pertence a um dos maiores consumidores de fármacos do mundo, juntamente com Estados Unidos, França e Alemanha (STUMPF *et al.*, 1999; Grupo Pró-Genéricos, 2001a; Grupo Pró-Genéricos, 2001b).

3.2.2 Fármacos: Contaminante Ambiental Emergente

Há alguns anos a contaminação das águas abrangia apenas duas formas de contaminação: a microbiológica e os dejetos industriais. Atualmente as nações industrializadas se deparam com outro tipo de poluição – a contaminação das águas com produtos farmacêuticos, cosméticos e de higiene pessoal que são chamados de contaminantes emergentes (ONESIOS *et al*, 2009).

Esses contaminantes estão presentes no meio ambiente por um longo tempo, mas a sua importância e presença somente agora está sendo elucidada. O interesse crescente na determinação desses contaminantes ocorre pelo fato de que eles não estão inseridos em legislações que regulamentam a qualidade da água e, portanto, podem ser candidatos para futuras legislações, dependendo das pesquisas sobre sua toxicidade e efeitos potenciais ao meio ambiente e à saúde humana (SUCHARA, 2007).

A poluição das águas pelos fármacos está sendo reconhecida como uma preocupação ambiental, pois a poluição por eles provocada é um fenômeno complexo. O consumo de medicamentos é substancial. Na União Européia (UE) estima-se que cerca de 3000 substâncias diferentes são usadas como ingredientes farmacêuticos, incluindo analgésicos, antibióticos, antidiabéticos, bloqueadores, anticoncepcionais, reguladoras de lipídios, antidepressivos e drogas da impotência, compreendendo uma grande extensão de moléculas de vários grupos terapêuticos com diferentes propriedades físico-químicas, estruturas químicas, ação ambiental e muitas vezes de natureza persistente (RICHARDSON, 2007 ; SUCHARA, 2007).

Na maioria dos países desenvolvidos, a produção e utilização de fármacos está aumentando anualmente. É interessante notar que o consumo das drogas usadas às vezes é tão alto como a dos pesticidas e outros compostos orgânicos (KOT-WASIK *et al*, 2007).

A grande preocupação ambiental não é necessariamente o volume de produção de um fármaco, mas sua persistência no ambiente e atividade biológica como, por exemplo, alta toxicidade e alto potencial para efeitos em funções biológicas como a reprodução. A Tabela 1 apresenta os fármacos emergentes mais contaminantes, sendo os mais encontrados e os que causam maior preocupação ao ambiente.

Tabela 1– Fármacos emergentes mais contaminantes

Classes terapêuticas	Exemplos
Antibióticos de uso humano e veterinário	
- <i>b-lactâmicos</i>	amoxicilina, ampicilina, benzilpenicilina
- <i>macrolídeos</i>	eritromicina, azitromicina, tilosina
<i>Sulamidas</i>	sulfametazina, sulfadiazina, sulfaguanidina
<i>Tetraciclinas</i>	oxitetraciclina, tetraciclina
Analgésicos e anti-inflamatórios	codeína, ibuprofeno, acetaminofeno, diclofenaco, fenoprofeno
Lipídicos reguladores	bezafibrato, ácido clofibrico, ácido fenofibrico
Psicofármacos	diazepam
B-bloqueadores	metoprolol, propranolol, timolol, solatol, atenolol
Contraste raio-X	lopromida, iopamidol, diatrizoate
Anti-depressivos	fluoxetina
Hormônios	pílula contraceptiva, estrona, estriol, dietilestilbestrol

FONTE: KHETAN *et. al*, 2007; PAVLOVIC´ *et.al*, 2007.

Cabe destacar que o impacto da sua presença em águas ainda é um problema pouco conhecido e os dados existentes sobre a sua biodegradação, toxicidade e destino no meio ambiente são insuficientes (HALLING-SORENSEN *et al*, 1998).

A toxicidade aguda não é a maior preocupação, mas durante longos períodos de tempo, a entrada contínua de fármacos na água de superfície, mesmo em níveis baixos pode causar mudanças nos organismos. Além disso, a mistura de produtos farmacêuticos também poderia ter ainda mais impacto negativo sobre a fauna e a flora aquáticas (VARGA *et al*, 2011).

3.2.3 Ocorrência de resíduos de fármacos no meio ambiente

A investigação da presença de produtos farmacêuticos no ambiente aquático é recente. Dados preliminares foram publicados por Azarnoff *et al* em 1977 nos Estados Unidos e por Bowron *et al* em 1985 na Inglaterra (ZUCCATO *et al*, 2006).

Apesar de haver pouca informação disponível sobre seu destino no ambiente e seus efeitos tóxicos para a fauna e a flora, aquática e terrestre, os riscos potenciais associados à sua liberação vêm se tornando alvo de grande preocupação nos dias atuais.

Após a administração, os fármacos são absorvidos, distribuídos, parcialmente metabolizado e, finalmente, excretados na forma original ou como metabólitos nas fezes ou dissolvidos na urina. Esse processo ocorre tanto em humanos quanto em animais nos quais são utilizados fármacos veterinários. Outras formas de contaminação pelos fármacos são através dos resíduos da indústria farmacêutica, da aqüicultura, da eliminação de medicamentos não utilizados ou vencidos e de hospitais (TAMBOSI *et al*, 2010; KOT-WASIK *et al*, 2007).

Os fármacos não são degradados nas estações de tratamento de esgoto (ETE) e são lançados nos corpos d'água resultando na contaminação de rios, lagos, estuários e raramente em águas subterrâneas. O lodo gerado no processo é lançado em campos agrícolas e podem causar contaminação do solo, águas superficiais e percolação para água subterrânea. O mesmo pode ocorrer com substâncias de uso veterinário. Além disto, os fármacos veterinários podem entrar nos sistemas aquáticos através da aplicação de adubo em campos e, subsequente, lixiviação e também por aplicação direta na aqüicultura (DAUGHTON *et.al*, 1999)

As possíveis rotas nos compartimentos do ambiente aquático são apresentadas na Figura 1.

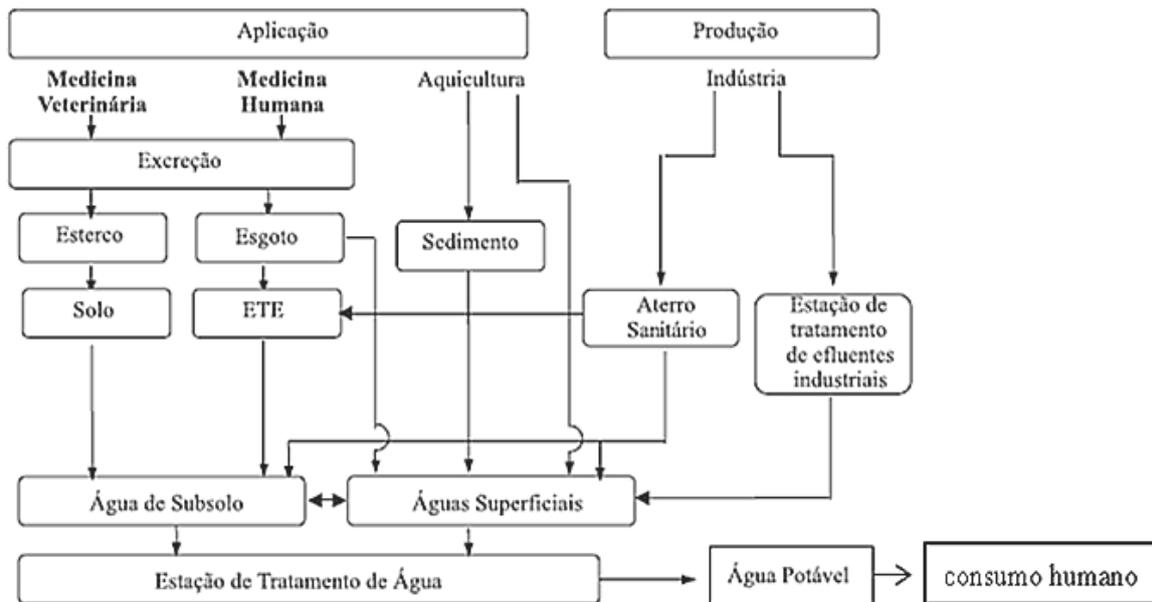


Figura 1- Possíveis rotas de contaminação por fármacos no ambiente.
 FONTE: adaptado de BILA *et. al*, 2003

A presença dos fármacos tem sido pesquisada em diversas matrizes entre elas: efluentes e afluentes de estação de tratamento de esgoto e água de superfície em diferentes países do mundo, como: Japão, Irlanda, Escócia Inglaterra, Espanha, Slovenia, Polônia. Sendo encontrado em menor número dados sobre a contaminação em água potável, água do mar, estuários e sedimento de rios. A Tabela 2 apresenta um resumo de uma seleção de trabalhos publicados na literatura envolvendo a ocorrência de resíduos de fármacos no meio ambiente nos últimos cinco anos. Os fármacos em **negrito e sublinhado** foram determinados nesse trabalho.

Tabela 2 - Trabalhos publicados na literatura envolvendo a ocorrência de resíduos de fármacos no meio ambiente nos últimos cinco anos.

<i>Fármaco</i>	<i>Concentração (µg L⁻¹)</i>	<i>Matriz estudada</i>	<i>País</i>	<i>Ano</i>	<i>Ref</i>
Sulfonamidas	0,00005 – 0,0539	Água subterrânea e superfície	Espanha	2010	García-galán, Talanta
<i>Cafeína, atenolol</i> , metoprolol, oxazepam, carbamazepina, cetoprofeno, naproxeno, ibuprofeno, <i>diclofenaco</i> e gemfibrozil	0,007 – 1,16	Água do mar	Suécia	2010	Magnér, Chemosphere
Naproxeno, ibuprofeno, <i>diclofenaco</i> e gemfibrozil	0,001 – 0,121	Água do mar	Cingapura	2010	Wu, Chromatography A
Paracetamol, dipirona, ácido salicílico, cetoprofeno, prednisolona, dexametasona, carvedilol, cloridrato de Sotalol, cloridrato de propranolol, tartarato de metoprolol	Somente o ácido salicílico foi quantificado em 9,55	Água de rio	Polónia	2009	Baranowska, Water air soil pollution
β-bloqueadores (<i>Atenolol</i>), psicotrópicos (<i>Fluoxetina</i>), antibióticos (<i>Sulfametoxazol</i>), analgésico antiinflamatório (<i>Diclofenaco</i>) e antipiréticos, antihiperlipidémico (Bezafibrato), Anticoncepcionais (Levonorgestrel), hormônios naturais (testosterona), Antimicrobianos (trilosan), Produtos veterinários (trilosina)	0,0008 – 0,019 0,0002 – 0,071	Água da tomeira Água de efluente e afluente.	França	2009	Vulliet, Environ chem. letters
flubendazol, pipamperone, cinarizina, cetoconazol, miconazol, rabeprazol, itraconazol, domperidona e propiconazole	0,612 – 0,143	afluente - efluente	Bélgica	2008	Steene, Chromatography A
Antilipêmicos (Bezafibrato), estimulante (cafeína), anti-epiléticos (Carbamazepina), antifúngos (Clotrimazol), analgésico antiinflamatório (<i>diclofenaco</i>), diuréticos (Furosemida), agentes reguladores lipídicos (Gemfibrozil), β bloqueadores (Metoprolol), antibióticos (<i>Sulfametoxazol</i>), agente antibacteriano (Trimetoprim), analgésico (ácido salicílico).	9,172 – 2,478	afluentes - efluentes	Irlanda	2008	Lacey, Talanta
Paracetamol, trimetoprim, <i>sulfametoxazol</i> , propranolol, Eritromicina, Dextropropoxifeno, Tamoxifeno, Lofepanina, <i>diclofenaco</i> , ácido mefenâmico,	Não foram detectados Não foram detectados Não foram detectados 0,186 – 1,327	Água da tomeira Água de rio Água do mar Água residual	Escócia	2007	Nebot, Analytica chimica acta
Ibuprofeno, ácido Clofibrato, Propranolol, <i>sulfametoxazol</i> , mebeverine, tionidazina, carbamazepina, tamoxifen, mecoprope, indomethacine, <i>diclofenaco</i> , ácido Meclofenâmico e monensina	0,0006 – 0,652	Água do rio	Reino Unido	2007	Zhang, Chromatography A
Analgésicos e antiinflamatórios (<i>diclofenaco</i> , ibuprofeno), reguladores de lipídios (Gemfibrozil, Pravastatina), psicotrópicos (<i>fluoxetina</i> , carbamazepina), Antiulcerosos (Lansoprazol), histamina (Ranitidina, Loratadina), antibióticos (sulfametoxazol, trimetoprim), β – bloqueadores (<i>atenolol</i> , Propranolol)	0,003 – 0,25 0,01 – 5,99 0,005 – 26,09	Água superficial Efluente água residual afluente de águas residuais	Espanha	2006	Gros, Talanta
Ácido salicílico, Ibuprofeno, Cetoprofeno, Naproxeno, Carbamazepina	0,015 - 19,4	afluente de ETE	Japão	2006	Nakada, Water research
Naproxeno <i>Diclofenaco</i>	0,009-0,080	água de rio	Slovenia	2005	Kosjek, Environment international
Ibuprofeno, <i>Diclofenaco</i> e Ac mefenâmico	0,150-2	efluente de tratamento de esgoto	Suíça	2005	Tauxe-Wuersch, Water research

Embora a preocupação mundial em determinar a presença de fármacos no meio ambiente seja motivo de trabalhos científicos, no Brasil ainda existem poucos dados publicados sobre a ocorrência dessas substâncias em amostras ambientais.

Em 1997, Stumpf *et al* desenvolveram um método buscando verificar resíduos de reguladores de lipídeos, antiinflamatórios e metabólitos. Algumas dessas drogas foram detectadas a concentração média de resíduos presentes em efluentes de ETE foi de 0,1 – 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ e em amostras de água de rio a concentração encontrada foi em média de 0,02 - 0,04 $\mu\text{g L}^{-1}$ no estado do Rio de Janeiro.

Em outro estudo desenvolvido no ano de 1997, Ternes *et al* determinaram estrogênios naturais e contraceptivos sintéticos na ETE da Penha/RJ e os estrogênios 17 β -estradiol e estrona foram determinados nas concentrações de 0,021 e 0,040 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

No ano de 2008, Suchara *et al* desenvolveram um método para detectar os seguintes fármacos: ibuprofeno, fenoprofeno, diclofenaco, diazepam e loratadina no resíduo de efluente de esgoto do Estado de Santa Catarina, mas nenhum desses compostos foi detectados.

Em outro estudo também relacionado ao Brasil, realizado por Sodré *et al* em 2010, os compostos: estigmasterol, colesterol, bisfenol A, cafeína, estrona e 17 β -estradiol foram determinados em amostras de água potável na cidade de Campinas no Estado de São Paulo. O composto bisfenol foi encontrado na concentração de 0,16 $\mu\text{g L}^{-1}$ e a cafeína na concentração de 0,22 $\mu\text{g L}^{-1}$. Esse mesmo grupo no ano de 2010, determinou os antibióticos amoxicilina, ampicilina, cefalexina, ciprofloxacina, norfloxacina, sulfametoxazol, tetraciclina e trimetoprim em amostras de água superficial. Foram detectadas as seguintes concentrações: 0,00045; 0,0089; 0,133; 0,119; 0,051; 0,106; 0,011e 0,484 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

3.2.4 Legislação e risco

As técnicas analíticas se tornam mais sensíveis e mais amplamente implantadas, e um número crescente de fármacos humanos e veterinários estão sendo detectados em diversas amostras ambientais em todo mundo. No entanto, a presença de fármacos no meio ambiente representa riscos ainda pouco conhecidos e não existem normas para regulamentar a sua presença (ANKLEY *et al*, 2007).

Nos Estados Unidos os produtos farmacêuticos no ambiente são regulamentados pela Agência dos Estados Unidos para a Administração de Alimentos e Drogas (USFDA). Esse regulamento obriga as indústrias a apresentarem um estudo ambiental para o registro de novos fármacos como um pedido de autorização para a introdução no mercado (HALLING-SORENSEN *et al*, 1999). A agência de proteção ambiental (USEPA, do *inglês U.S. Environmental Protection Agency*) não tem uma regulação nacional de água potável para Fármacos e Produtos de Higiene Pessoal como Poluentes (PPCPs, do *inglês Pharmaceuticals and Personal Care Products as Pollutants*). A USEPA acredita que não há informações suficientes para justificar a regulamentação de PPCPs em água potável até o momento (KOT-WASIK *et. al*, 2007).

Na Europa normas redigidas para avaliação do risco ambiental estão disponíveis já há alguns anos e em 2005 normas mais recentes foram disponibilizadas. Segundo a Agência Européia para Produtos Medicinais (EMA), se o valor de concentração ambiental predito encontrado for abaixo de $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$ o risco para o ambiente pelo produto medicinal é considerado improvável. Acima de $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$, a análise bruta do efeito ambiental deve ser executada (SUCHARA, 2007).

A diretiva (81/852/EEC) do conselho da União Européia estabelece para a segurança do meio ambiente que a concentração de fármacos veterinários não deve exceder $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$ no solo e $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ em águas subterrâneas (ARIESE *et. al*, 2001).

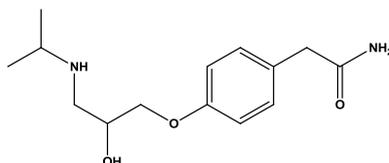
No Brasil, a Portaria nº 518, de 25 de março de 2004, que estabelece os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e o seu padrão de potabilidade, inclui as concentrações máximas de algumas substâncias orgânicas em águas para abastecimento humano, entretanto esta portaria não contempla os resíduos de PPCPs (BRASIL, 2004).

3.2.5 Principais características dos fármacos estudados

Os fármacos utilizados para esse trabalho são amplamente consumidos pela população e pertencem à classe dos Beta-bloqueadores (atenolol), agentes

antiinflamatórios não-esteróides (diclofenaco de sódio), estimulantes (cafeína), antibióticos (sulfametoxazol) e antidepressivos (fluoxetina).

3.2.5.1 Atenolol



- ✓ Nome Químico (IUPAC): (4 - [2 - hidroxí - 3 - [(1 - metiletil) amino] propoxi] - benzenoacetamida)^a
- ✓ Classe: β-bloqueador^a
- ✓ Fórmula Molecular: C₁₄H₂₂N₂O₃^b
- ✓ Número no Chemical Abstracts Service (CAS): 29122-68-7^a
- ✓ Massa Molar: 266,34 g/ mol^b
- ✓ Log K_{ow}: 0,16^b
- ✓ pKa: 9,6^b

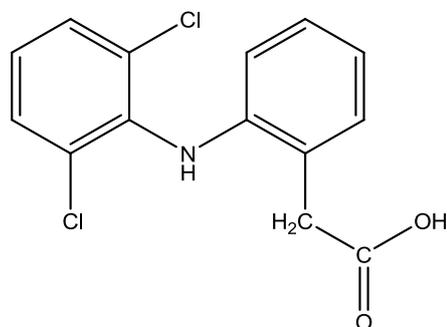
a) <http://www.chemindustry.com/chemicals/056748.html> acessado em dezembro de 2010.

b) Gros, M. et al. Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. **Talanta**, V. 70, p. 678–690, 2006.

O fármaco atenolol foi descoberto em 1958, e pertence à categoria dos beta-bloqueadores ou também chamados beta-adrenérgico, sendo um bloqueador seletivo de receptores β1 – adrenérgicos. Ele é muito hidrofílico e parece penetrar no Sistema Nervoso Central (SNC) apenas em grau limitado. Essa categoria tem recebido uma enorme atenção clínica, devido à sua eficácia no tratamento da hipertensão, da cardiopatia isquêmica, da insuficiência cardíaca congestiva e de certas arritmias (GOODMAN E GILMAM, 2010). Atualmente o atenolol é comercializado com o nome comercial de atenol nas dosagens de 25 mg, 50 mg e 100 mg, estando no 34^o lugar no ranking dos medicamentos mais comercializado no mundo (WEICH, 2007).

Os beta-bloqueadores constituem um grupo que trouxe grande contribuição à terapêutica cardiovascular, principalmente no tratamento da cardiopatia isquêmica e da hipertensão arterial. Introduzidos há cerca de uma década em tratamentos cardiovasculares, esses produtos têm sido extensivamente estudados e lançados no mercado. Entre eles incluem-se o propranolol, o practolol, o oxprenolol, o sotalol, o pindolol, o timolol, o acebutolol, o alprenolol, o metoprolol e o atenolol. A pesquisa experimental com esses fármacos começou em 1906 com Sir Henry Dale (SILVA, 2010).

3.2.5.2 Diclofenaco de sódio



- ✓ Nome Químico (IUPAC): (2 - [2 - (2,6-diclorofenil)] ácido aminofenílico etanóico)^a
- ✓ Classe: antiinflamatório
- ✓ Fórmula Molecular: C₁₄H₁₁Cl₂NO₂^b
- ✓ Número no Chemical Abstracts Service (CAS): 15307-86-5^a
- ✓ Massa Molar: 296,16 g/ mol^b
- ✓ Log K_{ow}: 4,51^b
- ✓ pKa: 4,14^b

a) <http://www.chemindustry.com/chemicals/056748.html> acessado em dezembro de 2010.

b) Gros, M. et al. Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. *Talanta*, V. 70, p. 678–690, 2006

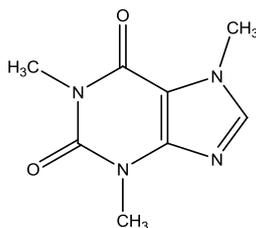
O diclofenaco é um antiinflamatório não esteróide desenvolvido na década de 60 e lançado no mercado inicialmente no Japão, em 1974 com o nome comercial de Voltaren[®]. Está entre os agentes farmacológicos mais utilizados, tanto na forma

prescrita como não prescrita, tendo ação de um potente analgésico, antipirético e antiinflamatório. Também é o fármaco mais freqüentemente detectado no ciclo da água na Europa (SUN *et al*, 2008).

Os principais agentes antiinflamatórios são representados pelos glicocorticóides e pelos Antiinflamatórios Não-Esteróides (AINEs). Os Agentes Antiinflamatórios Não- Esteróide estão entre os mais amplamente utilizados de todos os agentes terapêuticos e atualmente existem mais de 50 AINEs diferentes no mercado (RANG *et al*, 2007).

Os AINEs podem ser divididos em 12 grupos de compostos, sendo os mais utilizados os salicilatos (AAS), derivados do p-aminofenol (paracetamol), derivados propiônicos (ibuprofeno, naproxeno, fenoprofeno), derivados do ácido fenilacético (diclofenaco), derivados de oxicans (piroxicam), entre outros (SUCHARA, 2007).

3.2.5.3 Cafeína



- ✓ Nome Químico (IUPAC): 3,7 dihidro-1, 3,7 trimetil-1H-purina-2,6 diona^a
- ✓ Classe: alcalóides^a
- ✓ Fórmula Molecular: C₈H₁₀N₄O₂^a
- ✓ Número no Chemical Abstracts Service (CAS): 58-08-2
- ✓ Massa Molar: 194,19 g/ mol^a
- ✓ Log K_{ow}: 0,01^a
- ✓ pKa: 10,0^a

a) <http://www.chemindustry.com/chemicals/056748.html> acessado em dezembro de 2010.

A cafeína (1, 3,7-trimetilxantina), pertence ao grupo das substâncias químicas chamadas metil-xantinas. É um suave estimulante do sistema nervoso e a droga psicoativa mais utilizada em todo mundo. Está presente em refrigerantes, café, chá,

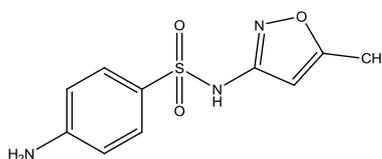
cacau, chocolate e vários fármacos vendidos com e sem prescrição. Contudo, grandes bebedores de café podem desenvolver o chamado “cafeinismo” e experimentar crises de abstinência à sua retirada brusca (SILVA, 2010; GOODMAN e GILMAN, 2010).

Experiências têm demonstrado que doses de 300 mg (1,5 xícaras de café forte) levam a um ótimo rendimento físico e intelectual, enquanto doses acima de 600 mg podem causar sinais perceptíveis de confusão mental e indução de erros em tarefas intelectuais. Em doses elevadas, observa-se agitação nervosismo, sensação de angústia e até delírio tipo anfetamínico. (SILVA, 2010).

A média de consumo global era de 70 mg por pessoa por dia em 1991, mas estima-se que o uso tenha aumentado consideravelmente nos últimos anos, tendo proporções diferentes entre os diversos países. A cafeína está incluída na lista da USEPA dos compostos químicos produzidos em maior volume no mundo.

A presença deste composto no ambiente, principalmente nas águas naturais é, sobretudo de origem antrópica. Estudos têm mostrado que uma certa porcentagem de cafeína, entre 3 e 10 %, não é absorvida pelo organismo e é excretada na urina (CHEN *et al*, 2002 ; Raimundo, 2007).

3.2.5.4 Sulfametoxazol



- ✓ Nome Químico (IUPAC): 4-amino-N-(5-metil-3-isoxazolil) benzenossulfonamida^a
- ✓ Classe: antibiótico
- ✓ Fórmula Molecular: C₁₀H₁₁N₃O₃S^a
- ✓ Número no Chemical Abstracts Service (CAS): 723-46-6

- ✓ Massa Molar: 253,27g/mol^a
- ✓ Log K_{ow}: 0,89^a
- ✓ pKa: 1,85 - 5,60^a

a) <http://www.chemindustry.com/chemicals/056748.html> acessado em dezembro de 2010.

Sulfametoxazol é um antibiótico que pertence ao grupo das sulfonamidas, foram os primeiros agentes quimioterápicos eficazes a serem utilizados por via sistemática na prevenção e na cura de infecções bacterianas no homem. O termo sulfonamidas, ou simplesmente sulfas, é comumente empregado como denominação genérica dos derivados da para-aminobenzenossulfonamidas (GOODMAN e GILMAN, 2010; SILVA, 2010).

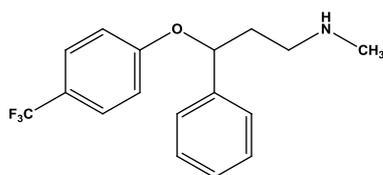
Antibióticos são definidos como compostos polares, não voláteis, hidrofílicos, semi-sintéticos e sintéticos, com atividade antimicrobial, que podem ser aplicados parenteralmente, oralmente ou topicamente. O sulfametoxazol pode ser eliminado quase exclusivamente pela urina, numa proporção de 10 a 30%, inalterado.

A liberação de antibióticos em compartimentos aquáticos pode acarretar contaminação de águas em geral (água de superfície, subterrânea, não tratada ou tratada para consumo humano), potencializando resistência das bactérias à antibióticos, bem como, gerar efeitos negativos em bactérias importantes para os ecossistemas (morte ou inibição) (BRENNER, 2009).

Na década de 1930, Domangk foi o primeiro a demonstrar que um agente quimioterápico era capaz de influenciar a evolução de uma infecção bacteriana. A droga usada foi o prontossil, um corante que demonstrou ser uma pró-droga inativa in vitro, que precisava ser metabolizada in vivo para produzir o produto ativo – a sulfanilamida. Deste então, numerosas sulfonamidas foram desenvolvidas (RANG *et al*, 2007).

Com o advento da penicilina e de outros antibióticos, e em virtude do surgimento da resistência às sulfonamidas, estas passaram a ocupar menor destaque entre os agentes antibacterianos, possuindo atualmente reduzida aplicação clínica. Com a introdução da trimetoprima, em meados da década de 1970, associada ao sulfametoxazol, houve considerável ampliação no uso das sulfanamidas (GOODMAN e GILMAN, 2010).

3.2.5.5 Fluoxetina



- ✓ Nome Químico (IUPAC): N-metil-3-fenil-3-[4-(trifluorometil) fenoxi] propan-1-amina^a
- ✓ Classe: antidepressivo^a
- ✓ Fórmula Molecular: C₁₇H₁₈F₃NO^b
- ✓ Número no Chemical Abstracts Service (CAS): 54910-89-3^a
- ✓ Massa Molar: 309,33 g/mol^b
- ✓ Log K_{ow}: 3,82^b
- ✓ pKa: 8,7^b

a) <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00472> acessado em dezembro de 2010.

b) Gros, M. et al. Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. *Talanta*, V. 70, p. 678–690, 2006

A fluoxetina, pertencente aos inibidores da recaptação da serotonina e é usada no tratamento da depressão, da bulimia nervosa, transtorno disfórico pré-menstrual, síndrome do pânico e estresse pós-traumático. Esse fármaco foi introduzido no mercado na década de 1980. Na verdade, fluoxetina é um inibidor seletivo da recaptação da serotonina e não da captação de noradrenalina, com pouca afinidade para os receptores muscarínicos, histamínicos, a serotonina, ou receptores noradrenérgicos (SABBIONI *et al*, 2004).

A disponibilidade e a utilização dos fármacos que têm eficácia demonstrada nos transtornos psiquiátricos vêm aumentando desde o final dos anos 1950, ao ponto que 10 a 15% das prescrições emitidas nos Estados Unidos da America (EUA) referem-se a fármacos desenvolvidos para alterar processos mentais (GOODMAN e GILMAN, 2010).

Os antidepressivos são uma classe de fármacos utilizados no tratamento da depressão ou qualquer outro problema mental. Estes são classificados em tricíclicos,

por exemplo, imipramina e amitriptilina, inibidores seletivos da captação de 5-HT, como por exemplo fluoxetina, paroxetina e os atípicos, por exemplo, maprotilina e bupropiona (RANG *et al*, 2007).

3.3 Análise de fármacos

Nos últimos anos numerosos estudos têm demonstrado a ocorrência de fármacos em sistemas aquáticos. Eles têm sido detectados em baixas concentrações (na faixa de ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$) associados a matrizes complexas como efluentes e afluentes de esgoto, e em água de superfície, exigindo uma grande demanda de trabalho analítico para determinação eficiente desses compostos (WILLE *et al*, 2010). Assim, tem sido um desafio desenvolver e validar métodos analíticos que possam determinar, em baixas concentrações, os fármacos em matrizes ambientais complexas (JØRGENSEN *et al*, 2000).

Progressos rápidos no desenvolvimento de métodos analíticos para análise de fármacos têm sido facilitados pela existência de considerável perícia na análise de resíduos de pesticidas. As estratégias usadas com sucesso na rotina da análise de traços de pesticidas podem ser rapidamente aplicadas para resíduos de fármacos (BUCHBERGER *et al*, 2007).

Então, a determinação de fármacos compreende basicamente as etapas de extração e pré-concentração do analito, eliminação de interferentes, separação, detecção e quantificação dos analitos.

3.3.1 Técnicas de extração e pré-concentração de fármacos em água

A etapa de preparo da amostra é um dos passos mais importantes na análise de compostos orgânicos em matrizes ambientais. Ela desempenha um papel fundamental, pois pode influenciar os resultados analíticos de diversas maneiras, por exemplo, devido às perdas dos analitos, contaminação ou impurezas interferindo no processo de extração (KOSTOPOULOU *et al*, 2008).

Consequentemente, há a necessidade de métodos analíticos confiáveis, que permitam a determinação sensível e seletiva dessas substâncias, pelo fato de muitos

desses contaminantes estarem presentes no meio ambiente em nível de traços, exigindo o uso de técnicas que possibilitem pré-concentrar os analitos da matriz para adequação ao sistema de detecção. Várias técnicas de preparo de amostra já estão disponíveis para a determinação de diferentes classes de fármacos em amostras de águas (KOSTOPOULOU *et al*, 2008; SUCHARA,2008).

As técnicas mais comumente utilizadas são: extração em fase sólida (SPE) [Wille, 2010; Nödler, 2010; Varga, 2010], microextração em fase sólida (SPME) [García, 2009; Saito, 2010] e a microextração dispersiva líquido-líquido (DLLME) (GUO *et al* ,2009; MONTES *et al*, 2009; XIE *et al*, 2009; Xiong *et al*, 2009; Yazdi *et al*, 2008).

As técnicas de preparação de amostras têm sido automatizadas para possibilitar a eliminação de erro humano de manipulação, diminuir o tempo de assistência do analista durante a análise, evitar o risco de contato com substâncias prejudiciais a saúde e aumentar significativamente a velocidade analítica (SUCHARA,2008).

3.3.2 Extração em fase sólida

Em meados da década de 1970, foi introduzida a denominada extração em fase sólida SPE (do inglês, *Solid Phase Extracion*).

A SPE é uma técnica de separação líquido-sólido, baseada nos mecanismos de separação da cromatografia líquida de baixa pressão, também conhecida como cromatografia líquida clássica. A SPE emprega sorventes recheados em cartuchos nas formas de discos ou seringa. A eluição da amostra ocorre por gravidade ou pressão com o auxílio de uma seringa ou bomba a vácuo (LANÇAS, 2009).

Um cartucho típico é formado por um tubo de polipropileno contendo cerca de 50 a 500 mg de sorvente com 40-60 µm de tamanho de partícula, fixado no tubo através de dois filtros, estes são constituídos de politetrafluoretileno (PTFE conhecido comercialmente como teflon) ou fibras de vidro, flexíveis, embebidas ou impregnadas com a fase estacionária (QUEIROZ, 2001). Uma representação esquemática do sistema SPE está apresentado na Figura 2.

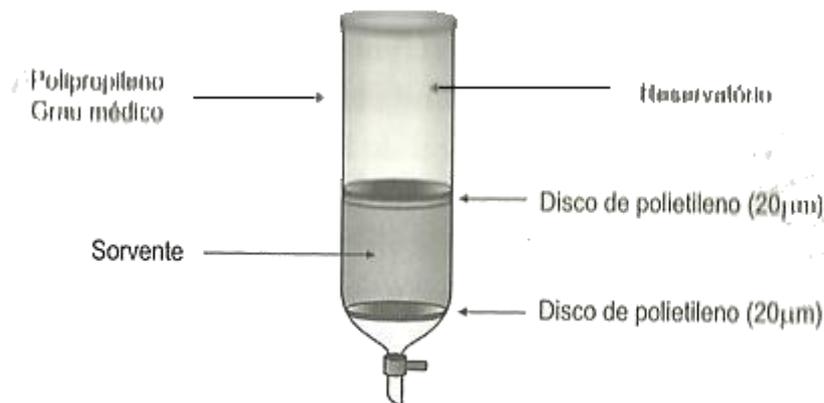


Figura 2 - Dispositivo básico de SPE
Fonte:Lanças,2009

A SPE é uma das técnicas de extração mais empregadas no preparo de amostras e suas inúmeras aplicações somente são possíveis devido à diversidade e versatilidade dos materiais contidos nos dispositivos de extração, permitindo diferentes modos de operação e mecanismos de separação (HENNION, 1999).

Na análise de amostras ambientais a extração em fase sólida (SPE) é a técnica atualmente mais utilizada na extração e pré-concentração de resíduos de fármacos, pesticidas organoclorados, organofosforados e nitrogenados, clorofenóis, ftalatos, sulfonatos aromáticos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, entre outros analitos (MAGNÉR *et al*, 2010; WEIGEL *et al*, 2001).

Devido a necessidade de se extrair compostos mais polares a extração em fase sólida tornou-se um dos métodos da Environmental Protection Agency (EPA) para análise de compostos orgânicos em água, em alternativa ao método de extração líquido-líquido (LLE), na qual necessitava de volume de solvente orgânico de aproximadamente 500 mL contra apenas 10 mL na SPE . A Figura 3 mostra a sequência das etapas extração líquido-líquido e extração em fase sólida para a análise de micropoluentes em água.

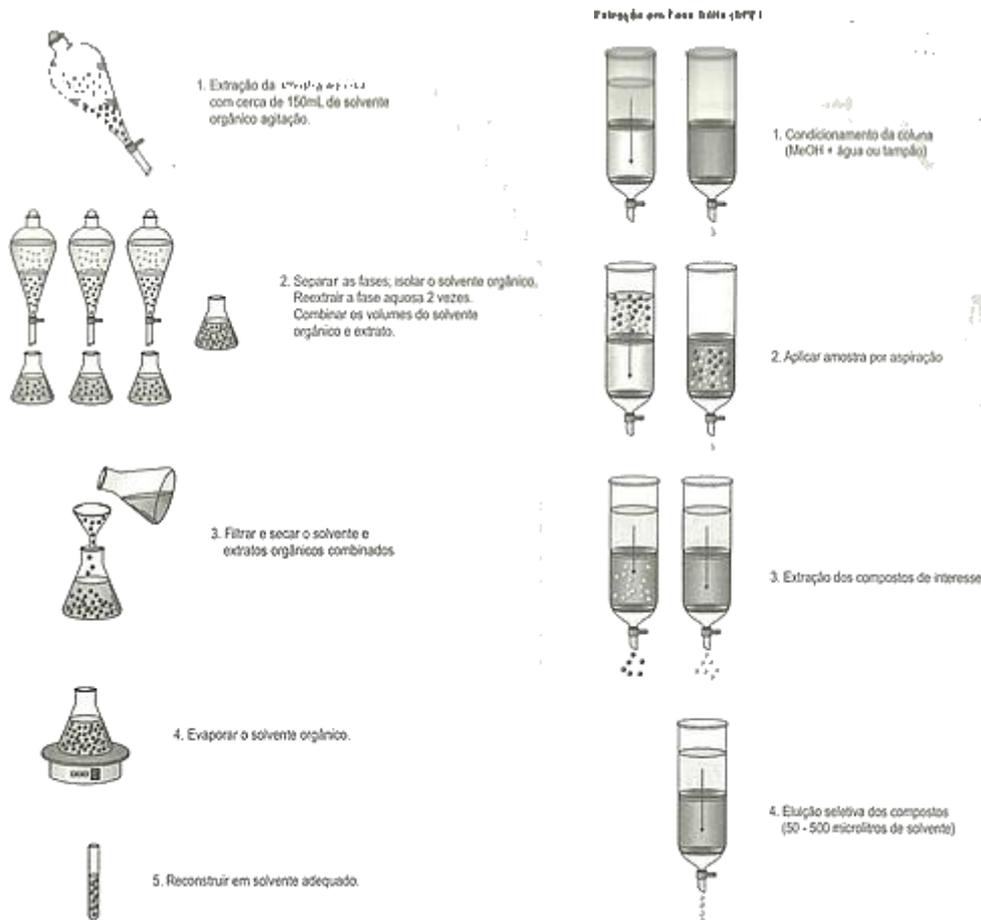


Figura 3 Sequência de etapas na extração líquido-líquido e na extração em fase sólida
Fonte: Lanças, 2009.

A SPE é facilmente automatizada, permitindo extrair dezenas de amostras simultaneamente, o que não ocorre com a extração líquido – líquido. A extração em fase sólida além de apresentar melhores recuperações, o tempo gasto de extração é menor, requer menor consumo de reagentes e permite uma maior seletividade que a extração líquido-líquido (HENNION, 1999; LANÇAS, 2009).

Os diferentes modos de operação na SPE podem ser classificados em: (a) concentração ou enriquecimento do analito, onde o objetivo principal é passar através do cartucho, um grande volume de amostra a fim de aprisionar somente o analito; (b) isolamento do analito (clean-up), o objetivo principal não é o de concentrar a amostra, mas, sim, isolar o analito de interesse dos interferentes da matriz; (c) isolamento da matriz, onde a qual intenção é reter os interferentes da matriz e não o analito e (d) estocagem da amostra, é bastante empregada para a análise de amostras que se encontram em local distante do laboratório analítico e muito usada para evitar o transporte de grandes volumes de amostras (LANÇAS, 2009).

As etapas envolvidas na SPE são mostradas na Figura 4 e podem ter pequenas variações dependendo do modo de operação, mas basicamente são divididas em quatro (Lanças, 2009):

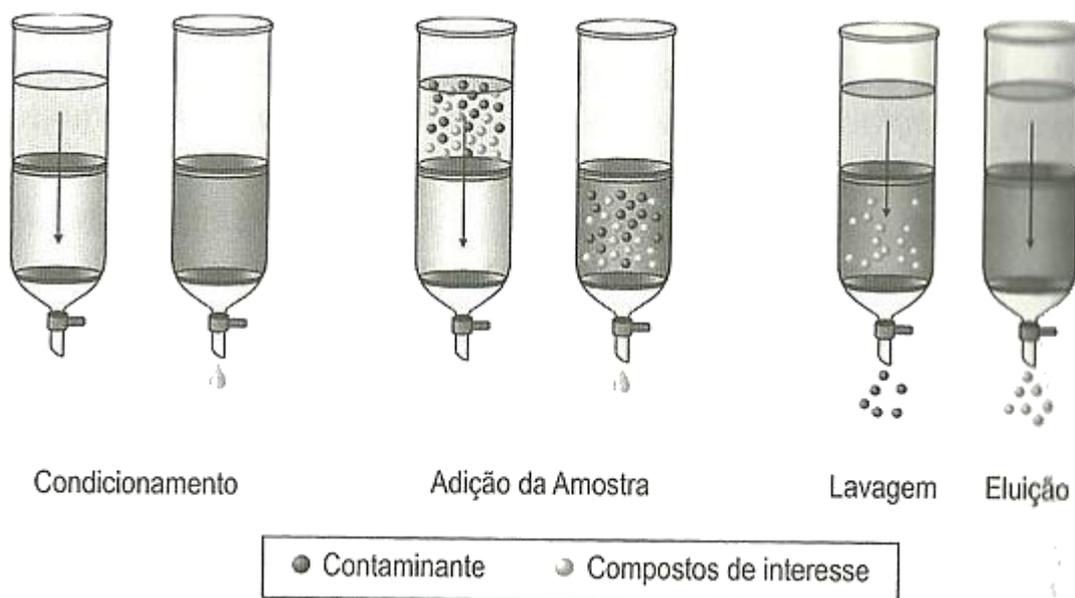


Figura 4 - Principais etapas empregadas na SPE visando o isolamento de um composto (ou classe de compostos)

- ✓ Condicionamento do cartucho: serve para ativar o material existente dentro do cartucho, o solvente a ser empregado dependerá, principalmente, do material a ser ativado. Um dos fatores mais importantes é não deixar o material dentro do cartucho secar, ou seja, não deixar que todo o solvente seja eliminado. A secagem do material poderá criar vários problemas, dentre os quais, a formação de caminhos preferenciais.
- ✓ Adição da amostra: dependendo do volume de amostra (mL até L) pode ser feita com pipeta, micropipeta ou seringa. A transferência da amostra para o cartucho deve ser quantitativa e lenta para ter resultados reprodutíveis.
- ✓ Limpeza da Coluna: lavagem com solvente para retirar os interferentes, mas que não possua força para retirar o analito.
- ✓ Eluição do analito: ideal eluir com pequeno volume de eluente.

Os mecanismos de separação usados na SPE são os mesmos da cromatografia líquida: adsorção, partição (fase normal e reversa), troca iônica e exclusão por tamanho.

Na **adsorção** os adsorventes mais usados, são a sílica, a alumina e o silicato de magnésio - florissil®. A sílica é utilizada para propósitos gerais, enquanto florissil® é muito empregada em análise de pesticidas, no entanto este é o mais polar e assim poderá provocar adsorção irreversível do analito de interesse em sua superfície. A sílica gel possui uma superfície ligeiramente ácida que permite a retenção de compostos básicos, enquanto que a superfície básica da alumina é apropriada para a adsorção de compostos de caráter ácido.

O mecanismo da **partição** empregada na SPE surgiu para evitar problemas de adsorção irreversível que ocorria na utilização de adsorventes polares em análise de compostos altamente polares. Quase todas as fases que empregam partição na SPE são preparadas a partir da sílica utilizada em processos de adsorção, onde geralmente a sílica reage com um derivado clorado do grupo siloxano, ligando o grupo alquílico (R) do reagente à estrutura básica da sílica. Na partição este mecanismo pode ocorrer de duas formas: fase reversa e fase normal. Na fase reversa, o sorvente é menos polar que o solvente de eluição; e na fase normal, o solvente é menos polar que o sorvente.

A **troca iônica** é geralmente empregada para o isolamento de analitos de caráter ácido ou básico presentes em soluções aquosas. Os compostos básicos são usualmente retidos por intermédio de uma fase sólida, consistindo de um trocador forte de cátions (SCX) do tipo SO_3 aprisionado a estrutura básica da sílica, enquanto os compostos ácidos são retidos por trocadores fortes de ânions (SAX) do tipo $\text{N}+(\text{CH}_3)_3$. Dessa forma ocorrerá uma forte atração entre o analito e o trocador de íons de carga oposta. Os principais fatores que influenciam a separação por troca iônica são: pH, seletividade do contra-íon, força iônica, solvente e fluxo.

A **exclusão por tamanho** tem sido utilizada para eliminar compostos indesejáveis da amostra por intermédio de um mecanismo físico de separação, similar a uma filtração. A fase sólida é formada por um polímero (formado de unidades de glicose e epiclorigirina), cujo tamanho de poros é bem controlado, de forma a permitir a entrada de moléculas pequenas do analito e excluir as maiores indesejáveis.

Os adsorventes são os responsáveis pela retenção na SPE. Materiais como sílica gel, alumina, silicato de magnésio (Florissil), carvão ativado, polímeros (estireno-divinil benzeno como XAD-2 e PRP-1) e fases baseadas em sílica quimicamente ligadas, são amplamente empregadas em SPE(LANÇAS, 2009).

Estudos visando desenvolver fases de SPE com aplicações mais específicas constantemente são desenvolvidos. Um exemplo são as fases poliméricas, as quais possuem maior capacidade do que as de sílica e a seletividade é usualmente superior àquelas obtidas com as fases derivadas da sílica gel. Sorventes para SPE baseados em polímeros são tipicamente compostos de ligações altamente cruzadas de poliestireno-divinilbenzeno (PSDVB ou SDB). Assim como a sílica, a polaridade da superfície de SDB pode ser modificada pela adição de vários grupos funcionais. Os sorventes poliméricos são recomendados para substâncias de média à alta polaridade, onde eles podem apresentar recuperação maior que sorventes de alquilsílica de FR ou extração líquido-líquido.

Os sorventes de poliestireno-divinilbenzeno são sólidos rígidos microporosos ou apresentam uma mistura de microporos ou mesoporos, em contraste com sílica o sorvente polimérico é estável numa faixa de pH de 1 – 13, é bastante usado como material de fase reversa e o mecanismo de separação que ocorre é o de adsorção dos analitos por meio de forças de Van Der Waals, que permite uma dessorção fácil (SUCHARA,2008; FARIA, 2004).

Wille e colaboradores em 2010 testaram a eficiência de diferentes adsorventes OASIS HLB, Strata-X, Chromabond HR-X, Bakerbond Speedisk para determinação de fármacos em água do mar. O adsorvente Chromabond HR-X foi escolhido pois obteve recuperações maiores que 70%.

Em outro estudo comparativo Lacey e colaboradores em 2008 testaram os adsorventes Strata-X, Supelco C8, Supelco C18, Oasis HLB, Varian Focus, LiChrolut-EN para determinação de 20 fármacos em água residual e efluentes de tratamento de esgoto. O adsorvente escolhido foi o Strata – X.

Hilton e colaboradores em 2003 utilizaram diferentes tipos de sorventes para análise de 13 fármacos (sulfametoxazol, trimetoprim, eritromicina, paracetamol, ibuprofeno, ácido clofibrato, diclofenaco, propranolol, entre outros) em efluentes de tratamento de esgoto e água de superfície. Os autores avaliaram as colunas Isolute ENV, Isolute C18, Isolute C8, Oasis HLB e Oasis MCX, Varian Bond Elut e Phenomenex Strata X. O cartucho Strata X foi obteve recuperações maiores que 60% e foi considerada como sendo a melhor fase extratora para a maioria dos compostos analisados.

Alguns trabalhos utilizando sorvente C18 para determinação de fármacos em diferentes matrizes aquosas podem ser encontrados na literatura. Stumpf e

colaboradores em 1999 utilizaram cartuchos C18 para determinação de resíduos de fármacos polares (AAS; diclofenaco, ácido clofibrico, ibuprofeno, indometacina, entre outros) em esgoto e água natural.

Bendzs colaboradores em 2005 investigaram a ocorrência e a persistência de fármacos ácidos de diferentes classes terapêuticas (antiinflamatórios, reguladores de lipídeos, drogas antiepilépticas, antibióticos e β -bloqueadores) em amostras ambientais também através do uso de sorvente C18.

3.4 Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria de massas

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição desses componentes em duas fases, que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária enquanto a outra se move através dela. É uma das principais técnicas utilizadas na análise de compostos não voláteis e/ou termicamente instáveis (COLLINS *et al*, 2006; CHIARADIA *et al*, 2008).

A cromatografia pode ser combinada a diferentes sistemas de detecção, tratando-se de uma das técnicas analíticas mais utilizadas e de melhor desempenho. O acoplamento de um cromatógrafo com o espectrômetro de massas combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da espectrometria de massas (obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade) (CHIARADIA *et al*, 2008).

O espectrômetro de massas é um instrumento sofisticado constituído basicamente de três partes: fonte de ionização, muitas vezes denominada interface, analisador de massas e detector de íons com aquisição/processamento de dados. Após a injeção da amostra no MS, ocorre a produção de íons pela fonte de ionização (COLLINS *et al.*, 2006). As fontes de ionização mais empregadas, que produzem ionização em pressão atmosférica, são: Ionização por Electrospray (ESI); Ionização Química a Pressão Atmosférica (APCI) e Fotoionização à Pressão Atmosférica (APPI) (LANÇAS, 2009).

Dentre as fontes de ionização desenvolvidas, as mais empregadas são as que produzem ionização em pressão atmosférica (API, do inglês Atmospheric Pressure Ionization). Estas fontes são a Ionização Química a Pressão Atmosférica (APCI, do inglês Atmospheric Pressure Chemical Ionization) e a Ionização por Electrospray (ESI, do inglês Electrospray Ionization) (COLLINS *et al.*, 2006; CHIARADIA *et al.*, 2008)

Na ESI, o líquido no qual o analito de interesse se encontra dissolvido (na FM, no caso do eluente da CLAE) passa através de um capilar, à pressão atmosférica, mantido sob alta voltagem. Na saída do capilar são formadas pequenas gotas altamente carregadas (“spray”) que são dessolvatadas ao se deslocarem em sentido contrário ao posicionamento de um eletrodo em uma região de pressão atmosférica. A dessolvatação é assistida por um fluxo contínuo de gás seco (geralmente N₂) na região do “spray”. À medida que ocorre a dessolvatação, uma série de explosões passa então a ocorrer até que são produzidos íons do analito a partir destas gotas, os quais são transferidos para o interior do espectrômetro de massas por uma série de dispositivos de focalização. (Chiaradia *et al.*, 2008)

Na APCI, o eluente da coluna cromatográfica passa através de um nebulizador pneumático no qual gotas são geradas e dessolvatadas. O “spray” formado passa por uma região aquecida na qual o vapor é seco, formando espécies neutras que passam através de uma corona de descarga. Um campo suficiente para gerar ionização é aplicado na corona. Como o solvente (proveniente da FM) encontra-se em maior concentração no “spray” que o analito, este é ionizado preferencialmente e passam a ocorrer reações entre estes íons em fase gasosa e as moléculas neutras do analito, o que dá origem aos íons do analito (Chiaradia *et al.*, 2008). A Figura 5 ilustra a fonte APCI.

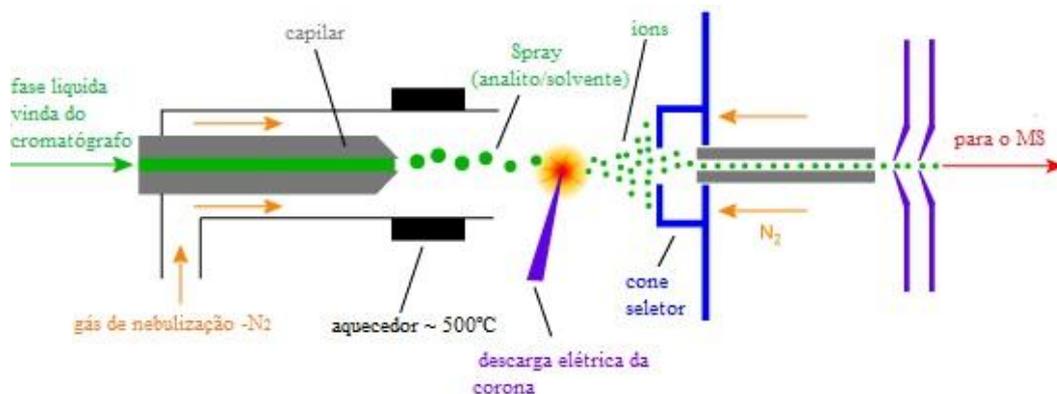


Figura 5 - Interface do tipo APCI para LC-MS. Adaptado de: University of Bristol, www.bris.ac.uk/nerclsmf/techniques/hplcms.html.

Após a ionização, os íons são analisados pelo analisador de massas de acordo com sua razão massa/carga. Para algumas misturas complexas é necessário o acoplamento de dois ou mais analisadores de massas em conjunto, em uma técnica conhecida como espectrometria de massas *tandem*. Os espectrômetros de massas *tandem* são do tipo de triplo quadrupolo. No sistema de triplo quadrupolo, o primeiro quadrupolo age como um filtro de massas selecionando o íon de interesse. Esse íon é então fragmentado por colisão com um gás inerte em uma célula de colisão (segundo quadrupolo). O terceiro quadrupolo analisa os fragmentos produzidos (VÉKEY, 2001; SKOOG, 2009).

3.4.1 Efeito de Matriz em LC- APCI-MS/MS

O efeito matriz (EM) ocorre quando constituintes interferentes da amostra co-eluem com o composto de interesse alterando a eficiência de ionização suprimindo ou enriquecendo o sinal dos mesmos (TAYLOR, 2005; GOSETTI, 2010). O mecanismo exato do EM é desconhecido, mas provavelmente se origina a partir da competição entre uma substância e o co-eluente componente da matriz não monitorado (RODRIGUES, 2010)

O LC/MS é altamente seletivo no método de monitoramento de íons selecionado no modo de monitoramento de reações múltiplas. Apenas o sinal de interesse é registrado, deixando de fora a informação sobre a ocorrência de todos os

outros compostos. Isto significa que os outros constituintes da amostra não interferem nos resultados. No entanto, os outros compostos, embora invisíveis no sinal de LC/MS podem, e muitas vezes interferem na análise. A interferência da matriz representa uma desvantagem em praticamente todas as técnicas instrumentais e infelizmente também na cromatografia líquida por detecção pela espectrometria de massas (KRUIVE *et al*, 2008; GOSETTI *et al*, 2010).

Além dos interferentes da matriz o processo de extração pode trazer para o extrato interferentes devido a materiais como resíduos de polímeros e ftalatos liberados a partir dos tubos plástico utilizados na extração em fase sólida (SPE) ou em colunas do LC. Os reagentes adicionados à fase móvel para melhorar a formato do pico cromatográfico e auxiliar no processo de ionização dos compostos, como sais, tampões e ácidos orgânicos também podem ser responsáveis pelo EM.

Comportamentos diferentes são relatados na literatura quando se utiliza diferentes fontes de ionização como ESI e APCI, já que estas são diferentes formas de ionização dos analitos. Muitos autores observaram supressão do sinal tanto nas fontes ESI e APCI e a maioria deles considerou que o efeito é menor em APCI. Um aumento de sinal em APCI foi observada, principalmente na presença de alta porcentagem de modificador orgânico na fase móvel. (GOSETTI *et al*, 2010)

Existem dois métodos comuns para avaliar o efeito de matriz: o método de infusão pós-coluna, definido por Bonfiglio e colaboradores, e o de fortificação pós-extração, proposto por Matuszewski e colaboradores. O método de infusão pós-coluna fornece uma avaliação qualitativa do efeito matriz, pela identificação cromatográfica das regiões mais susceptíveis de sofrer o efeito. O método fortificação pós-extração avalia quantitativamente o efeito matriz através da comparação da resposta do analito adicionado ao extrato branco da matriz e a resposta do padrão preparado em um determinado solvente ou na fase móvel (VARGAS *et al*, 2010).

Para minimizar a influência dos componentes da matriz na quantificação no LC-MS são utilizadas estratégias como a limpeza dos extratos, o método do padrão interno deuterado e a curva analítica preparada pela dissolução dos padrões em extratos branco da matriz (PRESTES, 2007, GOSETTI *et al*, 2010).

As primeiras publicações sobre a determinação de fármacos em água não cogitavam que pudesse existir efeito de matriz nessa amostra, mas atualmente

vários artigos estudam efeito matriz em águas, tanto em água superficial a qual pode conter interferentes como ácidos húmicos e fúlvicos e também em água da torneira no qual os sais contidos ou mesmo os produtos utilizados para purificar a água podem ser interferentes na análise.

Numa investigação sobre EM Conley e colaboradores, 2008, determinaram 13 fármacos em água superficial por LC-ESI-MS/MS. Os autores observaram que todos os analitos foram suprimidos pelo sinal.

Grujić e colaboradores, 2009 investigaram o EM para determinação de fármacos por LC-ion-trap- MS/MS em águas superficiais e subterrâneas. Os autores utilizaram a comparação da curva no extrato e a curva no solvente para avaliar o efeito matriz. Para a maioria dos analitos, o sinal não foi afetado pelos constituintes da matriz, no entanto, para cefalexina e dipirona, houve significativa supressão do sinal.

3.4.2 Validação de métodos cromatográficos

Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve ser submetido a uma avaliação denominada validação. Visando diminuir ou controlar os fatores que levam à imprecisão ou inexatidão de um dado gerado (RIBANI *et al*, 2004; LANÇAS 2004).

Segundo Ribani e colaboradores 2004, a validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência, sendo que um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado.

Vários trabalhos na literatura descrevem os parâmetros que devem ser avaliados na validação de métodos e, geralmente há uma concordância que estes parâmetros analíticos devem incluir: curva analítica, linearidade, exatidão, precisão, limites de detecção e de quantificação.

3.4.3 Curva analítica e linearidade

A curva analítica corresponde ao modelo matemático que estabelece uma relação entre a resposta instrumental (área/altura da banda cromatográfica) e a

concentração do analito. É necessário elaborar uma curva de calibração para cada analito que se deseja determinar e para cada corrida analítica. Esta relação matemática geralmente é chamada curva analítica (CASSIANO et al., 2009).

As diretrizes da ICH e da ANVISA especificam um mínimo de cinco níveis de concentração, juntamente com certos mínimos de variação especificados. O Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas (GARP) também sugere cinco concentrações que devem ser injetadas em ordem crescente de concentração, no mínimo três vezes cada, com estimativa do desvio padrão relativo (RSD) entre as injeções inferior a 5 % (Rodrigues, 2010)

A estimativa dos coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser efetuada usando o método matemático conhecido como regressão linear (Equação 1) (LANÇAS 2004)

$$y = ax + b \quad (1)$$

Onde:

y = resposta medida (altura ou área do pico);

x = concentração;

a = inclinação da curva analítica = sensibilidade;

b = interseção com o eixo y.

A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados em função da concentração do analito ou então calculados a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados. O coeficiente de correlação linear (r) é freqüentemente usado para indicar o quanto pode ser considerada adequada a reta como modelo matemático. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90 (RIBANI, 2004).

3.4.4 Limite de quantificação e limite de detecção

Os termos limite de quantificação (LOQ) e limite de detecção (LOD) são utilizados para demonstrar a habilidade do método em quantificar/detectar baixas concentrações de um analito. O LOD é definido como a menor concentração de um analito que o método é capaz de diferenciar confiavelmente do ruído. O LOQ refere-se a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão e exatidão. (RIBANI et al., 2004; CASSIANO et al., 2009).

Ambos, LOD e O LOQ, podem ser estimados através do método visual, do método relação sinal/ruído e método baseado em parâmetros da curva analítica. A razão sinal/ruído com valor 3 e 10 é geralmente considerada aceitável para estimar o limite de detecção e quantificação, respectivamente. O método relação sinal/ruído é o mais utilizado para técnicas analíticas em geral, sendo que pode ser aplicado apenas para procedimentos analíticos que apresentam o sinal do ruído da linha de base (RIBANI et al., 2004; LANÇAS, 2004).

3.4.5 Exatidão

Representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. É importante observar que um valor exato ou verdadeiro é o valor obtido por uma medição perfeita e este valor é indeterminado por natureza (RIBANI *et al*, 2004).

Os guias do FDA e da ANVISA preconizam que a precisão e a exatidão devem ser investigadas pela análise de, no mínimo, 3 controles de qualidades (CQ) analisados em 5 replicatas de preparo de amostras, com níveis de concentrações baixa (CQB), média (CQM) e alta (CQA) em relação ao intervalo de concentração da curva de calibração (CASSIANO *et al*, 2009)

Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$. Porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até $\pm 15\%$. Pelo fato de outros componentes da matriz poderem interferir na separação, detecção ou na quantificação da substância, efeitos dos componentes da matriz devem ser investigados durante a avaliação da exatidão do método (RIBANI et al., 2004; SANCO, 2009).

3.4.6 Precisão

A precisão de um método analítico é a medida dos erros aleatórios e representa a proximidade dos resultados obtidos a partir de medidas independentes de amostragens múltiplas de uma amostra homogênea. Este é um importante parâmetro que possibilita decidir se o método analítico é confiável ou não para o objetivo da análise. A precisão é expressa pelo desvio padrão relativo, sendo aceitáveis valores menores ou iguais a 20% para análise de resíduos. A precisão deve ser avaliada de três maneiras: através da repetibilidade (precisão intra-dia); precisão intermediária (precisão inter-dias) e reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial) (CASSIANO et al, 2009; RIBANI et al, 2004).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento experimental consistiu na validação de um método para determinar resíduos de fármacos em águas superficiais e de abastecimento público empregando a SPE para extração e pré-concentração das amostras. E LC-APCI-MS/MS para a determinação dos compostos.

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos e Metais (LACOM), da Escola de Química e Alimentos (EQA), na Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

4.1 Compostos escolhidos para este estudo

Para este estudo foram selecionados cinco fármacos (antiinflamatório, β -bloqueador, alcalóide, antibiótico, antidepressivo) que foram: diclofenaco de sódio, atenolol, cafeína, sulfametoxazol e fluoxetina. A escolha dos fármacos baseou-se em uma pesquisa feita nas maiores redes de farmácia do município de Rio Grande-RS sendo este os fármacos mais prescritos. Estes fármacos fazem parte da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME).

4.2 Instrumentação

- Balança Analítica de precisão modelo FA 2104N, Bioprecisa;
- Bomba de vácuo Tecnal TE-058 (Piracicaba, SP, Brasil);
- Micropipetadores automáticos com capacidade variável (100 – 1000 µL) (Labmate, Polônia; Digipet);
- Sistema de filtração em membrana Phenomenex;
- Sistema de Purificação de água Milli-Q Direct-Q UV3[®] Millipore (Millipore, Bedford, MA, USA);
- Sistema *manifold* para SPE Phenomenex (Torrance, CA, USA) para a pré-concentração simultânea de até 12 amostras;
- Ultra-som Quimis[®] modelo Q335D (Diadema, SP, Brasil);
- pHmetro modelo pH21 Hanna – eletrodo de vidro combinado com BNC (São Paulo, Brasil);
- Cromatógrafo a líquido Alliance Separations modelo 2695 Waters (Milford, MA, USA) equipado com amostrador automático, bomba quaternária, sistema de desgaseificação, Detector MS, Micromass[®] Quatro Micro[™] API Waters, com fonte API, utilizando o modo de ionização química à pressão atmosférica (APCI), sistema de aquisição de dados através do software Masslynx 4.0 Waters e coluna analítica XTerra[®] MS C18 3,5 µm 144 Å (50 × 3 mm d.i.) (Waters, Milford, MA, USA);
- Sistema gerador de nitrogênio Peak Scientifics (Instruments, Escócia).

4.3 Reagentes, solventes, sorventes e materiais

- Água ultrapura, purificada em sistema Direct-Q UV3[®] Millipore (resistividade 18,2 MΩ cm);
- Metanol e acetonitrila, grau HPLC (J.T Baker, Mallinckrodt, NJ, USA);
- Gás argônio analítico 5.0 usado como gás de colisão no sistema LC-APCI-MS/MS (White Martins, Brasil);
- Gás Nitrogênio 99,99% de pureza (White Martins, Brasil);
- Cartuchos para SPE Strata[®] X, Strata[™] SDB-L(Phenomenex, EUA), AccuBond II ODS-C18 (agilent technologies, EU), Chromabond C18 eC (Macherey-Nagel, Alemanha);
- Detergente Extran[®] neutro (Merck, Brasil);

- Membrana filtrante de nylon 0,45 μm de diâmetro de poro e 47 mm de diâmetro (Millipore, SP, Brasil) utilizadas para filtração da fase móvel;
- Membrana filtrante de acetato de celulose 0,45 μm de diâmetro de poro, Sartorius (Biolab products, Goettingen, Alemanha) utilizadas para filtração das amostras de águas;
- Frascos de vidro âmbar, capacidade de 10 e 50 mL;
- Frascos de vidro (*via*), capacidade de 2,0 mL;
- Vidraria comum de rotina (balões volumétricos, pipetas volumétricas, béquer, etc...).
- Ácido fórmico p.a. 98 - 100% (Merck, Brasil);

4.4 Preparo das soluções analíticas

As soluções analíticas estoque, contendo 1000 mg L⁻¹ de cada fármaco (diclofenaco, atenolol, fluoxetina, sulfametoxazol e cafeína) foram preparadas em metanol grau HPLC, efetuando-se o cálculo para determinar a quantidade de cada padrão sólido puro a ser pesado considerando o grau de pureza. As soluções analíticas estoques foram preparadas em balão volumétrico calibrado, logo após foram condicionadas em frascos âmbar (tampa contendo batoque de PTFE) e armazenadas a temperatura de -18 °C em freezer.

A partir das soluções estoque foram preparadas soluções trabalho de concentrações de 100 e 10 mg L⁻¹ de cada composto em metanol.

Foi preparada uma solução trabalho na concentração de 10 mg L⁻¹, contendo a mistura dos seguintes compostos (diclofenaco, atenolol, fluoxetina, sulfametoxazol e cafeína). Diluições desta solução trabalho, preparadas diariamente, foram utilizadas para a otimização e validação do método por LC-APCI-MS/MS.

4.5 Otimização do sistema SPE para pré-concentração das amostras

O sistema *manifold* é composto por uma caixa de vácuo com espaço para trabalhar, simultaneamente, com 12 cartuchos para SPE (Figura 6). Esse sistema é conveniente quando é necessário pré-concentrar um número considerável de amostras. As amostras, colocadas em balões volumétricos de 250 mL foram transferidas para cartuchos de SPE contendo 500 mg de fase estacionária, acomodados em tubos do tipo seringa com capacidade de 3 mL, com tamanho médio das partículas de 33 μm , através de tubulações de politetrafluoretileno (PTFE). A transferência ocorreu a uma vazão de 3 mL min^{-1} por sucção em função do vácuo aplicado ao sistema, controlado para cada cartucho através de válvulas.

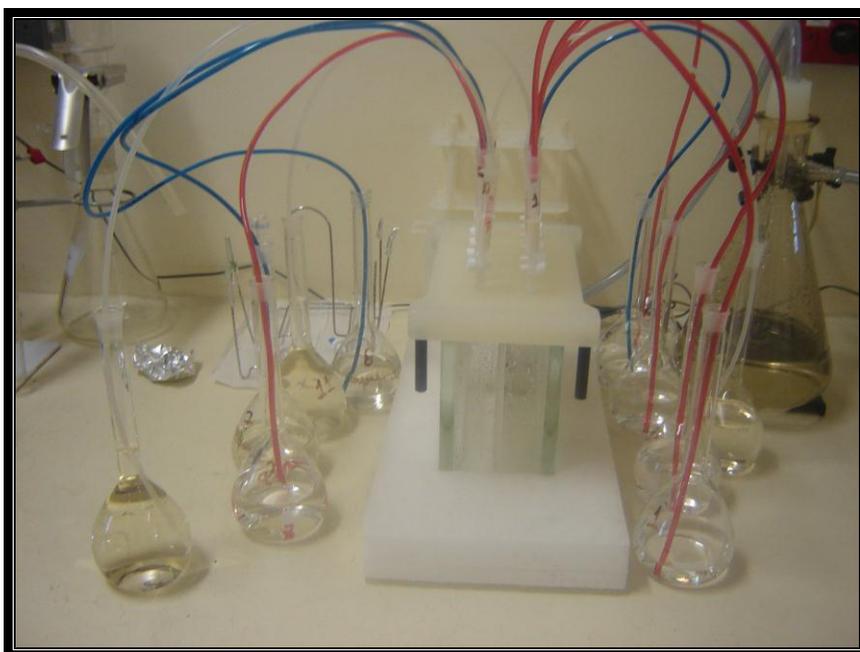


Figura 6 - Sistema SPE para a pré-concentração das amostras.

4.5.1 Procedimento SPE para a extração e pré-concentração dos compostos

As amostras após serem coletadas na estação de tratamento de águas nos meses de outubro, novembro e dezembro foram filtradas em membrana 0,45 μm de acetato de celulose. A seguir dividiu-se cada amostra de 1 L em 3 volumes de 250 mL, para serem permeadas através dos cartuchos em uma vazão de 3 mL min^{-1} até a secagem total, o sorvente polimérico Strata-X com 500 mg do sorvente, tamanho médio das partículas de 33 μm , tamanho médio dos poros de 85 Å foram

previamente condicionados com 6 mL de metanol e 6 mL de água ultrapura. A etapa posterior foi a eluição dos analitos com 4 mL de metanol e determinação por LC-APCI-MS/MS.

4.5.2 Escolha do adsorvente empregado

Os cartuchos SPE são comercializados em diferentes volumes. Estes cartuchos são empacotados com diferentes tipos e quantidades de adsorventes. Na escolha do sorvente deve-se levar em conta as informações a respeito dos analitos de interesse, a natureza da matriz e das impurezas a serem eliminadas, o volume de amostra a ser extraída e a massa do composto de interesse presente na amostra.

A pré-concentração dos analitos foi avaliada em 4 diferentes adsorventes sendo eles:

- ❖ AccuBond II ODS-C18, contendo 500 mg do sorvente, tamanho médio das partículas de 48 μm e tamanho médio dos poros de 60 \AA , em tubos de 3 mL,
- ❖ Chromabond C18 eC, contendo 500 mg do sorvente, tamanho médio das partículas de 45 μm e tamanho médio dos poros de 60 \AA , em tubos de 3 mL,
- ❖ StrataTM SDB-L, contendo 500 mg do sorvente, tamanho médio das partículas de 100 μm , tamanho médio dos poros 260 \AA , em tubos de 3 mL,
- ❖ Strata-X, contendo 500 mg do sorvente, tamanho médio das partículas de 33 μm , tamanho médios dos poros 85 \AA , em tubos de 3 mL.

4.5.3 Volume da amostra

Na extração outro fator muito importante é o volume de amostra, devido ao fato de que volumes maiores de amostra numa determinada massa de adsorvente pode saturar os sítios ativos do cartucho ou os analitos podem não ser retidos pelo adsorvente. Uma das formas de escolher o volume de amostra é através do volume

de “breakthrough”. Este é definido como sendo o volume máximo de amostra que pode ser percolado por um tubo de extração sem que ocorram perdas do analito de interesse.

Os volumes de amostras usados na pré-concentração foram escolhidos baseados na revisão da literatura e também dando importância à quantidade de adsorvente contida no cartucho.

4.5.4 Escolha do solvente de condicionamento

A escolha dos solventes de condicionamento foi definida na revisão da literatura e também dando importância às propriedades dos analitos em estudo sendo o solvente escolhido 6 mL de água ultra-pura e 6 mL de metanol (Gros et al, 2007)

4.5.5 Escolha do solvente e do volume de eluição dos analitos

Para a eluição dos analitos foram testados diferentes solventes orgânicos: acetonitrila, acetona e metanol, com um volume de 4 mL.

Depois da escolha do solvente testaram-se diferentes volumes de metanol variando de 1, 2, 4, 6 e 8 mL.

4.5.6 Amostragem e conservação

As amostras de água utilizada para os ensaios de recuperações no sistema SPE, foram coletadas diariamente da torneira do laboratório (LACOM-FURG). Após a etapa de validação do método o procedimento foi aplicado nas amostras reais de águas (superficial e de abastecimento) durante os meses de outubro, novembro e dezembro de 2010.

Área de estudo: As amostragens foram realizadas na Estação de Tratamento de Água da CORSAN no município de Rio Grande, durante três meses (outubro,

novembro e dezembro) (Figura 7). Coletou-se duas amostras distintas, uma de superfície, direto no canal de entrada da água para o tratamento, oriunda do Canal São Gonçalo; e a outra após a etapa de tratamento da água, na saída para o abastecimento à comunidade, como mostrado na Figura 8.

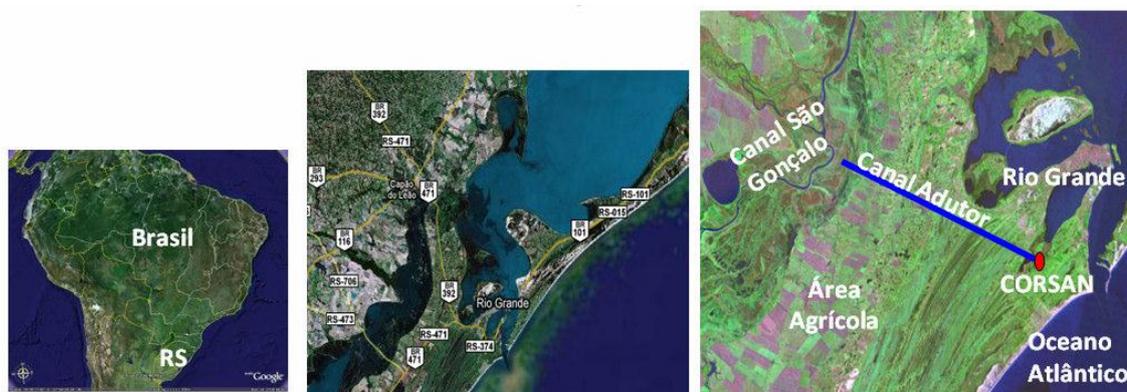


Figura 7 - Localização da região de estudo (Demoliner, 2008).



(1)

(2)

(3)

Figura 8 - Locais de amostragem (1) coleta da água de abastecimento público, (2) coleta da água de superfície e (3) entrada da água do Canal São Gonçalo na ETA

Procedimento experimental: Foi coletado 1 L de cada amostra de água (de superfície e de abastecimento público) em frascos de vidro âmbar, conforme a figura 9. Os frascos com as amostras foram acondicionados em caixas de isopor e transportadas para o LACOM.

Em seguida as amostras foram filtradas em membranas de acetato de celulose (0,45 μm de diâmetro de poro). As alíquotas filtradas de cada amostra foram

submetidas ao procedimento de SPE, para a extração dos analitos. Os extratos foram mantidos nos cartuchos, envoltos em papel alumínio, no freezer a -18 °C até posterior determinações.



Figura 9 - Frascos âmbar e sistema de filtração das amostras

4.6 Validação do método

O método desenvolvido por LC-APCI-MS/MS foi validado empregando figuras analíticas de mérito como: limite de detecção, limite de quantificação, curva analítica, linearidade, exatidão (recuperação) e precisão (repetitividade e precisão intermediária), parâmetros sugeridos para validação de métodos analíticos pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial – INMETRO (INMETRO, 2010). Também foi avaliado o efeito matriz, como sugerido pelo guia de validação para análise de resíduos de pesticidas em alimentos da Comissão Européia (SANCO, 2009).

4.6.1 Curva analítica e linearidade

A linearidade do instrumento foi avaliada pela construção das curvas analíticas de 0,001 a 1 mg L⁻¹ da mistura dos analitos no solvente contendo 7 pontos. Todas as soluções foram preparadas em metanol e cada solução injetada em triplicata.

De acordo com as características de cada composto e suas formas de ionização, as curvas analíticas responderam em diferentes faixas de concentração. Por isso,

para construção das curvas analíticas foi preparada uma mistura da solução padrão contendo os cinco analitos a partir do LOQ de cada composto conforme visto a seguir:

- 50; 125; 250; 375; 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ para cafeína e sulfametoxazol;
- 10; 25; 50; 75; 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ para atenolol e fluoxetina;
- 100; 250; 500; 750; 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o diclofenaco.

Essas curvas citadas acima foram feitas para avaliar a linearidade do método e as soluções analíticas foram preparadas através de diluições da solução padrão trabalho com extrato branco da matriz, extraído por SPE e as mesmas curvas foram feitas com diluições da solução padrão trabalho com metanol.

Cada solução foi injetada três vezes e os dados de regressão linear foram obtidos com auxílio do “software” (Masslynx 4.0 Waters) do equipamento. A partir destes dados foi avaliado o coeficiente de correlação linear (r), obtendo assim a linearidade do instrumento e do método.

4.6.2 Limites de detecção e quantificação

O LOD do instrumento (LOD_i) e o LOQ do instrumento (LOQ_i) para cada composto foi estimado a partir da relação sinal/ruído pelo método visual, considerando no mínimo 3 e 10 vezes a razão do sinal pela linha de base (ruído), respectivamente. Os limites instrumentais foram obtidos através de padronização externa no solvente, pelo preparo de soluções analíticas de diferentes concentrações em metanol.

Os limites de detecção (LOD_m) e quantificação (LOQ_m) do método empregando SPE foram obtidos pela divisão do fator de pré-concentração do método que é 62,5 pelo limite de quantificação instrumental. O mesmo ocorreu com limite de detecção. Os limites do método na prática foram observados quando o extrato branco da matriz foi fortificado no nível do limite de quantificação de cada composto e as recuperações obtidas foram superiores a 70%

4.6.3 Recuperação (Exatidão)

A exatidão é calculada como a porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra. A recuperação pode ser estimada pela

análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do analito, em pelo menos três níveis: baixo, médio e alto (ANVISA, 2003; INMETRO, 2010).

Portanto, para a quantificação dos compostos foi utilizada a área do padrão diluído com o extrato branco da matriz. Os cálculos foram feitos de acordo com a equação 2, onde é expressa em porcentagem de recuperação.

$$R(\%) = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

C_1 = concentração determinada após a fortificação

C_2 = concentração determinada na amostra não fortificada (branco)

C_3 = concentração esperada para o nível de fortificação

As amostras foram fortificadas com adição de pequenos volumes de uma solução trabalho contendo a mistura dos fármacos em estudo em um volume de 1 L de amostra para cada nível de fortificação, sendo separadas 3 frações de 250 mL para pré-concentrar por SPE a fim de obter os seguintes níveis de fortificação 1,6; 8; 16 $\mu\text{g L}^{-1}$. Cada nível fortificado foi injetado no sistema cromatográfico em triplicata.

4.6.4 Precisão

A precisão é geralmente expressa em termos de repetitividade e precisão intermediária, através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD).

A repetitividade do instrumento, expressa em termos de desvio padrão relativo (RSD%), foi estudada efetuando-se 3 injeções das concentrações (1,6; 8; 16 $\mu\text{g L}^{-1}$) das soluções analíticas no sistema LC-APCI-MS/MS. A repetitividade do método analítico foi avaliada através da extração por SPE e determinação no LC-APCI-MS/MS dos analitos. Cada um dos 3 níveis de fortificação foi extraído 3 vezes, e cada um dos extratos foi injetado 3 vezes. A precisão intermediária foi avaliada com nove determinações, assim como a repetibilidade, mas, em diferentes dias.

O valor numérico para avaliar a precisão, RSD%, foi calculado através da equação 2.

$$RSD (\%) = \frac{s}{X_m} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

s = estimativa do desvio padrão absoluto;

X_m = média de uma série de medidas (replicatas).

4.6.5 Efeito de Matriz

A ocorrência de efeito de matriz deve ser avaliada na validação do método. Para isto, a calibração deve ser realizada através de curvas no extrato da matriz, rotineiramente (SANCO, 2009).

Para avaliar o efeito matriz sobre os compostos estudados foi injetado no sistema cromatográfico uma curva analítica da mistura dos compostos em metanol, e outra curva analítica preparado no extrato da matriz (extraído por SPE). O cálculo do efeito matriz (%EM) foi realizado segundo Preste, (2008) e é apresentado na Equação 3.

$$EfeitoMatr \quad iz \% = \frac{slope (X 1) - slope (X 2)}{slope (X 2)} \times 100 \quad (3)$$

onde:

X1= inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada fármaco, preparadas no extrato obtido na SPE (matriz);

X2= inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada fármaco, preparadas em metanol (solvente);

Quando os valores encontrados para o efeito matriz estiverem entre -20 e +20%, considera-se que o efeito matriz é baixo; se estiverem entre -50 e -20% ou entre +20 e +50% é considerado médio; e se os valores encontrados forem abaixo de -50% ou acima de +50%, o efeito matriz é considerado alto (ECONOMOU, 2009).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Condições cromatográficas otimização no LC-APCI-MS/MS para determinação dos analitos

Para a otimização da separação cromatográfica dos compostos, foi preparada uma mistura da solução padrão dos analitos. Foi injetada a solução contendo a mistura dos compostos na concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$, a fim de observar o tempo de retenção de cada analito. Os melhores resultados para obtenção da separação para os analitos estão apresentados na Tabela 3, onde todos os analito eluíram em tempo de retenção menor que 6 minutos.

Tabela 3 : Condições empregadas no sistema cromatográfico

Parâmetros	LC-APCI-MS/MS
Coluna analítica	XTerra® MS C18 (50 x 3 mm, 3,5 μm)
Fase móvel	Metanol:Água 0,1% ácido fórmico (70:30, v/v)
Vazão	0,2 mL min^{-1}
Detector	MS/MS
Volume de injeção	2 μL

5.2 Separação cromatográfica e acidez da fase móvel

Definida a melhor proporção de fase móvel MEOH:H₂O (70:30, v/v) no modo de eluição isocrático não se obteve uma separação cromatografia adequada, porém, esta separação inadequada não alterou a sensibilidade, já que se trata de um espectrômetro de massas que separa os íons gerados através da sua relação massa/carga (m/z). Conforme Demoliner, 2008 o detector de massas em tandem

operando no modo MRM é altamente seletivo para os analitos da mistura. Na Figura 10 é apresentado o cromatograma obtido no modo de ionização positivo.

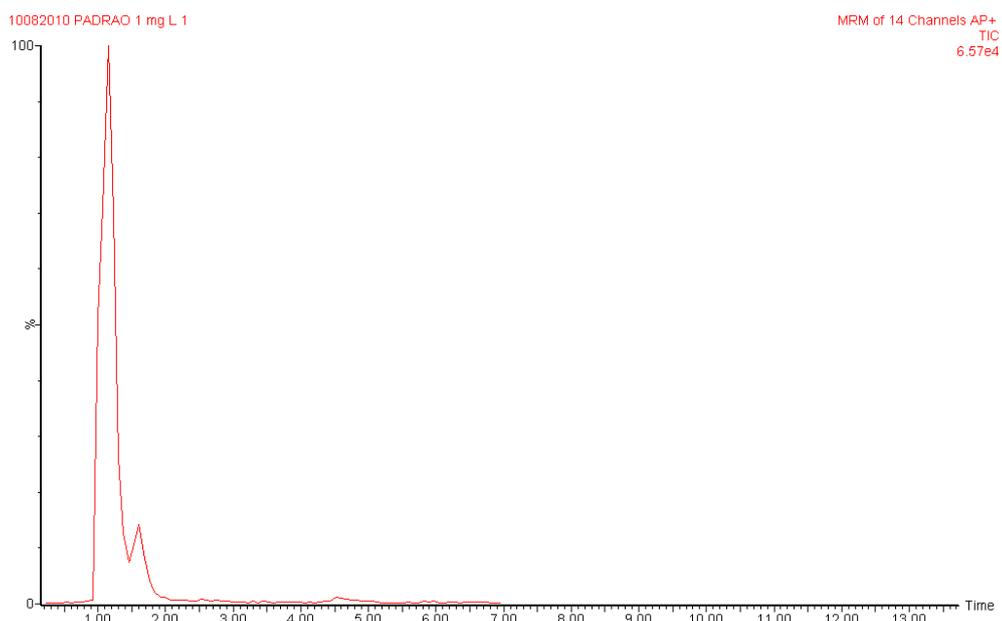


Figura 10 - Cromatograma obtido em LC-APCI-MS para os compostos em estudo. Cromatograma no modo positivo.

Metanol e água foram escolhidos como fases móveis para separação dos fármacos. Conforme Kasprzyk-Hordern, 2008 em geral esses compostos são fracamente retidos em cromatografia de fase reversa no qual a fase estacionária é apolar e fase móvel polar. Os valores de log Kow são baixos para maioria dos compostos exceto para o diclofenaco que foi o composto que obteve uma maior retenção na coluna analítica uma vez que tem maior Log Kow. Para os demais compostos houve pouca interação com a coluna cromatográfica. Como pode ser observado na Figura 10.

A acidificação da fase móvel é necessária para determinação dos compostos que possuem baixos valores de log Kow. O pH menor proporciona maior interação entre esses compostos e a fase estacionária que é mais apolar, aumentando a retenção do composto. Além disso, a acidificação da fase móvel também influencia na eficiência da ionização dos analitos (RODRIGUES, 2010).

Kasprzyk-Hordern, 2008 relata em seu estudo que aditivos não voláteis (por exemplo, tetraalquilamônio ou tampão fosfato), geralmente fornecem melhor retenção e posterior separação para fármacos, mas devido a uma possível deposição e contaminação da fonte APCI o uso de sais não-voláteis não é recomendados. Por exemplo, o ácido trifluoroacético por ser um ácido carboxílico

forte, pela influência dos três átomos de flúor, pode formar pares iônicos fortes com analitos que não podem ser fragmentados e como resultado eles impedem a ionização dos analitos.

Então neste trabalho foram testados ácido fórmico e acético, devido ao fato de todos os analitos serem analisados no modo de ionização positivo e o ácido fórmico ajudar na ionização no modo positivo, este foi escolhido. Isto se deve ao fato de o ácido fórmico ter um pKa menor que do ácido acético sendo um ácido mais forte e mais facilmente dissocia e libera H⁺.

5.3 Otimização dos parâmetros para fragmentação dos compostos no MS

A fonte de ionização à pressão atmosférica (API) foi empregada com interface Ionização Química a Pressão Atmosférica (APCI), devido ao fato da indisponibilidade da fonte ESI em nosso laboratório. APCI é mais indicada e normalmente mais aplicada para moléculas mediantemente polares ou pouco polares, permitindo uso de altas taxas de vazão de solvente quando comparada com ESI (SOUZA, 2008).

Na APCI os analitos neutros são transferidos na fase gasosa pela vaporização do líquido em uma corrente de gás aquecido e a ionização ocorre através da ionização química do analito em fase gasosa (Gosetti *et al*, 2010).

As melhores condições para a fragmentação dos íons monitorados foram: corrente da corona: 0,5 µA; voltagem do cone: 30 V; vazão do gás de nebulização: 350 L h⁻¹; vazão do gás do cone: 150 L h⁻¹; temperatura da fonte: 120 °C e temperatura de dessolvatação: 350 °C.

Todos os compostos apresentaram sensibilidade para ionização e fragmentação pelo modo positivo, a molécula do composto é ionizada através da adição de um próton de hidrogênio, dando origem ao íon molecular [M + H]⁺ e em alguns casos, pela adição de sódio [M + 23]⁺ ou de um íon amônio [M + 18]⁺. A adição de um próton ou de um íon amônio é resultado da fase móvel, e a adição de sódio é resultado de sódio na fase móvel, no padrão ou na amostra que está sendo analisada. A fragmentação de íons negativos é menos comum do que a fragmentação de íons positivos, pois há menor possibilidade de remover um próton do que de adição um próton (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005; DEMOLINER, 2008).

A Tabela 4 demonstra as transições monitoradas no modo APCI (+) modo de aquisição MRM (Monitoramento de Reações Múltiplas), energia de colisão, voltagem do cone e tempo de retenção dos compostos estudados.

Tabela 4 - Resultado da otimização das condições de fragmentação para determinação dos fármacos no espectrômetro de massas

Fármacos	MRM transição (m/z)		Energia de colisão (eV)	Voltagem do cone (V)	t _R (min)
Cafeína	195, 1> 110,0	Quantificação	60	25	1,57
	195,1>136,0	Qualificação	60	25	
Sulfametoxazol	254,4>107,9	Quantificação	15	15	1,49
	254,4>91,7	Qualificação	15	15	
Atenolol	267,3>145,0	Quantificação	27	35	1,00
	267,3>190,2	Qualificação	25	25	
Diclofenaco	297,1>214,1	Quantificação	30	30	4,98
	297,1>250,1	Qualificação	15	30	
Fluoxetina	310,2>43,4	Quantificação	9,0	30	1,14
	310,2>145,1	Qualificação	10	20	

Para cada composto foram selecionados dois fragmentos característicos, como apresentado na Tabela 4, vantagem fornecida por um analisador de massas em série, tandem, LC-APCI-MS/MS. O fragmento mais intenso (mais estável) foi escolhido para quantificação do composto e o segundo fragmento mais intenso para confirmação do mesmo. A Figura 11 ilustra os cromatogramas no modo MRM para a

transição escolhida para a quantificação de cada composto no sistema LC-APCI-MS/MS.

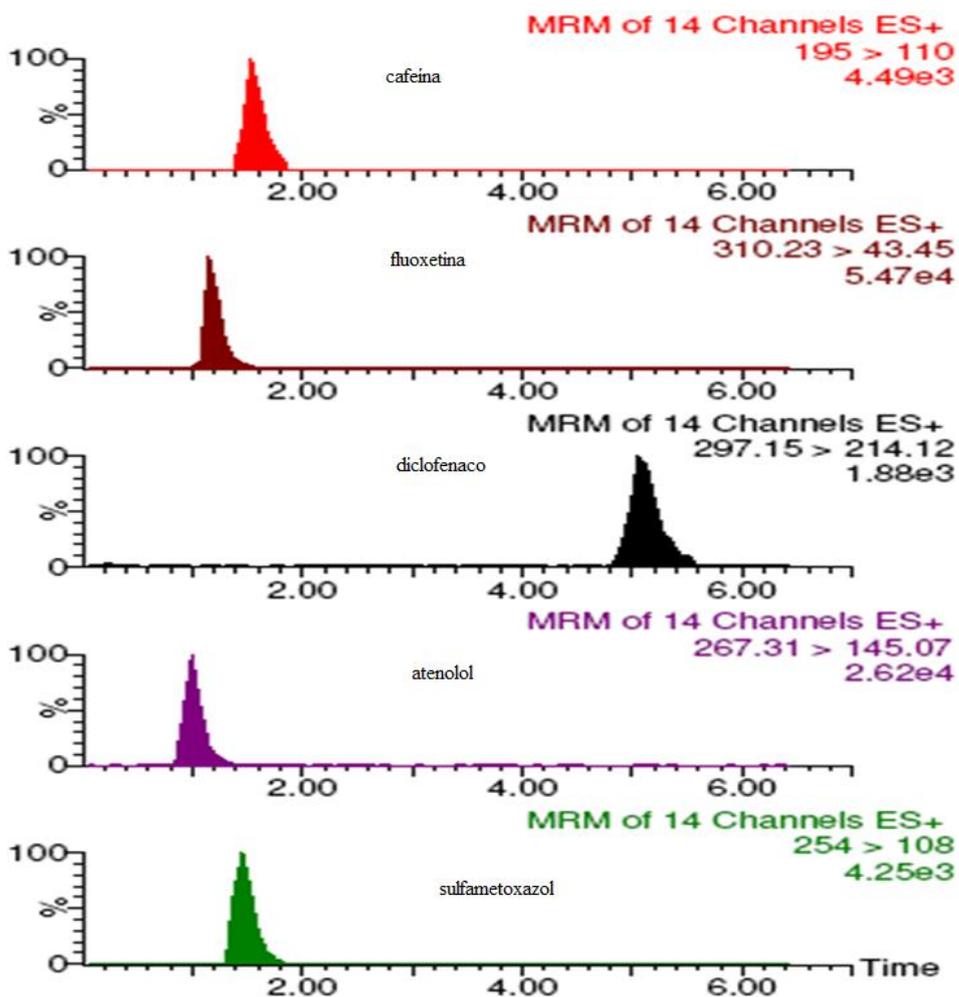


Figura 11 - Cromatogramas no modo MRM da fragmentação monitorada para a quantificação.

5.4 Estudo da extração em fase sólida dos fármacos

5.4.1 Escolha do sorvente

A seleção de um sorvente adequado para pré-concentração é uma condição necessária para o sucesso no preparo da amostra. Dentre os cinco fármacos

encontram-se espécies químicas diferentes (ácidos, bases e moléculas neutras) e com polaridades bastante diferentes. (GRUJIĆ *et al*, 2010).

Para medir a eficiência de extração dos fármacos foram utilizados quatro tipos de sorventes: AccuBond II ODS-C18, Chromabond C18 eC, Strata™ SDB-L e Strata-X. Metanol foi utilizado como solvente de eluição com um volume de eluição de 4 mL. Como pode ser observado na figura 12 o sorvente Strata-X apresentou uma maior recuperação para todos os compostos, sendo escolhido como sorvente para os próximos testes.

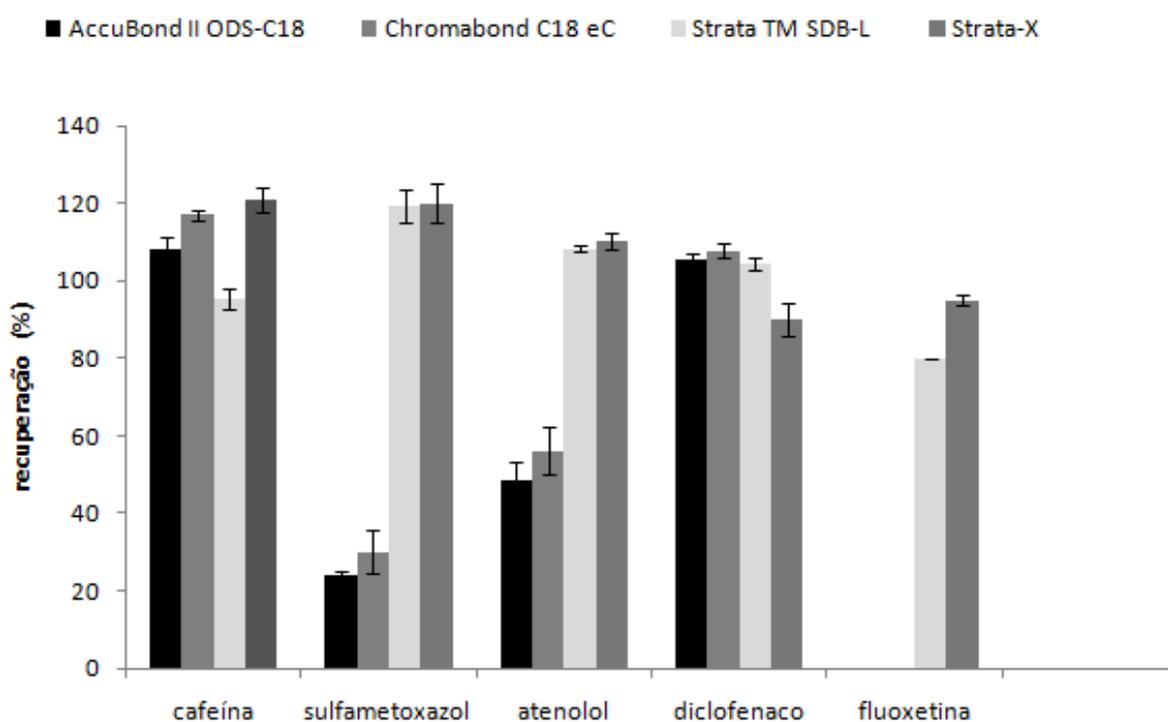


Figura 12 - Recuperações obtidas comparando diferentes sorventes. Barras de erros representam valores de RSD(%).

Foi testado o desempenho de dois sorventes apolares de diferentes marcas comerciais (C18) e dois sorventes poliméricos. Os sorventes poliméricos são recomendados para substâncias de média à alta polaridade, quando podem apresentar recuperação maior que sorventes de sílica alquilada de fase reversa ou extração líquido-líquido. Assim para extração de analitos de alta polaridade, sorventes poliméricos freqüentemente são superiores a sorventes de sílica alquilada (C18) [SUCHARA, 2007]. Tanto o cartucho Strata-X quanto Strata™ SDB-L, ambos com sorvente polimérico proporcionaram recuperações entre (70 – 120%). Mas o

Strata-X proporcionou maiores recuperações sendo este o sorvente escolhido. Trabalhos realizados por Hilton e colaboradores, 2003 e Mutavdžić e colaboradores, 2010 comparam o sorvente Strata-X e Strata™ SDB-L com outros sorventes comerciais entre eles C18 e C8 para retenção de fármacos em amostras de água. Nesses estudos o sorvente Strata-X foi selecionado obtendo recuperações superiores a 80% para os fármacos investigados.

O cartucho Strata-X com sorvente polimérico tem uma superfície modificada com estireno e com um grupo pirrolidona, cujos mecanismos são retenção hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e aromáticos. Este sorvente é utilizado para extração de fase reversa de compostos ácidos, básicos, e neutros. Em vários artigos, o cartucho Strata-X com sorvente polimérico tem sido comparado com outros sorventes disponíveis no mercado para a retenção de compostos polares e não polares em amostras de água, e é indicado como melhor sorvente para extração em fase sólida de analitos com diferentes propriedades físico-químicas (BABIĆ *et al*, 2010).

Os sorventes apolares (C18) tiveram o mesmo comportamento para todos os compostos, com exceção a fluoxetina a qual não apresentou recuperações quantitativas. Os compostos cafeína e diclofenaco que tiveram recuperações superiores a 70%, no caso do composto diclofenaco se deve ao fato de ele ser um composto apolar devido ao seu alto Log Kow. Togola e colaboradores, 2007 determinaram fármacos dentre eles a cafeína em água por SPE e utilizaram um adsorvente C18 e um polimérico, com o sorvente C18 obtiveram uma recuperação maior que 70%, e com o polimérico menor que 60%.

5.4.2 Escolha do solvente de eluição

A escolha do solvente de eluição é um parâmetro importante e está diretamente relacionada com a polaridade do analito e o sorvente usado na SPE. Assim foram avaliados os solventes: acetonitrila, acetona e metanol utilizando 4 mL de cada solvente a extração com sorvente Strata-X.

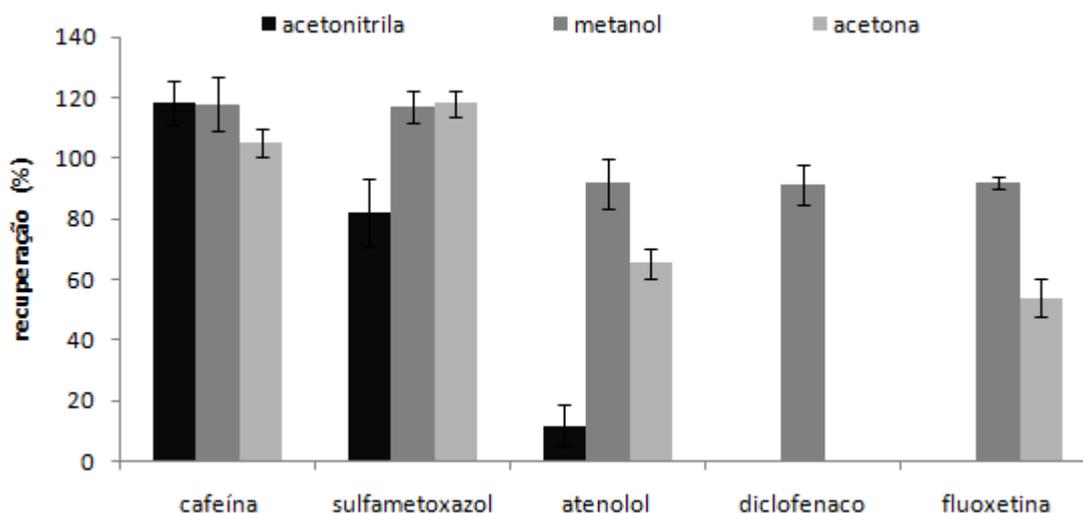


Figura 13 - recuperações obtidas comparando diferentes solventes de eluição. Barras de erros representam valores de RSD(%).

De acordo com a Figura 13, foi observado uma maior eficiência na extração quando utilizado o solvente metanol, isto se deve ao fato de o metanol ser o solvente mais polar. Então foi escolhido para eluição quando se avalia o processo SPE. Entre os solventes mais utilizados para a eluição de fármacos estão o acetato de etila, metanol e o acetato de etila:acetona (50:50) [SUCHARA, 2007].

Segundo Gracia-Lor e colaboradores, 2010 o metanol parece ser o solvente mais eficiente para a eluição de contaminantes polares a partir de diferentes cartuchos de SPE, no seu trabalho também foi escolhido como solvente de eluição.

5.4.3 Volume do solvente de eluição

Para a avaliação do volume do solvente de eluição do analito foram avaliados 5 volumes de solvente: 1, 2, 4, 6 e 8 mL, utilizando o condicionamento do adsorvente Strata-X com 6 mL de metanol e 6 mL de água ultrapura e a introdução de 250 mL de amostra e eluição com metanol.

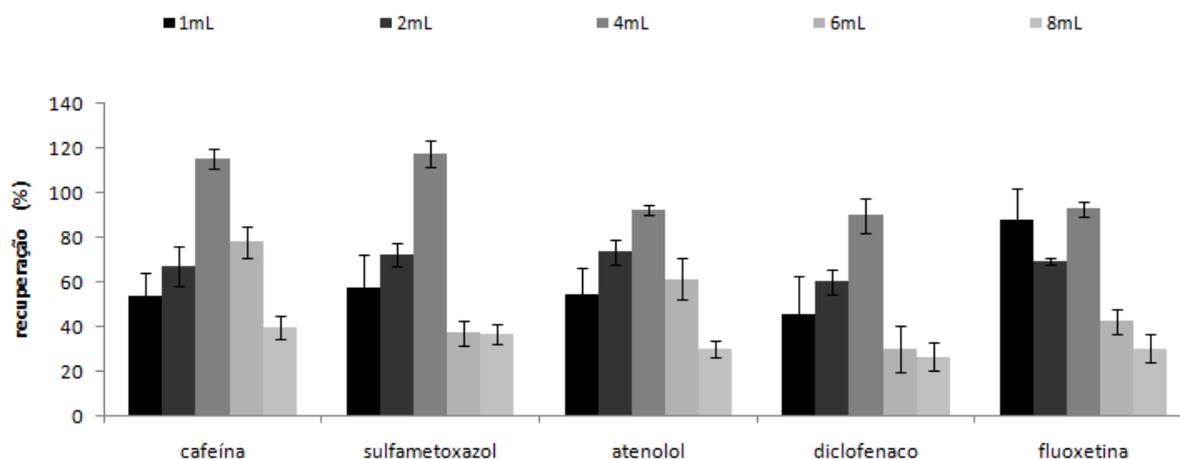


Figura 14 - Recuperações obtidas comparando diferentes volumes de solvente de eluição. Barras de erros representam valores de RSD(%).

É observado na Figura 14 que o volume de 4 mL apresentou uma melhor recuperação para todos os 5 fármacos estudados e este foi definido como o volume a ser utilizado.

5.4.4 Efeito de matriz empregando SPE e determinação por LC-APCI-MS/MS

Na técnica SPE e determinação por LC-APCI-MS/MS foi verificada a influência da matriz da água superficial e de abastecimento na determinação dos compostos.

O efeito de matriz do método desenvolvido por LC-APCI-MS/MS foi avaliado através da comparação das inclinações das curvas dos padrões no solvente e dos padrões no extrato da matriz.

Como pode ser observado na Figura 15, somente fluoxetina e atenolol apresentaram efeito de matriz negativo, ou seja, supressão de sinal. Os demais compostos obtiveram um efeito de matriz insignificante.

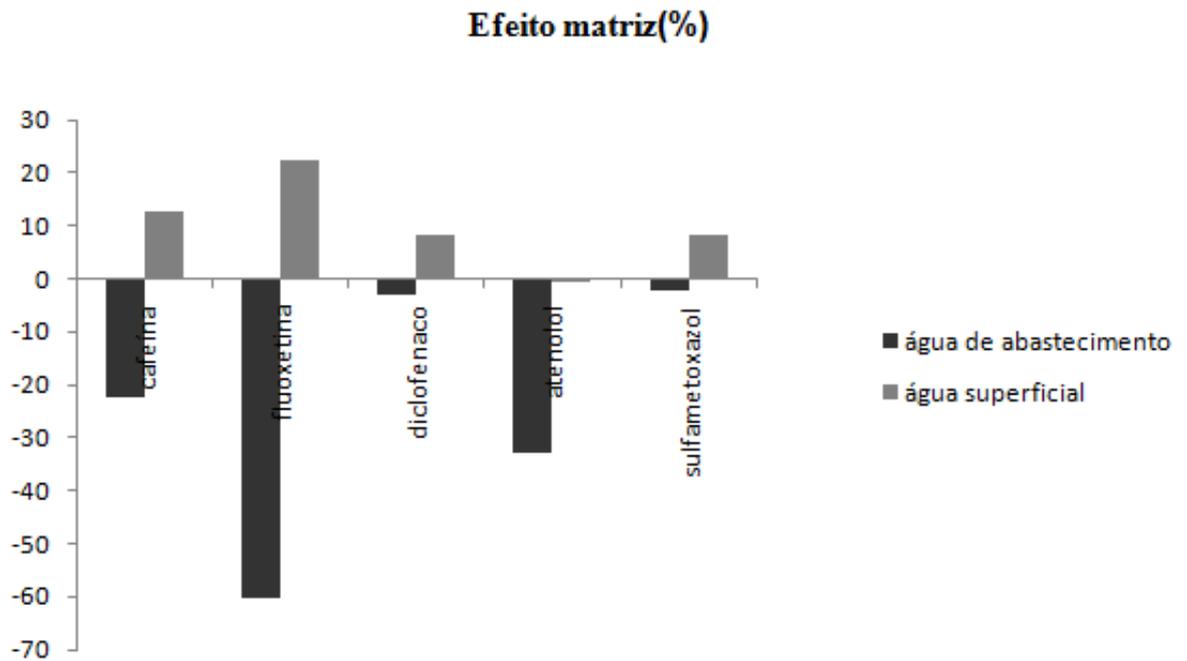


Figura 15 - Percentual de efeito matriz (EM) para a técnica empregando SPE e LC-APCI-MS/ MS para determinação de fármacos em água.

De acordo com Economou et al, 2009 o composto que teve um forte efeito de matriz foi a fluoxetina com a supressão de -60%, enquanto o atenolol obteve um efeito de matriz considerado médio.

5.5 Validação do método

5.5.1 Curva analítica e linearidade

Os resultados obtidos para linearidade através da calibração externa e superposição na matriz indicaram boa linearidade em toda a faixa estudada e a Tabela 5 apresenta os parâmetros cromatográficos obtidos do instrumento e do método.

Tabela 5 - Resultados obtidos para calibração dos fármacos, empregando SPE no sistema LC-APCI-MS/MS

Fármaco	Curva analítica no solvente (metanol)	Curva analítica no extrato (água de abastecimento)	Curva analítica no extrato (água de superfície)
	r	r	r
cafeína	$y = 1,3 \times 10^6 x - 2,4 \times 10^3$ 0,999	$y = 1,0 \times 10^6 x + 6,1 \times 10^4$ 0,998	$y = 1,4 \times 10^6 x + 6,2 \times 10^4$ 0,990
fluoxetina	$y = 5,1 \times 10^7 x - 4,8 \times 10^5$ 0,995	$y = 2,0 \times 10^7 x - 3,6 \times 10^4$ 0,997	$y = 2,2 \times 10^7 x - 5,0 \times 10^4$ 0,995
diclofenaco	$y = 3,3 \times 10^5 x + 1,6 \times 10^4$ 0,999	$y = 3,2 \times 10^5 x + 1,9 \times 10^4$ 0,998	$y = 3,6 \times 10^5 x + 1,2 \times 10^4$ 0,999
atenolol	$y = 3,3 \times 10^7 x - 9,1 \times 10^4$ 0,998	$y = 2,2 \times 10^7 x + 1,9 \times 10^4$ 0,996	$y = 3,2 \times 10^7 x - 1,0 \times 10^5$ 0,996
sulfametoxazol	$y = 6,4 \times 10^5 x + 2,1 \times 10^4$ 0,997	$y = 6,3 \times 10^5 x + 4,5 \times 10^4$ 0,992	$y = 8,6 \times 10^5 x + 6,2 \times 10^4$ 0,999

Através dos dados obtidos para a construção das curvas analíticas, e análise das equações das retas para as curvas, é possível concluir que o modelo de regressão linear é adequado para as determinações analíticas em estudo. Os coeficientes de correlação (r) foram maiores que 0,99, estando de acordo com as orientações da ANVISA e do INMETRO que recomendam r igual a 0,99 e acima de 0,90, respectivamente.

5.5.2 Limites de detecção e limites de quantificação

Não existe até o momento, nem na legislação Europeia e nem na legislação brasileira limites máximos de resíduos de fármacos para amostras de água. No trabalho de Nebot e colaboradores, 2007 eles obtiveram os seguintes limites de detecção para os fármacos diclofenaco e sulfametoxazol: 0,81 e 0,86 $\mu\text{g L}^{-1}$, como se pode observado na Tabela 6, os LOQs deste trabalho ficaram entre 0,16 a 1,6. Em outro trabalho Babić e colaboradores, 2010 obteve um LOQm para sulfametoxazol de 0,005 $\mu\text{g L}^{-1}$, todos esses autores trabalharam no modo de ionização por electrospray (ESI) sendo este o mais indicado para compostos polares pelo fato de serem ionizados mais facilmente na fase móvel. Neste trabalho se utilizou a fonte de

ionização Ionização Química a Pressão Atmosférica (APCI) indicada para compostos mediamente polares e apolares.

Tabela 6 - Resultados de LOD e LOQ, do instrumento e do método, para os fármacos estudados

Fármacos	Instrumental ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Método ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ
cafeína	17,0	50	0,33	0,8
fluoxetina	3,33	10	0,053	0,16
diclofenaco	33,33	100	0,53	1,6
atenolol	3,33	10	0,053	0,16
sulfametoxazol	17,0	50	0,33	0,8

5.5.3 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada em termos de recuperação. Para isto, foram realizados ensaios de recuperação em três níveis de fortificação dos analitos. O processo de extração foi realizado empregando a técnica SPE. As recuperações foram calculadas a partir das concentrações adicionadas antes da extração e as quantificadas utilizando a curva no solvente.

A Tabela 7 mostra a eficiência da recuperação que foi avaliada em amostras de água de torneira, em três níveis de fortificação, em triplicata, para os cinco fármacos estudados

Foram obtidas recuperações entre 70 e 120% com precisão de até $\pm 20\%$ para todos os compostos em todos os níveis de fortificações. Estes resultados estão de acordo com as recomendações do processo de validação de métodos cromatográficos para o estudo das recuperações (RIBANI *et al.*, 2004; SANCO, 2009). Todos os valores obtidos apresentam-se dentro desse intervalo e, portanto, método está de acordo com os parâmetros exigidos.

5.5.4 Precisão

A repetitividade (RSD_r) e a precisão intermediária (RSD_{PI}) para instrumento ($n=3$), foram avaliadas com os mesmo níveis de concentração das curvas analíticas dos fármacos. Os valores de $RSD\%$ das áreas de todas as injeções foram: 2,5% para cafeína; 4,5 % para fluoxetina; 1,1% para atenolol; 9,5% para sulfametoxazol; 1,9% para diclofenaco. O teste de precisão intermediária foi realizado em dias diferentes, mas empregando a mesma metodologia da repetitividade.

A precisão do método empregando SPE foi avaliada em função da repetibilidade e da precisão intermediária, segundo a RIBANI *et al.*, 2004; SANCO, 2009, recomenda-se que a precisão deve apresentar $RSD \leq 20\%$. Os valores de $RSD\%$ para os estudos de repetibilidade e precisão intermediária ficaram na faixa de 0,32 – 13,8 % e 0,1 – 8,4% para o método empregando SPE. Os valores individuais de RSD_r e RSD_{pi} são apresentados juntamente aos resultados de recuperação, na Tabelas 7. Portanto observando a Tabela 7 todos os resultados estão dentro dos limites sugeridos.

Tabela 7 - Recuperação, RSD_r e RSD_{pi} do método empregando SPE e LC-APCI-MS/MS para os fármacos em amostras de água fortificadas em diferentes níveis

FÁRMACOS	Nível de fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)	RSD_r (%)	Recuperação (%)	RSD_{pi} (%)
cafeína	0,8	97	0,8	97,7	2,5
	4	110	3,7	100,0	7,1
	8	112	5,7	91,7	3,2
fluoxetina	0,16	105	6,4	99	1,1
	0,8	111,7	6,5	84,0	8,4
	1,6	120,4	4,6	76,1	6,9
diclofenaco	1,6	90,0	13,8	92,6	5,1
	8	85,0	1,2	97,6	0,3
	16	78,0	1,0	94,9	0,3
atenolol	0,16	98	0,5	88	7,4
	0,8	87	0,5	84	0,1
	1,6	90,5	1,9	98,3	2,7
sulfametoxazol	0,8	111,8	7,7	110,0	3,2
	4	110,1	8,2	117,5	0,8
	8	109,6	0,3	118,9	0,5

Resultados obtidos para n=9

5.5.5 Aplicabilidade

O método empregando SPE e LC-APCI-MS/MS, após ser validado, foi aplicado para determinação de resíduos dos fármacos atenolol, cafeína, diclofenaco, fluoxetina e sulfametoxazol. As amostras de água foram coletadas na Estação de Tratamento de água (CORSAN) e em nenhuma das amostras analisadas foi encontrado resíduo de fármacos.

Neste trabalho não foram encontrados resíduos de fármacos nos diferentes tipos de água, mas na revisão do item 4.3 vários trabalhos de diversas partes do mundo incluindo o Brasil têm detectado esses contaminantes.

6. CONCLUSÕES

A SPE provou ser uma excelente técnica para o preparo das amostras aquosas. É rápida, pois permite o preparo simultâneo de até 12 amostras e possibilita extração e pré-concentração dos fármacos ao mesmo tempo, tem baixo consumo de solvente e, conseqüentemente, gera poucos resíduos. Os cartuchos contendo adsorvente polimérico após a otimização de vários parâmetros como sorvente de extração, solvente de eluição e do volume de eluição forneceu informações importantes sobre o comportamento dos fármacos nas condições testadas e indicaram as melhores condições para cada parâmetro testado. Assim possibilitando a extração dos cinco fármacos com rapidez e eficiência, possibilitando um fator de pré-concentração de 62,5 vezes.

O método por LC-APCI-MS/MS demonstrou ser uma técnica ideal para a determinação dos compostos, pois foi satisfatória, permitindo a realização de uma análise qualitativa, obtida a partir de fragmentos de massa característicos de cada analito, e quantitativa, através do modo de aquisição MRM. As condições cromatográficas otimizadas para determinação por LC-APCI-MS/MS permitiram a identificação e quantificação dos compostos em estudo, em um tempo de análise menor que 6 min.

Os resultados obtidos na validação do método foram satisfatórios. Todos os fármacos em estudo apresentaram boa linearidade tanto instrumental quanto do método, com coeficientes de determinação maiores que 0,99. Os limites de quantificação do método variaram entre 0,16 a 1,6 $\mu\text{g L}^{-1}$, enquanto os limites de detecção a variação foi de 0,053 a 0,53 $\mu\text{g L}^{-1}$. As recuperações empregando SPE com cartuchos de 500 mg Strata-X, para todos os compostos estiveram entre 70 a 120%, apresentando boa precisão ($\text{RSD} \leq 20\%$) para todos os compostos.

Vale salientar que existe um pequeno número de trabalhos brasileiros que tem como finalidade a determinação de fármacos em matrizes ambientais. Com este trabalho espera-se ter chamado a atenção para estes compostos ainda pouco conhecidos e estudados como contaminantes no meio ambiente e que este possa ser um incentivo a novos pesquisadores.

Com a implementação e desenvolvimento de novas metodologias analíticas para análises de fármacos em água, cada vez mais seletivas e sensíveis, as legislações atuais, principalmente a Portaria nº 518 da legislação brasileira,

necessitam estabelecer limites máximos permitidos para esses contaminantes emergentes que muito pouco se sabe sobre os danos que podem causar aos seres humanos e a fauna e flora aquática.

7. TRATAMENTO DE RESÍDUOS GERADOS

Futuramente outra dissertação de mestrado realizará experimentos com solventes contidos nos cartuchos de SPE, para verificar a possível contaminação de agrotóxicos em pêssegos usando a técnica MSPD assim como os cartuchos e os filtros existentes nele.

Os solventes utilizados durante o estudo foram coletados, separados em frascos e rotulados. Estão sendo desenvolvidos e otimizados em nosso grupo por um aluno de mestrado Processos Oxidativos Avançados para uma possível degradação dos resíduos de fármacos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). "**Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**". *Resolução RE nº 899*, de 29/05/2003 - ANVISA. Brasília, 2009. Disponível em: www.anvisa.gov.br.

ANKLEY, G.T. et al. Research and resource investments made to understand and assess endocrine-active chemicals can help scientists to define the ecological risks of pharmaceuticals. **American Chemical Society & Technology**, v. 15, p. 8211-8217, 2007.

ARAUJO, P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. **Journal of Chromatography B**, v. 877, p. 2224–2234, 2009

ARIESE, F.; Ernst, W.H.O; Sijm, D.T.H.M.. Natural and synthetic organic compounds in the environment —a symposium. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 10, p. 65–80, 2001.

BABIĆ et al. Determination of multi-class pharmaceuticals in wastewater by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS–MS). **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v 398, p.1185–1194, 2010.

BAIRD, C. **Química Ambiental**. Porto Alegre: Bookman, 2. ed. 2002. p. 313-400.

BARANOWSKA, J. et. al. The Development of SPE Procedures and an UHPLC Method for the Simultaneous Determination of Ten Drugs in Water Samples. **Water Air Soil Pollut**, v 216, p. 417- 425, 2009.

BARROS, 2008. "**Origem, Distribuição e Preservação da Água no Planeta Terra**" <http://revistadasaguas.pgr.mpf.gov.br/edicoes-da-revista/edicao-06/edicoes-da-revista/edicao-06/artigos/origem-distribuicao-e-preservacao-da-agua-no-planeta-terra>, PGR | 4ª CCR | Ano 2 | Número 6 | junho 2008. Revistas das Aguas. Acesso em julho, 2010.

BRASIL. Portaria nº 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 26 março 2004. Disponível em: dtr2004.saude.gov.br/dab/saudebucal/legislacao/portaria518_25_03_04.pdf. Acesso em: dezembro de 2010.

BENDZ, D. et al. Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Höje River in Sweden. **Journal of Hazardous Materials**, v. 122, p. 195-204, 2005.

Brenner, C.G.B, **Antimicrobiais Sulfametoxazol e Trimetoprima em Efluente Hospitalar: Determinação, Degradação Através De Eletrocoagulação E**

- Identificação De Subprodutos E Metabólitos.** 2009. 6p. Dissertação (Mestrado em Química) - UFSM, Santa Maria, SM.
- BUCHBERGER, W. W. et al. Novel analytical procedures for screening of drug residues in water, waste water, sediment and sludge. **Analytica Chimica Acta**, v. 593, p. 129–139, 2007.
- BILA, D. M; Dezotti, M. FÁRMACOS NO MEIO AMBIENTE. **Quimica. Nova**, v. 26, p. 523-530, 2003.
- CASSIANO, N. M. et al. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Quimica Nova**, v. 32, p. 1021-1030, 2009.
- CALDAS, S.S, **Otimização e Validação de Métodos Empregando DLLME, SPE, HPLC-DAD e LC-ESI-MS/MS para Determinação de Agrotóxicos em Água subterrânea.** 2009. 15 p. Dissertação (Mestrado em Química) - FURG, Rio Grande, RS
- CALIXTO, J. B; Siqueira Jr J. M.. Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios, **Gazeta Médica da Bahia**, 78 (Suplemento 1), p. 98 - 106, 2008.
- CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis - Viewpoint and discussion. **Journal of Chromatography B**, v. 689, p. 175-180, 1997.
- CHEN, Z et al. Determination of caffeine as a tracer of sewage effluent in natural waters by on-line solid-phase extraction and liquid chromatography with diode-array detection. **Water Research**, v. 36 , p. 4830–4838, 2002.
- CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, p. 623-636, 2008.
- COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de Cromatografia.** Campinas: Editora da Unicamp, 2006. 17 p.
- CHEN, Z. et al. Determination of caffeine as a tracer of sewage effluent in natural waters by on-line solid-phase extraction and liquid chromatography with diode-array detection. **Water Research** , v.36, p. 4830–4838, 2002.
- CONLEY, J.M et al. Rapid liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of a broad mixture of pharmaceuticals in surface water. **Journal of Chromatography A**, v. 1185,p. 206–215, 2008.
- DAUGHTON, C. G; Ternes, T. A. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change, **Environmental Health Perspectives**, v. 107, p. 907-938, 1999

DEMOLINER, A., **Otimização e Validação de Metodologia Analítica Empregando SPE e LC-ESI-MS/MS para Determinação de Multiclasses de Agrotóxicos e Metabólitos em Água de Superfície e Abastecimento**. 2008. 62 p. Dissertação (Mestrado em Química) - FURG, Rio Grande, RS.

ECONOMOU, A. *et al.* Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 5856-5867, 2009

FARIAS, L.J., **Avaliação de diferentes sorventes na extração em fase sólida de pesticidas em água. Desenvolvimento e validação de metodologia**. 2004. 19 p. Dissertação (Mestrado em Química) – UNICAMP, São Paulo, SP.

FERNANDEZ-ALBA, A. **Chromatographic-mass spectrometric food analysis for the trace determination of pesticides residues**. In. Comprehensive analytical chemistry. The Netherlands: Elsevier. 2005, 287 p.

Find Chemicals in the Labseeker. Disponível em:
<http://www.labseeker.com/ChemicalBiotech/default.asp>. Acesso em julho, 2010.

GARCÍA, M.D. *et al.* Chemometric tools improving the determination of anti-inflammatory and antiepileptic drugs in river and wastewater by solid-phase microextraction and liquid chromatography diode array detection. **Journal of Chromatography A**, v.1216, p.5489–5496, 2009.

GARCÍA-GALÁN, M, J.*et al.* Determination of 19 sulfonamides in environmental water samples by automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography–tandem mass spectrometry (SPE-LC–MS/MS). **Talanta**, V.81, p. 355–366, 2010.

GOODMAN E GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica** . Porto Alegre: AMGH Editora Ltda, 11. ed. 2010. p. 245-254 – 558 – 999-383.

GOSETTI, *et al.* Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 3929–3937, 2010..

GRACIA-LOR, *et al.* Simultaneous determination of acidic, neutral and basic pharmaceuticals in urban wastewater by ultra high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1217, p 622–632, 2010.

GROS *et al.* Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. **Talanta** , v. 70, p.678–690, 2006.

GRUJIĆ, S. et al. Determination of multiple pharmaceutical classes in surface and ground waters by liquid chromatography–ion trap–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 4989–5000, 2000.

GUO, J.H. et al. Determination of triclosan, triclocarban and methyl-triclosan in aqueous samples by dispersive liquid–liquid microextraction combined with rapid liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 3038–3043, 2009.

GRUPO Pró-Genéricos. Dúvidas. São Paulo, [2001a?]. Disponível em: <<http://www.progenericos.org.br>>. Acesso em julho, 2010.

GRUPO Pró-Genéricos. História. São Paulo, [2001b?]. Disponível em: <<http://www.progenericos.org.br>>. Acesso em julho, 2010.

HALLING-SORENSEN, J. B. et al. Occurrence, Fate and Effects of Pharmaceutical substances the environment - A review. **Chemosphere**, v.36, p. 357-393, 1998.

HENNION, Marie-Claire. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 856, p3–54, 1999.

HILTON, M.J. et al. Determination of selected human pharmaceutical compounds in effluent and surface water samples by high-performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1015, p. 129 -141, 2003

HUERTA-FONTELA, M. et al. Fast liquid chromatography–quadrupole-linear ion trap mass spectrometry for the analysis of pharmaceuticals and hormones in water resources. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 4212–4222, 2010.

INMETRO (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL) DOQ-CGCRE-008: **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. Revisão 03 - Brasília, 2010. 20p.

JÖRGENSEN, S. et al. Drugs in the environment. **Chemosphere**, v. 40, p. 691-699, 2000.

KASPRZYK-HORDERN, B.; Dinsdale, R. M., Guwy, A. J. The effect of signal suppression and mobile phase composition on the simultaneous analysis of multiple classes of acidic/neutral pharmaceuticals and personal care products in surface water by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography–negative electrospray tandem mass spectrometry. **Talanta**, v 74, p. 1299–1312, 2008.

KHETAN, S.K.; Collins, T. J. Human Pharmaceuticals in the Aquatic Environment: A Challenge to Green Chemistry. **Chemical Reviews**. v.107, p. 2319-2364, 2007.

- KLAUS, K. **Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks.** Alemanha: Springer, 3. Ed.2003. p. 3
- KOSJEK, T. et al. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAIDs) residues in water samples. **Environment International**, v. 31, n. 5, p. 679-685, 2005.
- Kot-Wasik, A; Dębska,J; Namieśnik, J. Analytical techniques in studies of the environmental fate of pharmaceuticals and personal-care products. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, p. 557-568, 2007.
- KOSTOPOULOU, M; Nikolaou, A. Analytical problems and the need for sample preparation in the determination of pharmaceuticals and their metabolites in aqueous environmental matrices. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, p. 1023 -1035 , 2008.
- KYMMERE, K. Resistance in the environment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, p. 311–320, 2004.
- KRUVE, A., *et al.* Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1187, p. 58-66, 2008.
- LACEY, C. et.al. An LC–MS method for the determination of pharmaceutical compounds in wastewater treatment plant influent and effluent samples. **Talanta**, v. 75, p. 1089–1097, 2008
- LANÇAS, F. M. **Cromatografia Líquida Moderna: HPLC/CLAE.** Campinas: Editora Átomos, 2009. 267 p.
- LANÇAS, F.M. **Validação de métodos cromatográficos de análise.**São Paulo: Editora Rima, 2004. 1 p.
- LÓPEZ, Roberto (Coord.). **Medicamentos: los casos de Bolivia, Brasil, Chile e Perú.** Peru: Tierra Nueva, 1988.
- MAGNÉR,J. et al. Application of a novel solid-phase-extraction sampler and ultra-performance liquid chromatography quadrupole-time-of-flight mass spectrometry for determination of pharmaceutical residues in surface sea water. **Chemosphere**, v. 80, p. 1255–1260, 2010.
- MARQUES, L.A. **Aplicação de Técnicas Avançadas de Espectrometria de Massas em Ciências de Alimentos e Perfumaria.** 2006, 2 p. Dissertação(Mestre em química) - UNICAMP. Campinas, SP
- MENEGATTI, R; Fraga. C. A. M.; Barreiro E. J.. A importância da síntese de fármacos. **Química Nova na Escola**, n. 3, p. 16, 2001.

MONTES, R. et al. Dispersive liquid–liquid microextraction applied to the simultaneous derivatization and concentration of triclosan and methyltriclosan in water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 205–210, 2009.

MUTAVDŽIĆ, et al. Development and optimization of the SPE procedure for determination of pharmaceuticals in water samples by HPLCdiode array detection. **Journal of Separation Science** v. 33, p. 258-267, 2010.

NAKADA, N. et al. Pharmaceutical chemicals and endocrine disrupters in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment. **Water Research**, v. 40, p. 3297–3303, 2006

NEBOT, C; Gibb, S. W., Boyd, K. G. Quantification of human pharmaceuticals in water samples by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 598, p. 87–94, 2007.

Organização Mundial da Saúde (OMS) “Desenvolvimento Sustentável e Meio Ambiente Saudável” Disponível em:
http://www.searo.who.int/en/Section23/Section1000_15448.htm .Acesso em julho, 2010

ONESIOS, K. M.; Yu, J. T.; Bouwer, E.J. Biodegradation and removal of pharmaceuticals and personal care products in treatment systems: a review. **Biodegradation**, v. 20, p. 441–466, 2009

PAVLOVIĆ, D. M. et.al. Sample Preparation in analysis of pharmaceuticals. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 26, p. 1062-1075, 2007

PRESTE, O.D. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO MULTIRRESÍDUO PARA DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS EM ARROZ POLIDO UTILIZANDO MÉTODO QuEChERS MODIFICADO, CLEAN-UP DISPERSIVO E GC-MS (NCI-SIM). 2007. 54 p. Dissertação (Mestre em Química) – UFSM, Santa Maria, RS.

QUEIROZ, S.C et al. Encontrados em Fluidos Biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, n.1, p. 68-76, 2001.

RAIMUNDO, C.C.M, **Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos nas águas superficiais da bacia do rio Atibaia**. 2007. 5,18 p. Dissertação (Mestrado em Química) - UNICAMP, São Paulo, SP.

RAIMUNDO, C.C.M, **Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos nas águas superficiais da bacia do rio Atibaia**. 2007. 5 p. Dissertação (Mestrado em Química) - UFSM, Santa Maria, RS.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia** . Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 6. ed. 2007. p. 189 – 578-463. et al. **Farmacologia** . Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 6. ed. 2007. p. 189 – 578-463.

- RICHARDSON, S.D. Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. **Analytical Chemistry**, v. 79, p. 4295–4324, 2007.
- ROBINSON, I. *et al.* Trends in the detection of pharmaceutical products, and their impact and mitigation in water and wastewater in North America . **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.387, p. 1143-1151, 2007.
- ROCHA, C *et al.* **Introdução á química ambiental**. Porto Alegre: bookman, 2.ed. 2009, 120 p.
- RIBANI, M., *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004
- RODRIGUES, S.A, **Otimização e Validação de Métodos Empregando MSPD, QuChERS modificado e LC-ESI-MS/MS para Determinação de Agrotóxicos em cebola**. 2010. 42;80 p. Dissertação (Mestrado em Química) - FURG, Rio Grande, RS.
- ROZENFELD , S ; Rangel I. T. M. “**A Farmacovigilância**”. Disponível em: www.scielo.org/pdf/csp/v4n3/09.pdf. Acesso em julho, 2010.
- SANCO, COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. Document nº SANCO/10684/2009. **Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed**. Uppsala, Suécia. 01/01/2010.
- SABBIONI, C. *et al.* A rapid HPLC-DAD method for the analysis of fluoxetine and norfluoxetine in plasma from overdose patients. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, p. 351–356, 2004.
- SAITO, k. *et al.* Determination of anabolic steroids in human urine by automated in-tube samples and its application to non-target screening of North Sea water for organic contaminants by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 912, p.151–161, 2001.
- SAITO, K. *et al.* Determination of anabolic steroids in human urine by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 52, p. 727–733, 2010.
- SILVA, P. **Farmacologia** . Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 7. ed. 2010. p. 267-207-1009.
- SODRÉ, F.F. *et al.* Occurrence of Emerging Contaminants in Brazilian Drinking Waters: A Sewage-To-Tap Issue. **Water Air Soil Pollut**, V. 206, p. 57–67, 2010.

SUN, Z. et al. Selective trace analysis of diclofenac in surface and wastewater samples using solid-phase extraction with a new molecularly imprinted polymer. **Analytica Chimica Acta**, v. 620, p. 73–81, 2008.

SOUZA, L.M, **APLICAÇÕES DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS E DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA NA CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE BIOMOLÉCULAS DE BAIXA MASSA MOLECULAR**. 2008. 13 p. Tese (Mestrado em Ciências – Bioquímica) – UFP, Curitiba, PR

SOUZA,L.M, **APLICAÇÕES DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS E DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA NA CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE BIOMOLÉCULAS DE BAIXA MASSA MOLECULAR**.2008. 3p. Tese (Doutor em Ciências – Bioquímica) – UFPR, CURITIBA, PR.

STEENE,J. et. al. Validation of a solid-phase extraction and liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometric method for the determination of nine basic pharmaceuticals in wastewater and surface water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1182, p.153–160, 2008.

STUMPF, M. et al. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **The Science of the Total Environment**, v. 225, p. 135-141, 1999.

SUCHARA, E. A, **Desenvolvimento de Metodologias Analíticas para Determinação De Fármacos Em Fluidos Biológicos E Amostras Ambientais Através de Cromatografia Líquida e Gasosa..** 2007. 4 p. Tese (Doutorado em Química) - UFSC, Florianópolis, SC.

SUCHARA, .E.A. et al. A combination of statistical and analytical evaluation methods as a new optimization strategy for the quantification of pharmaceutical residues in sewage effluent. **analytica chimica acta** ,v. 6 1 3, p. 169–176, 2008.

SUCHARA, E.P. **Desenvolvimento de metodologias analíticas para determinação de fármacos em fluidos biológicos e amostras ambientais através de cromatografia líquida e gasosa**. 2007. 4p. Tese (Doutorado em Química) – UFSC, Florianópolis, SC.

SKOOG, D.A. et al. Fundamentos de Química Analítica. 8. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2008. 999 p.

Tambosi, J. L. Recent research data on the removal of pharmaceuticals from sewage treatment plants (STP). **Quimica Nova**, v. 33, p. 1-10, 2010

Taylor,P.J Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. **Clinical Biochemistry** v. 38, p. 328– 334, 2005.

TAUXE-WUERSCH, A. et al. Occurrence of several acidic drugs in sewage treatment plants in Switzerland and risk assessment. **Water Research**, v. 39, p. 1761-1772, 2005.

TERNES, T.A. et al. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. **The Science of the Total Environment**, v. 225, p. 81-90, 1999.

TOGOLA, et al. Analytical development for analysis of pharmaceuticals in water samples by SPE and GC–MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.388, p.627-635, 2007

VARGA, R. et al. Determination of antihypertensive and anti-ulcer agents from surface water with solid-phase extraction–liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 83, p.1447–1454, 2011.

VÉKEY, K. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. **Journal of Chromatography A**. v. 921, p.227, 2001

VULLIET, E. et.al. Occurrence of pharmaceuticals and hormones in drinking water treated from surface Waters. **Environ Chem Lett**, 2009.

WEICH, A, **Otimização da Avaliação do Fármaco e Comprimidos de Atenolol: Aplicação em Produtos, Controle e Registro de Medicamentos Genéricos**. 2007. 20 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – UFSM, Santa Maria, RS.

WEIGEL, S; Bester, K; Huhnerfuss, H. New method for rapid solid-phase extraction of large-volume water samples and its application to non-target screening of North Sea water for organic contaminants by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 912, p.151–161, 2001.

WEIL, H; Knepper, T. P. Pharmaceuticals in the River Rhine. **The Handbook of Environmental Chemistry**, v.5, p.177-184, 2006.

WILLE,K. et al. Validation and application of an LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of 13 pharmaceuticals in seawater. **Anal Bioanal Chem**, v. 397, p. 1797–1808, 2010.

WU, J. et. al. Study on the matrix effect in the determination of selected pharmaceutical residues in seawater by solid-phase extraction and ultra-high-performance liquid chromatography–electrospray ionization low-energy collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 1471–1475, 2010.

XIE, C. et al. Determination of medroxyprogesterone in water samples using dispersive liquid-liquid microextraction with low solvent consumption. **Microchim Acta**, v.168, p.253–258, 2010.

XIONG, C. et al. Extraction and determination of some psychotropic drugs in urine samples using dispersive liquid–liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, p.572–578, 2009.

YAZDI, A.S; Razavi, N; Yazdinejad, S. R. Separation and determination of amitriptyline and nortriptyline by dispersive liquid–liquid microextraction combined with gas chromatography flame ionization detection. **Talanta**, v.75, p.1293–1299, 2008.

ZHANG Z.L.; Zhoul J.L. Simultaneous determination of various pharmaceutical compounds in water by solid-phase extraction–liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1154, p. 205–213, 2007.

ZUCCATO, E. et al. Pharmaceutical in the environment in Italy: Causes, Occurrence, Effects and Control. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 13, p. 15 – 21, 2006.

9. PRODUÇÃO CIENTÍFICA REFERENTE AO TRABALHO

CARDOSO, L.V; TOMASINI, D.; SAMPAIO, M.R.F. ; Kleemann, N ; CALDAS, S.S.; PRIMEL, E. G; Gonçalves, F. F. **Desenvolvimento de método analítico empregando SPE e LC-ESI-MS/MS para determinação de fármacos em água para consumo.** In: 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010, Águas de Lindoia.

CARDOSO, L.V; TOMASINI, D.; SAMPAIO, M.R.F. ; CALDAS, S.S.; PRIMEL, E. G; Gonçalves, F. F. **Estudo comparativo entre as fontes ESI e APCI para determinação de fármacos em água por LC-MS/MS.** In: SIMCRO- Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas afins, 2010, Campos do Jordão SP.

CARDOSO, L.V; TOMASINI, D.; SAMPAIO, M.R.F. ; Kleemann, N ;CALDAS, S.S.; PRIMEL, E. G; Gonçalves, F. F.. **Desenvolvimento de método analítico empregando SPE e LC-ESI-MS/MS para determinação de fármacos em água para consumo.** In: XII Encontro de pós graduação - IX MPU- Mostra da produção universitária, 2010, Rio Grande RS.

ANEXO 1

Optimization and Validation of a Method using SPE and LC-APCI-MS/MS for Determination of Pharmaceuticals in Surface and Public Supply Water.

Liziane V. Cardoso, Débora Tomasini, Maicon R. F. Sampaio, Sergiane S. Caldas, Natiele Kleemann, Ednei G. Primel and Fabio F. Gonçalves*

No presente trabalho, foi desenvolvido e validado um método analítico baseado na extração em fase sólida e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas tandem (LC-APCI-MS-MS) para a determinação e confirmação de cinco fármacos em amostras de água. Os limites de detecção variaram de 0,053 a 0,53 $\mu\text{g L}^{-1}$ e os limites de quantificação de 0,16 a 1,6 $\mu\text{g L}^{-1}$. Foi obtida boa linearidade, com $r > 0,99$ para todos os compostos. As recuperações, dos compostos, variaram de 70 a 120%, com RSDs menores que 20% para todos. Através do monitoramento de reações múltiplas (MRM), foram selecionadas duas diferentes transições íon precursor-íon produto para cada fármaco.

In the present work, an analytical method based on solid phase extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-APCI-MS-MS) was developed and validated for the determination and confirmation of five pharmaceuticals in water samples. The detection limits ranged from 0.053 to 0.53 $\mu\text{g L}^{-1}$ and limits of quantification from 0.16 to 1.6 $\mu\text{g L}^{-1}$. Good linearity was obtained, with $r > 0.99$ for all compounds. The recoveries of the compounds ranged from 70 to 120% with RSDs below 20% for all. Through multiple reactions monitoring (MRM) two different transitions, precursor ion-product ion, were selected for each pharmaceutical.

Keywords: method validation, SPE, LC-APCI-MS-MS, pharmaceuticals