

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**IMPLEMENTAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA
PARA DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE ANTIBIÓTICOS EM
ÁGUAS RESIDUÁRIAS**

Louíse Jank

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para obtenção do título de Mestre em Química

Porto Alegre, 2011.

O presente trabalho foi realizado entre agosto de 2009 e outubro de 2011, no Laboratório de Química Analítica e Ambiental do Instituto de Química da UFRGS e no Laboratório Nacional Agropecuário – LANAGRO/RS, sob orientação da Professora Doutora Tânia Mara Pizzolato e supervisão do Fiscal Federal Agropecuário Mestre Rodrigo Barcelos Hoff.

Orientadora: Prof^a Dr^a Tânia Mara Pizzolato

Supervisor: FFA MSc. Rodrigo Barcellos Hoff

Banca Examinadora:

Professora Doutora Maria do Carmo Ruaro Peralba
PPGQ/UFRGS

Professor Doutor Daniel Eduardo Weibel
PPGQ/UFRGS

Professor Doutor Luiz Olinto Monteggia
IPH/UFRGS

Coordenador da Pós-Graduação:

Prof. Dr. Osvaldo Casagrande

Agradecimentos

Inicialmente, gostaria de agradecer profundamente à professora Tânia que acreditou na minha capacidade, aceitando me orientar e me indicando ao Lanagro, foi possível adquirir os conhecimentos na técnica, e sempre se mostrou muito disponível para me auxiliar quando necessário.

A todo o pessoal do Lanagro, onde fiz grandes amigos e onde renovo diariamente meu prazer pela química analítica e por seus desafios. Ao Rodrigo, responsável pelo meu primeiro contato com o LC-MS/MS, pelos ensinamentos no desenvolvimento de métodos. Ao Fabiano, pela ajuda na resolução de problemas e atenção sempre. A Tanara, que junto com o Rodrigo, passou várias noites comigo estudando para as disciplinas, outros dias indo assistir às aulas na UFRGS. Ao Gabriel, pela disponibilidade em discutir, explicar e conversar. Pela amizade, a todos, os citados e também a Jéssica, Magda, Lara, Juliana P., Greice, Maria, Adir, Dienifer, Doriane, Adriana, Etiene, Raquel, Daniel, Leonardo, Juliana A. Os dias com vocês são indescritivelmente bons.

Aos colegas da UFRGS, Carla, Flávia e Nelson, por toda a ajuda no desenvolvimento do trabalho, discussão dos métodos do trabalho, e especialmente à Raquel e ao Alex, pela ajuda na coleta e preparo de amostras, na preparação de seminários, apresentações, tabelas, revisões e pela amizade.

Aos meus pais, Luiz e Claísa, que mesmo de longe se preocupam e me apóiam sempre, e que fazem o possível para que nunca me falte nada. A minha irmã querida Jéssica, pela paciência nos momentos de preocupação e me ajudar a relaxar quando eu estava estressada, muito obrigada. Ao Carlos que muitas vezes também me ouviu, ajudou e aturou. A vó Nair e ao vô Arno, pelo orgulho que sentem de mim.

Minhas amigas Lílian, Bárbara, Juliana, Luciana, Priscila, Taís, pelos sempre prazerosos encontros. A Paola, pelos bons momentos ao vivo e pelos outros de vídeoconferência – happy hour. Ao Rafa e ao Fê, queridões que me fazem rir sempre. A Nice, minha pequena querida, pelos ótimos momentos. A todos vocês, pela amizade sempre e pelos momentos necessários para desopilar, que diversas vezes me ajudaram a administrar a pressão.

Ao Bernardo, que foi muito importante nesse ano especialmente turbulento, pela paciência e palavras certas para acalmar e me manter focada no objetivo maior.

INDICE	5
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE EQUAÇÕES	14
LISTA DE ABREVIATURAS	15
RESUMO	17
ABSTRACT	18

ÍNDICE

1. Introdução	19
2. Objetivos	21
2.1 Objetivo geral	21
2.2 Objetivos específicos	21
3. Revisão bibliográfica	22
3.1 Contextualização	22
3.2 Antibióticos de uso humano	25
3.2.1 Características dos compostos em estudo	26
3.2.1.1 Azitromicina	27
3.2.1.2 Eritromicina	27
3.2.1.3 Sulfametoxazol	28
3.2.1.4 Trimetoprima	29
3.2.1.5 Cefalexina	30
3.2.1.6 Ciprofloxacino e Norfloxacino	30
3.2.1.7 Tetraciclina	32
3.2.2 Resistência Bacteriana	33
3.3 Amostras aquosas ambientais – preparação	33
3.3.1 Extração em Fase Sólida (EFS)	34
3.4 Cromatografia a líquido acoplada a espectrometria de massas em modo tandem (CL-EM/EM)	38
3.4.1 Desenvolvimento e otimização de metodologia analítica empregando CL-EM/EM	43
3.4.2 Avaliação do desempenho do método desenvolvido	44
3.4.2.1 Parâmetros de Validação de Metodologia Analítica	45
3.4.2.1.1 Especificidade e Seletividade	45
3.4.2.1.2 Faixa de Trabalho e Faixa de Trabalho Linear	45

3.4.2.1.3	Linearidade	46
3.4.2.1.4	Sensibilidade	46
3.4.2.1.5	Limite de Detecção	47
3.4.2.1.6	Limite de Quantificação	47
3.4.2.1.7	Exatidão e Tendência	47
3.4.2.1.8	Precisão	47
3.4.2.1.9	Robustez	48
3.4.2.1.10	Incerteza da Medição	49
3.4.3	Análise de Resíduos de Fármacos na Literatura: Publicações	49
3.5	Tratamento de efluentes urbanos	52
3.5.1	Publicações relacionadas à degradação de antibióticos em efluentes urbanos	54
4.	Materiais e Métodos	57
4.1	Materiais	57
4.1.1	Solventes	57
4.1.2	Reagentes	57
4.1.3	Padrões	57
4.2	Métodos	58
4.2.1	Limpeza dos Materiais de Laboratório	58
4.2.2	Preparação das soluções padrão estoque e de trabalho	58
4.2.3	Preparação da fase móvel	59
4.2.4	Otimização dos parâmetros para análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em modo tandem (CL-EM/EM)	59
4.2.5	Estabilidade das soluções em solvente dos antibióticos	59
4.2.6	Avaliação do efeito de matriz	60
4.2.7	Determinação da supressão iônica no CL-EM/EM com ionização por <i>electrospray</i>	60
4.2.8	Extração em fase sólida (EFS)	60
4.2.9	Recuperação	62

4.2.10	Determinação do volume de quebra	62
4.2.11	Avaliação de parâmetros de desempenho do método de quantificação de antibióticos: linearidade, intervalo de trabalho, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, repetitividade e reprodutibilidade	62
4.3	Equipamentos	64
4.4	Área de Estudo – Águas Residuárias	64
4.4.1	Efluentes urbanos	64
4.4.2	Coleta, técnica de amostragem, preservação e preparação das amostras de efluente	64
4.4.3	Pontos de coleta selecionados	65
4.4.4	Sazonalidade	65
4.4.5	Preparo das amostras reais de efluentes urbanos	65
5	Resultados e Discussão	66
5.1	Determinação dos Parâmetros para Análise por CL-EM/EM	66
5.1.1	Condições de separação por cromatografia líquida	67
5.2	Estabilidade dos Analitos em Fase Móvel	71
5.3	Avaliação do Efeito de Matriz	72
5.4	Determinação da Supressão Iônica no CL-EM/EM com Ionização por <i>Eletrospray</i>	75
5.5	Extração em Fase Sólida	80
5.6	Determinação do Volume de Quebra	82
5.7	Parâmetros de Desempenho do Método de Quantificação: Linearidade de Intervalo de Trabalho, Determinação do Limite de Detecção, Limite de Quantificação, Exatidão, Repetitividade e Reprodutibilidade	84
5.7.1	Recuperação	84
5.7.2	Linearidade e Intervalo de Trabalho	85
5.7.3	Limite de detecção e limite de quantificação	88
5.7.4	Exatidão	91
5.7.5	Repetitividade	92

5.7.6	Reprodutibilidade	93
5.8	Análise de Amostra Real	95
5.8.1	Avaliação da degradação dos analitos durante a permanência na ETE	98
6	Conclusão	100
7	Referências Bibliográficas	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração de antibióticos em amostras ambientais aquosas (ng L^{-1}) de diversos países. Levantamento realizado no Web of Science a partir de 2003.

Tabela 2. Condições para extração em fase sólida para pré-concentração de antibióticos em amostra aquosa. Artigos publicados nos últimos cinco anos.

Tabela 3. Trabalhos publicados em 2011 relativos à métodos analíticos para detecção e quantificação de PPCPs em amostras aquosas ambientais.

Tabela 4. Características das águas residuárias na ETE do estudo.

Tabela 5. Níveis de tratamento, descrição e exemplos de processos utilizados para o tratamento de águas residuárias.

Tabela 6. Dados da literatura sobre a incidência e taxa de remoção de antibióticos em águas residuárias.

Tabela 7. Variações realizadas nos lotes utilizados para avaliação da reprodutibilidade do método.

Tabela 8. Parâmetros otimizados para o analisador de massas dos analitos e padrões internos, por ionização por eletrospray no modo positivo.

Tabela 9. Parâmetros para a ionização por eletrospray no modo positivo.

Tabela 10. Gradientes de composição de fase móvel avaliados para a separação cromatográfica dos antibióticos em estudo.

Tabela 11. Tempos de retenção dos antibióticos obtidos a partir da análise por CL-EM/EM.

Tabela 12. Porcentagem da área original dos antibióticos, em solução em fase móvel, na faixa de concentração de trabalho ($100 \mu\text{g L}^{-1}$), obtidas como a razão de área em relação ao norfloxacino no período de 39 dias.

Tabela 13. Valores de recuperação para cada analito.

Tabela 14. Equações de reta e coeficiente de correlação para cada analito.

Tabela 15. Valores obtidos para o limite de detecção e de quantificação instrumental, obtidos com soluções dos analitos na fase móvel.

Tabela 16. Valores obtidos para o limite de detecção e de quantificação do método, obtidos com soluções dos analitos na matriz e considerando o fator de concentração de 100 vezes devido à pré-concentração.

Tabela 17. Valores de exatidão para os analitos nas concentrações 10, 50 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Tabela 18. Valores máximos de RSDr para as concentrações utilizadas no experimento.

Tabela 19. Desvios padrão relativo para os antibióticos em cada nível de concentração.

Tabela 20. Valores máximos de RSDR para as concentrações utilizadas no experimento.

Tabela 21. Valores de RSDR obtidos na comparação de lotes de diferentes analistas.

Tabela 22. Valores de RSDR obtidos na comparação de lotes processados em diferentes equipamentos.

Tabela 23. Concentração dos antibióticos, em ng L^{-1} , e desvio padrão relativo (DPR%) no afluente (Af) e efluente (Ef) da ETE, em cada mês.

Tabela 24. Porcentagem de remoção dos antibióticos após o tratamento da ETE, em cada mês.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas básicas das penicilinas (β -lactâmicos) e das tetraciclinas

Figura 2. Estrutura molecular da azitromicina

Figura 3. Estrutura molecular da eritromicina

Figura 4. Estrutura molecular do sulfametoxazol

Figura 5. Estrutura molecular do trimetoprima

Figura 6. Estrutura molecular da cefalexina

Figura 7. Estrutura molecular do ciprofloxacino e do norfloxacino, respectivamente

Figura 8. Grupo piperazinil das fluoroquinolonas

Figura 9. Fluoroquinolonas na forma protonada e desprotonada

Figura 10. Estrutura molecular da tetraciclina

Figura 11. Estruturas da anidrotetraciclina e da 4-epitetraciclina, respectivamente

Figura 12. Esquema geral das etapas do procedimento de extração em fase sólida

Figura 13. Diagrama de blocos representando um espectrômetro de massas e seus principais componentes

Figura 14. Representação esquemática da fonte de ionização por eletrospray do equipamento utilizado neste trabalho com a indicação de seus principais componentes

Figura 15. Esquema de equipamento de espectrometria de massas, do tipo triplo quadrupolo em modo tandem, com ionização por eletrospray

Figura 16. Representação esquemática dos quatro modos de trabalho do espectrômetro de massas tipo triplo quadrupolo

Figura 17. Publicações referentes às palavras-chave pharmaceutical x water x LC-MS/MS dos últimos dez anos, pela base de dados Scopus

Figura 18. Publicações referentes às palavras-chave antibiotics x water x LC-MS/MS dos últimos seis anos

Figura 19. Protocolos de EFS testados

Figura 20. Cromatogramas no modo MRM da solução mista dos antibióticos e seus respectivos padrões internos, nos três gradientes de fase móvel avaliados

Figura 21. Cromatograma da solução dos antibióticos, em fase móvel, no modo MRM na concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$

Figura 22. Cromatograma da solução dos padrões internos, em fase móvel, no modo MRM na concentração de $50 \mu\text{g L}^{-1}$

Figura 23. Curvas analíticas na fase móvel (CFM) e na matriz (CM) para a eritromicina

Figura 24. Curvas analíticas na fase móvel (CFM) e na matriz (CM) para a ciprofloxacino

Figura 25. Curvas analíticas na fase móvel (CFM) e na matriz (CM) para o norfloxacino

Figura 26. Curvas analíticas na fase móvel (CFM) e na matriz (CM) para o sulfametoxazol

Figura 27. Curvas analíticas na fase móvel (CFM) e na matriz (CM) para a cefalexina

Figura 28. Curvas analíticas na fase móvel (CFM) e na matriz (CM) para a tetraciclina

Figura 29. Curvas analíticas na fase móvel (CFM) e na matriz (CM) para o trimetoprima

Figura 30. Curvas analíticas na fase móvel (CFM) e na matriz (CM) para a azitromicina

Figura 31. Avaliação da supressão iônica para a transição quantificadora da eritromicina

Figura 32. Avaliação da supressão iônica para a transição quantificadora do ciprofloxacino

Figura 33. Avaliação da supressão iônica para a transição quantificadora do norfloxacino

Figura 34. Avaliação da supressão iônica para a transição quantificadora do sulfametoxazol

Figura 35. Avaliação da supressão iônica para a transição quantificadora da cefalexina

Figura 36. Avaliação da supressão iônica para a transição quantificadora da trimetoprima

Figura 37. Avaliação da supressão iônica para a transição quantificadora da tetraciclina

Figura 38. Avaliação da supressão iônica para a transição quantificadora da azitromicina

Figura 39. Valores de área dos analitos em função do procedimento de EFS

Figura 40. Valores de área da eritromicina em função do procedimento de EFS

Figura 41. Gráfico da razão da recuperação dos antibióticos em função da recuperação do norfloxacino, pela adição de 50 ng, em função do volume da solução (25, 50, 100 e 250 mL) em água ultrapura

Figura 42. Gráfico da razão da recuperação dos antibióticos em função da recuperação do norfloxacino, pela adição de 50 ng, em função do volume da solução (25, 50, 100 e 250 mL) em água potável

Figura 43. Gráfico da recuperação dos analitos, pela adição de 50 ng, em função do volume da solução (25, 50, 100 e 250 mL) em efluente de saída

Figura 44. Curva de calibração da eritromicina em fase móvel

Figura 45. Curva de calibração do ciprofloxacino em fase móvel

Figura 46. Curva de calibração do norfloxacino em fase móvel

Figura 47. Curva de calibração do sulfametoxazol em fase móvel

Figura 48. Curva de calibração da cefalexina em fase móvel

Figura 49. Curva de calibração da tetraciclina em fase móvel

Figura 50. Curva de calibração da trimetoprima em fase móvel

Figura 51. Curva de calibração da azitromicina em fase móvel

Figura 52. Altura do pico e altura do ruído

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Cálculo da recuperação

Equação 2. Cálculo da concentração do ruído

Equação 3. Cálculo do LD sem FC

Equação 4. Cálculo do LD com FC

Equação 5. Cálculo do LQ sem FC

Equação 6. Cálculo do LD com FC

Equação 7. Equação de Horwitz para repetitividade

Equação 8. Equação de Horwitz para reprodutibilidade

ABREVIATURAS

Af: afluente

ACO: acetona

AZT: azitromicina

CFM: curva em fase móvel

CFT: ceftiofur

CFX: cefalexina

CLAE-DF: cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência

CL-EM/EM: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em modo tandem

CLUE-EM/EM: cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas em modo tandem

CM: curva em matriz

CPF: ciprofloxacino

DMC: demeclociclina

DP: desvio padrão

DPR: desvio padrão relativo

Ef: efluente

EFS: extração em fase sólida

EI: ionização por *electrospray*, do inglês *electrospray ionization*

ENF: enrofloxacin

Eq: equação

ERT: eritromicina

ETE: estação de tratamento de efluentes

FC: fator de concentração

FIA: análise por injeção em fluxo, do inglês *flow injection analysis*

FS: fase sólida

HAc: ácido acético

LD: limite de detecção

LQ: limite de quantificação

MeOH: metanol

MRM: monitoramento múltiplo de reação (do inglês, *multiple reaction monitoring*)

NRF: norfloxacino

PI: padrão interno

PPCP: produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais (do inglês, *pharmaceutical and personal care products*)

SMX: sulfametoxazol

SPY: sulfapiridina

Ref: referência

RSD_R: desvio padrão relativo da reprodutibilidade

RSD_r: desvio padrão relativo da repetitividade

TC: tetraciclina

TIL: tilosina

TRI: trimetoprima

VQ: volume de quebra

RESUMO

Este trabalho é constituído pelo desenvolvimento de uma metodologia para análise de oito antibióticos amplamente consumidos para tratamento humano em amostras aquosas ambientais e pela determinação da presença e quantificação dos mesmos nessas matrizes.

Os analitos estudados foram Azitromicina (AZT), Eritromicina (ERT), Ciprofloxacino (CPF), Norfloxacino (NRF), Sulfametoxazol (SMX), Trimetoprima (TRI), Tetraciclina (TC) e Cefalexina (CFX). Como padrões internos, foram utilizados a Tilosina (TIL), Sulfapiridina (SPY), Ceftiofur (CFT), Enrofloxacino (ENF) e Demeclociclina (DMC).

A determinação foi realizada utilizando-se cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL-EM/EM), e parâmetros de desempenho do método, como recuperação, linearidade, faixa de trabalho, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, repetitividade e reprodutibilidade foram avaliados e julgados adequados.

O procedimento de extração utilizado foi extração em fase sólida (EFS), que além de reter os compostos de interesse eliminando os interferentes, é capaz de realizar a concentração da amostra, passo de extrema valia na determinação de resíduos em nível traço. O procedimento de EFS foi otimizado com base em trabalhos publicados na literatura e foi definido como volume de quebra 100 mL, pois oferecia uma recuperação adequada e um bom fator de concentração.

Após definições em relação ao método, dezesseis amostras aquosas provenientes de uma estação de tratamento de efluentes (ETE) domésticos situada na cidade de Porto Alegre foram analisadas quanto à presença dos analitos, e quantificadas. As amostras da ETE foram coletadas mensalmente, de janeiro a agosto de 2011, na entrada e na saída da planta.

Os oito antibióticos monitorados no estudo foram detectados e quantificados, em concentrações de $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} . Tendo em mãos os dados referentes à concentração dos antibióticos, buscou-se observar a degradação ou não dos analitos no decorrer da estação, através da comparação dos dados referentes à entrada e saída de um mesmo dia. Observou-se que as taxas de remoção variaram de 2,9 a 100%. É possível constatar que, na maioria dos casos, há uma diminuição substancial da concentração dos analitos, ainda que esta decomposição não seja completa.

ABSTRACT

The aim of this work is the development of a methodology for analysis of eight antimicrobials widely consumed for humane treatment in aqueous environmental samples and their detection and quantification in these matrices.

Studied analytes were Azithromycin (AZT), Erythromycin (ERT), Ciprofloxacin (CPF), Norfloxacin (NRF), Sulfamethoxazole (SMX), Trimethoprim (TRI), Tetracycline (TC) and Cephalexin (CFX). Tylosin (TIL), Sulfapyridine (SPY), Ceftiofur (CFT), Enrofloxacin (ENF) and Demeclocycline (DMC) were used as internal standard.

The measurements were performed using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), and method performance parameters such as recovery, linearity, working range, limit of detection, limit of quantification, accuracy, repeatability and reproducibility, robustness were evaluated and judged adequate.

Extraction procedure used was solid phase extraction (SPE), which retain the compounds of interest by eliminating interferences, and also is able to perform sample concentration. The procedure is extremely valuable in determining trace-level compounds. SPE procedure was optimized also based on published literature. Breakthrough volume was defined as 100 mL because it offered an adequate recovery and good concentration factor.

After definitions in terms of method, sixteen aqueous samples from a wastewater treatment plant (WWTP), located in Porto Alegre were analyzed for the presence of analytes and then quantified. Samples were collected from WWTP monthly from January to August 2011 at entrance and exit of the plant.

All eight antibiotics monitored in the study were detected and quantified, in concentrations of $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} . A comparison between antibiotics concentration in WWTP entrance and exit was performed to evaluate whether compounds were removed/degraded. It was observed that removal rates ranged from 2,9 to 100%. Decomposition of analytes was observed, through compounds concentration decrease, although it is also possible to prove that degradation is not complete.

1. INTRODUÇÃO

A qualidade da água é um assunto de grande interesse, tanto no que diz respeito à água potável e aos recursos naturais (rios, lagos, mares, águas subterrâneas), quanto aos sistemas de potencial contaminação das mesmas. Portanto, destaque especial deve ser dado aos efluentes urbanos e industriais, que são os principais responsáveis pelo comprometimento da qualidade dos recursos hídricos. Nos últimos tempos, os efluentes urbanos têm recebido atenção por representarem o grande aporte dos contaminantes emergentes (surfactantes, produtos de higiene pessoal e fármacos)¹⁻³. A respeito desses contaminantes, a determinação de fármacos tem sido especialmente importante, uma vez que os medicamentos de consumo humano e veterinário são continuamente liberados no ambiente, resultado dos processos de fabricação, descarte de produtos não utilizados ou expirados e resíduos excretados, tanto na forma inalterada do princípio ativo como de seus metabólitos. Esses resíduos são, geralmente, encontrados no ambiente em baixas concentrações, entretanto sabe-se que o aporte é constante e o consumo de fármacos, elevado⁴.

Os antibióticos estão entre os medicamentos mais utilizados na medicina humana e veterinária, e têm sido utilizados em grandes quantidades por várias décadas⁵. Em 2002, Wise⁶ estimou que o consumo mundial de antibióticos pudesse estar entre 100 000 e 200 000 toneladas por ano. O descarte inadequado de antibióticos é muito preocupante, devido ao potencial aumento de resistência dos microorganismos a esses fármacos. A crescente utilização de antibióticos na pecuária, avicultura e piscicultura, juntamente com o consumo na medicina humana (controlados ou não), durante as últimas cinco décadas, têm causado uma seleção genética de bactérias mais nocivas, devido a presença destes resíduos no meio ambiente⁴.

Do ponto de vista ambiental, os medicamentos, incluindo os antibióticos, constituem um novo grupo de substâncias químicas artificiais de interesse, pois chegam ao ambiente em concentrações tais que os efeitos na saúde são desconhecidos⁷. Em águas residuárias, que, segundo definição do Departamento Municipal de Água e Esgoto (DMAE) de Porto Alegre⁸, são os efluentes líquidos provenientes de serviços, indústrias e instalações residenciais, contendo sujeira e detritos, a presença de antibióticos tem aumentado nos últimos anos e sua redução se constitui um desafio⁹. Muitos estudos relatam a remoção apenas parcial dos fármacos nas condições de tratamento convencional aplicadas nas Estações de Tratamento de Efluentes (ETE), sugerindo que a atualização e implementação de processos avançados de

oxidação podem ser uma alternativa para melhorar ainda mais a qualidade dos efluentes tratados¹⁰, especialmente os antibióticos, que são biologicamente ativos¹¹.

Tendo esse panorama em vista, este trabalho pretende realizar levantamento pioneiro na região de Porto Alegre – RS, relacionado à presença de antibióticos em águas residuárias, tanto os de consumo humano como os de consumo veterinário.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar levantamento quanto à presença de antibióticos em águas residuárias da grande Porto Alegre – RS.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Implementar e validar metodologia analítica para determinação dos antibióticos mais consumidos pela população da região;
- b) Comparar diferentes metodologias de pré-concentração (EFS) quanto à capacidade de pré-concentração dos antibióticos em estudo;
- c) Avaliar a influência da matriz com relação à supressão iônica na técnica de CL-EM/EM;
- d) Analisar as amostras reais utilizando a metodologia validada;
- e) Avaliar a taxa de remoção dos antibióticos presentes nas amostras analisadas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CONTEXTUALIZAÇÃO

Durante muitos anos, em Química Analítica Ambiental o foco de estudo foi a determinação da presença dos contaminantes clássicos, como metais, agrotóxicos e intermediários industriais. Na última década, entretanto, o interesse nos chamados contaminantes emergentes aumentou consideravelmente. Produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais (PPCPs) estão inclusos nessa classe de contaminantes, que tem chamado atenção por ser liberada em quantidades pequenas, mas continuamente¹².

Apesar da designação “contaminantes emergentes”, esse grupo de compostos, que inclui produtos farmacêuticos, pesticidas, herbicidas, desreguladores endócrinos, percloratos, retardantes de chama bromados e produtos de cuidado pessoal, têm sido utilizado há décadas; portanto, sua presença na água não é recente.

O crescente uso de PPCPs é um assunto relevante na área de pesquisa ambiental atualmente¹³. Um grande número de PPCPs tem sido detectado em efluentes aquosos, recursos naturais, sedimentos e solos¹⁴. No caso específico de fármacos, após a administração uma parte significativa é excretada no efluente doméstico. Estudos demonstram que várias dessas substâncias parecem ser persistentes no meio ambiente, e não são completamente removidas nas Estações de Tratamento de Efluentes (ETEs¹⁵).

Dentre os fármacos, os antibióticos têm especial atenção, pois podem levar ao desenvolvimento de bactérias com genes de resistência, bem como ao desenvolvimento de respostas alérgicas em indivíduos sensíveis. A rota de entrada destes compostos no ambiente é bem variada e vai desde a excreção devido à utilização medicinal (tanto para os homens como para animais) e disposição inadequada de resíduos de medicamentos não utilizados ou com prazo de validade vencida. Os antibióticos são usados em larga escala para o tratamento de infecções, aumento da taxa de crescimento dos animais de fazendas de pecuária e pesca. Assim sendo, resíduos destes compostos, podem chegar ao solo, águas subterrâneas e superficiais, e até em sedimentos de origem marinha¹⁵.

Em relação ao uso humano, a principal via de entrada de fármacos no meio aquático é a excreção. Após a administração, os princípios ativos podem ser excretados, através de urina e fezes, como substância ativa inalterada ou na forma de metabólitos. Outras vias de exposição ambiental aos fármacos são os efluentes hospitalares, aplicações na terra (sólidos

biológicos, por exemplo) e disposição direta no ambiente (eliminação de produtos vencidos)¹⁰.

O Brasil pertence ao grupo dos maiores consumidores de fármacos do mundo, juntamente com países como Estados Unidos, França e Alemanha¹⁶. Em relação aos antibióticos, estima-se que, anualmente, algumas toneladas são produzidas e utilizadas em medicina humana e veterinária anualmente. O consumo desses compostos ao redor do mundo foi estimado, em 2002, em torno de 100 000 a 200 000 toneladas por ano⁶, apesar de não ser possível calcular esse valor com exatidão, uma vez que muitos países vendem esses medicamentos sem nenhum tipo de controle.

A Tabela 1 apresenta dados relacionados a presença de fármacos em amostras ambientais aquosas, que incluem efluentes domésticos, águas superficiais, em diferentes cidades de diferentes países.

Tabela 1. Concentração de antibióticos em amostras ambientais aquosas (ng L⁻¹) de diversos países. Levantamento realizado no Web of Science a partir de 2003.

Antibiótico	2007 – Montreal-Canadá, Efluentes domésticos ¹⁷	2007 – Espanha, efluente doméstico de 6 estações diferentes ¹⁸	2007 – Coréia do Sul, Efluentes domésticos e águas superficiais ³	2009 – Tudela, Pamplona e Terrassa, Espanha ¹⁹	2009 – Pequim, China, Efluentes e influentes domésticos e águas superficiais ²⁰	2010 – Colorado, EUA, Efluentes domésticos, águas superficiais e água potável ²¹	2010 – Coréia do Sul, Águas superficiais próximas a ETEs ³	2008 – Barcelona, Espanha, Águas superficiais, subterrâneas, efluentes domésticos e água mineral ²³
Azitromicina	80							
Ciprofloxacino	230	40 - 3353					0,1 – 1	
Claritromicina	230							
Claritromicina				27 – 47				
Cloranfenicol				1				
Clortetraciclina					ND		168 – 308	
Enrofloxacino							6	
Eritromicina		106 - 978	130 – 3,4			7 – 1200		
Josamicina				5 – 48				
Levofloxacino	71							
Lincomicina							20 – 64	
Ofloxacino	217 - 13425							
Oxitetraciclina					2,2 – 72,5		ND	
Sulfadiazina								ND – 2312
Sulfadimetoxina								0,164 – 182,4
Sulfametazina				1			12 – 25	ND – 6192
Sulfametoxazol	289		136 – 20			5 – 210	18 – 38	ND – 1488
Sulfametoxipiridazina								ND – 3704
Sulfametizol								ND – 48,5
Sulfapiridina								ND – 12000
Sulfasoxazol								ND – 2,8
Sulfatiazol							82 – 115	ND – 332
Tetraciclina					2,1 – 16,5			
Trimetoprima	101	99 - 1264	58 – 4	9 – 11		4 – 429	1 – 2	

Os valores de concentração foram colocados em forma de faixa, para quando houve mais de uma medição, e em valor absoluto, quando foi realizada análise em uma única amostra.

Embora a concentração de fármacos no meio ambiente seja baixa, seu aporte contínuo pode causar acúmulo em organismos terrestres e aquáticos em longo prazo. Por outro lado, pode-se supor que os compostos farmacêuticos são suscetíveis, em maior ou menor grau, à degradação através de ação dos microrganismos. O caso dos antibióticos é o mais claro, uma vez que eles são biologicamente ativos, tendo biodegradabilidade limitada e, conseqüentemente, não são eficientemente removidos nas ETEs¹¹. Isso justifica o fato de os antibióticos estarem entre os fármacos mais comumente detectados no ambiente aquático²⁴.

De acordo com os dados da literatura apresentados na Tabela 1, os contaminantes emergentes podem estar presentes nos ambientes aquáticos, em concentração de traços e ultra-traços (mg L^{-1} , $\mu\text{g L}^{-1}$, ng L^{-1}). Nestas condições, a identificação e quantificação destes compostos só se tornou possível graças à instrumentação mais sensível, como é o caso das técnicas cromatográficas acopladas a espectrometria de massas e com detectores específicos (p.ex. detector de fluorescência). Em especial, no caso de amostras aquosas, a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, tem sido uma técnica mais adequada pois as etapas de preparação de amostra podem ser reduzidas, por exemplo, na maioria dos casos não há necessidade de derivatização, permite determinação de analitos termolábeis, polares e não-voláteis, e também a detecção de analitos sem grupos cromóforos. Além disso, o acoplamento a um espectrômetro de massas fornece mais dados relacionados à amostra e aos analitos em estudo devido a informação do espectro de massas. Com relação à sensibilidade e seletividade, são significativamente melhores fazendo-se uso do modo de monitoramento de íons (MRM ou SRM, do inglês *Multiple Monitoring Reaction* ou *Selected Reaction Monitoring*)

3.1 ANTIBIÓTICOS DE USO HUMANO

Antibióticos são compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento (bacteriostáticos) ou causar a morte de bactérias (bactericidas)²⁵. Entre as décadas de 1940 – 1960, imensa quantidade de antibióticos foi produzida – β -lactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclina, macrolídeos, entre outros – e rapidamente incorporada às práticas clínicas, com um declínio na produção destes compostos nos anos posteriores²⁵.

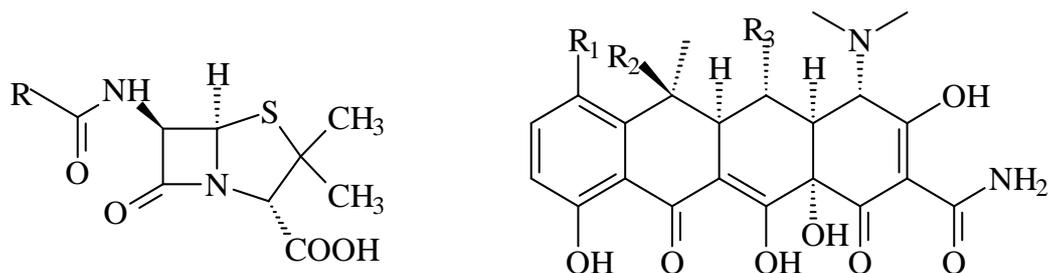


Figura 1. Estruturas básicas das penicilinas (β -lactâmicos) e das tetraciclínas

Entre 1960 e 1980, os produtos introduzidos no mercado foram basicamente semissintéticos, análogos estruturais de antibióticos já existentes. Já entre 1980 e 2000, apesar da busca de novos compostos através de genômica e triagem de coleções de compostos, houve uma redução drástica na identificação de novos antibióticos. Apenas as fluoroquinolonas sintéticas, alguns derivados de β -lactâmicos e da eritromicina foram introduzidos no mercado nesse período²⁵.

As definições – e diferenças – de antibiótico e antimicrobiano ainda causam certo debate. Em um conceito amplo, antimicrobiano é qualquer substância com atividade farmacológica de tipo bactericida e/ou bacteriostática. Quando da introdução das penicilinas, foi proposto o termo "antibiótico" para designar as substâncias com atividade bactericida e/ou bacteriostática que fossem obtidas a partir de outros seres vivos (no caso das penicilinas, a partir de fungos). Com o desenvolvimento dos antibióticos, iniciaram-se os processos de obtenção por semissíntese e até mesmo por síntese total. Não obstante, o conceito permaneceu em uso, considerando que os antibióticos, ao menos originalmente, foram descobertos e obtidos a partir de seres vivos. Sendo assim, por exemplo, as sulfonamidas, que foram obtidas a partir de corantes industriais de origem sintética, seriam antimicrobianos. Por outro lado, o cloranfenicol, isolado originalmente do *Streptomyces venezuelae*, mas hoje obtido por síntese total, segue sendo denominado como antibiótico²⁶.

Não existem muitos dados no Brasil a respeito dos antibióticos comercializados: quantidade, classes, finalidade. Os antibióticos selecionados para o presente trabalho são reconhecidamente muito utilizados e pertencem a classes amplamente consumidas.

3.2.1 Características dos compostos em estudo

3.2.1.1 Azitromicina

A azitromicina (AZT) é o primeiro antibiótico da classe denominada quimicamente como *azalídeos*. Os membros desta classe são derivados da classe dos macrolídeos, através da inserção de um átomo de nitrogênio no anel lactônico da eritromicina A.

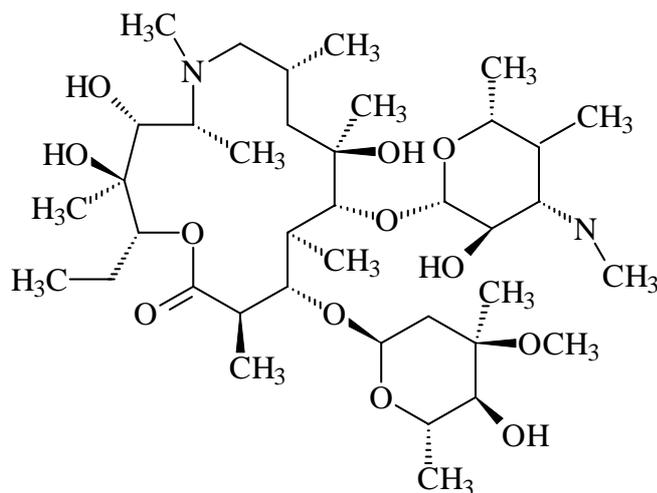


Figura 2. Estrutura molecular da azitromicina

A azitromicina (AZT) é um antibiótico macrolídeo, ácido estável, administrado por via oral. É ligeiramente menos ativa que a eritromicina *in vitro* contra microrganismo Gram-positivos, mas parece ser mais ativa do que a eritromicina contra muitos microrganismos Gram-negativos e vários outros agentes patogênicos. Como a eritromicina e outros macrolídeos, a atividade da azitromicina não é afetada pela produção de beta-lactamase²⁷, enzima produzida por algumas bactérias, que promove a quebra do anel beta-lactâmicos nos antibióticos dessa classe, causando a desativação da ação antimicrobiana da molécula.

3.2.1.2 Eritromicina

A eritromicina (ERT) é um antibiótico macrolídeo produzido por uma cepa de *Streptomyces erythreus*, um microorganismo que vive no solo. Consiste em dois açúcares, a desosamina e a cladinose, as quais estão ligadas ao eritronolídio, que é uma lactona macrocíclica. É mais ativa em pH 8,0 do que na neutralidade e é instável em meio ácido. A eritromicina é eficiente contra muitos microrganismos Gram-positivos. Útil no tratamento de

infecções estafilocócicas resistentes á terapêutica com a penicilina. É primariamente um agente bacteriostático, ou seja, que inibe o crescimento dos microrganismos²⁸.

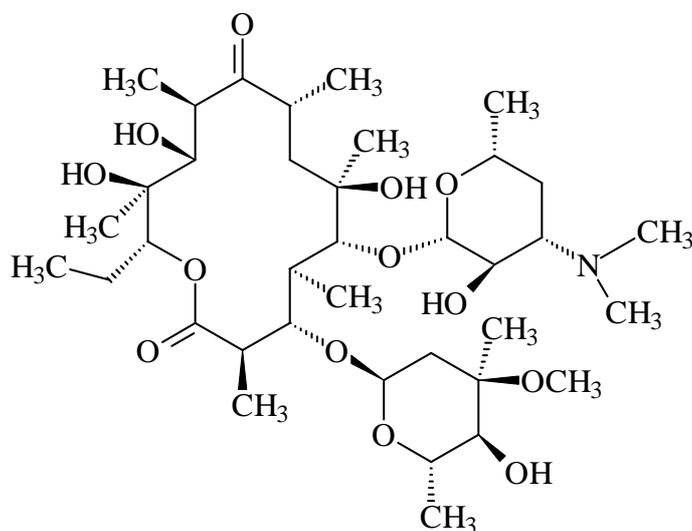


Figura 3. Estrutura molecular da eritromicina

3.2.1.3 Sulfametoxazol

O sulfametoxazol (SMX) pertence à classe de quimioterápicos denominados *sulfonamidas*, sendo sua estrutura molecular básica o p-aminobenzenossulfonamida (sulfanilamida). Utilizando o vermelho de prontosil em camundongos, Domagk, em 1932, descobriu a atividade bactericida do corante. Posteriormente, em 1936, descobriu-se que a sulfanilamida era a porção ativa da molécula de prontosil²⁹.

Esta descoberta estimulou intensas pesquisas para o desenvolvimento de novas sulfonamidas e muitas outras foram sintetizadas no final dos anos 30. Os melhores resultados terapêuticos foram obtidos com compostos onde um hidrogênio do grupo sulfonamida (-SO₂NH₂) era substituído por algum outro grupo, geralmente um anel heterocíclico²⁹.

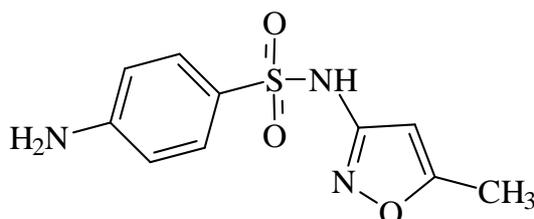


Figura 4. Estrutura molecular do sulfametoxazol

O sulfametoxazol é metabolizado de várias formas no corpo humano (N4-acetilação e hidroxilação), e é excretado via urina. Aproximadamente 50% da dose administrada PE excretada na forma do metabólito inativo N4-acetilsulfametoxazol e apenas 10% em outra forma. Porém, existem grandes evidências da retransformação do N4-acetilsulfametoxazol para sua forma ativa durante o processo biológico do tratamento de efluentes³⁰.

3.2.1.4 Trimetoprima

A trimetoprima (TRI) é um agente antibacteriano pertencente à família dos 2,4-diamino-5-pirimidina com baixa solubilidade em água. É um importante agente antibiótico utilizado no tratamento de várias infecções. Ele age inibindo o dihidrofolato redutase, tendo uma afinidade por essa enzima bacteriana até cem mil vezes maior do que pela enzima humana equivalente. Tem um tempo de meia vida de aproximadamente dez horas. A trimetoprima tem rápida e completa absorção na porção superior do trato gastrointestinal, sendo a excreção por secreção tubular renal, pela bile e urina.

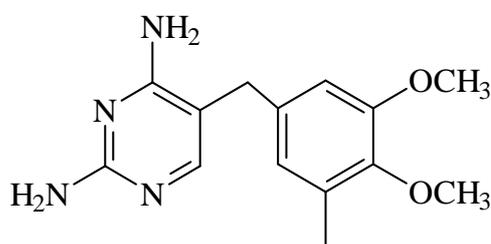


Figura 5. Estrutura molecular do trimetoprima

A trimetoprima (TRI) é comercializada no Brasil somente em associação com sulfonamidas: sulfadiazina e sulfametoxazol (SMX). A associação da trimetoprima com sulfametoxazol constitui importante avanço no desenvolvimento de fármacos antimicrobianos. É ativa contra a maioria das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, e alguns protozoários, e utilizada no tratamento de infecções do trato respiratório superior e inferior, urinário e renal³¹.

3.2.1.5 Cefalexina

A cefalexina (CFX) faz parte do grupo das cefalosporinas, agentes bacterianos semi-sintéticos, quimicamente relacionadas à penicilina. Elas contêm o anel beta-lactâmico como parte do núcleo. Uma porção do núcleo químico é obtida da cefalosporina ácido C,7-aminocefalosporânico, uma substância elaborada pelo fungo *Cephalosporium*. As cefalosporinas interferem com a síntese da parede celular pela inativação da transpeptidase. São eficientes contra a maioria dos cocos *Gram-positivos* e alguns microrganismos *Gram-negativos*²⁸.

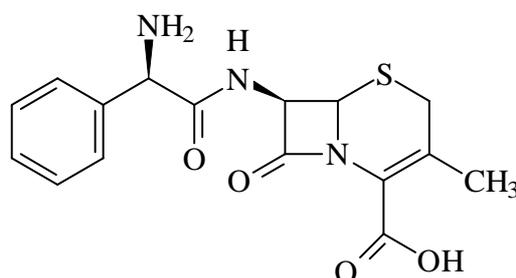


Figura 6. Estrutura molecular da cefalexina

3.2.1.6 Ciprofloxacino e Norfloxacino

Ciprofloxacino (CPF) e norfloxacino (NRF) fazem parte do grupo das fluoroquinolonas, grupo de substâncias químicas sintéticas com atividade antimicrobiana, com extensiva aplicação tanto na medicina humana como na veterinária, consideradas importantes armas no combate a organismos *Gram-negativos*, *Gram-positivos* e as últimas gerações são ativas até contra bactérias anaeróbias. Atualmente, é uma das maiores classes de agentes antimicrobianos utilizadas³².

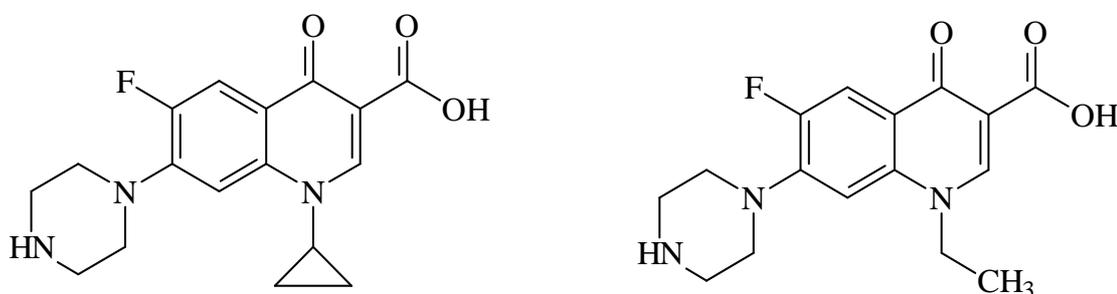


Figura 7. Estrutura molecular do ciprofloxacino e do norfloxacino, respectivamente

Quimicamente, as fluoroquinolonas diferem das quinolonas por possuírem a combinação de um átomo de flúor e um grupo piperazinil. Esta combinação levou a um maior espectro de ação, a um aumento da capacidade das quinolonas penetrarem na parede bacteriana levando, conseqüentemente, a uma melhor atividade contra bactérias Gram-negativas, passando a abranger algumas espécies Gram-positivas e atingiu um perfil farmacocinético melhor, chegando a ter uma atividade bacteriana mil vezes superior à observada pelo ácido nalidíxico, seu antecessor³².



Figura 8. Grupo piperazinil das fluoroquinolonas

A presença de um grupo ácido (grupo carboxílico) e de um grupo básico (amina terciária) atribui ao composto propriedades anfotéricas podendo, deste modo, existir mais do que uma espécie presente em solução, dependendo do pH, devido à protonação/desprotonação destes grupos influenciando, assim, o comportamento farmacológico destes compostos, uma vez que a presença de grupos carregados é necessária para a atividade biológica. Dependendo do pH em que se encontra o meio, as quinolonas podem existir sob as formas catiônica, aniônica, neutra ou de íon dipolar³².

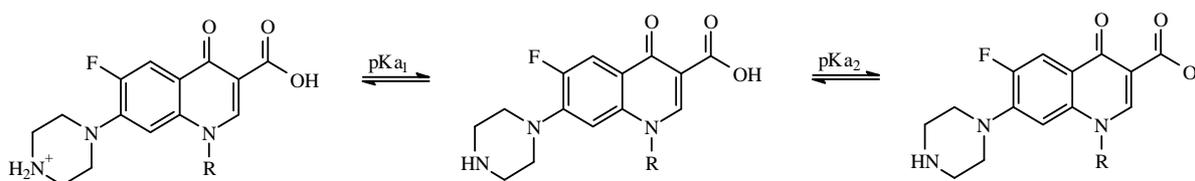


Figura 9. Fluoroquinolonas na forma protonada e desprotonada

O mecanismo de ação das fluoroquinolonas se dá através da interferência na síntese do DNA bacteriano, através da inibição de duas enzimas, responsáveis pelo controle do processo de divisão, reunião de novas cadeias e envelhecimento do novo DNA durante a replicação³².

3.2.1.7 Tetraciclina

A tetraciclina (TC) faz parte da classe homônima de antibióticos, produzidos por *Streptomyces*, que possuem um amplo espectro de ação, que vai de bactérias Gram-positivas a negativas. As tetraciclina são ativamente transportadas para dentro das células de bactérias suscetíveis e exercem efeito bacteriostático pela inibição da biossíntese protéica depois da ligação com a subpartícula ribossômica 30S³³.

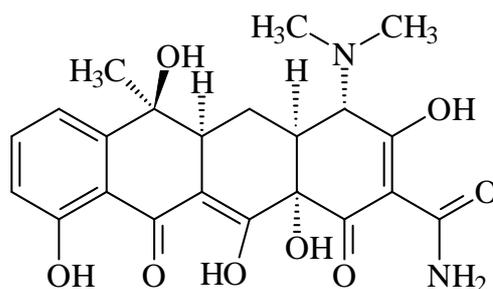


Figura 10. Estrutura molecular da tetraciclina

As tetraciclina são extensivamente usadas para o controle de infecções bacterianas tanto em humanos quanto em animais. Em adição ao seu uso terapêutico, essa classe tem sido usada como suplemento alimentar na pecuária. Esses compostos possuem múltiplos grupos funcionais com propriedades ácido-base. Muitas tetraciclina possuem características anfotéricas com ponto isoelétrico entre 4,0 e 6,0³⁴.

A tetraciclina sofre degradação a anidrotetraciclina (ATC) em meio ácido, com pH < 2,0. A tetraciclina e a anidrotetraciclina epimerizam à forma 4-epitetraciclina (ETC) e 4-epianidrotetraciclina (EATC), respectivamente, em pH entre 2,0 e 6,0³⁴.

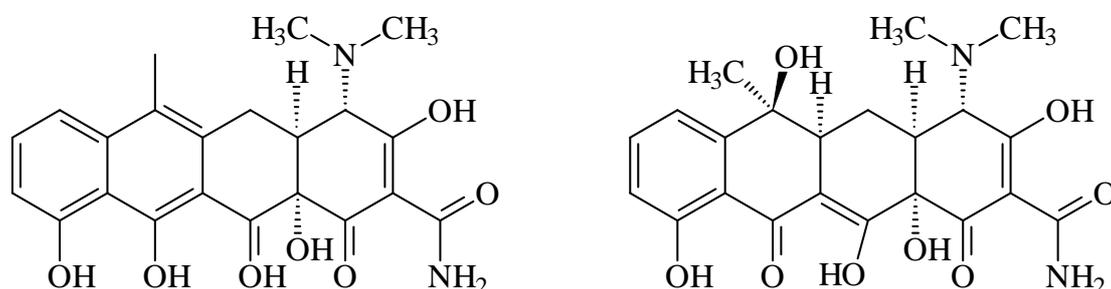


Figura 11. Estruturas da anidrotetraciclina e da 4-epitetraciclina, respectivamente

3.2.2 Resistência Bacteriana

A resposta de um microrganismo frente ao amplo uso de antibióticos e sua presença no meio ambiente é a resistência bacteriana. As bactérias são consideradas organismos de alta capacidade de adaptação a diversos fatores, como a exposição a agentes químicos potentes²⁵.

A resistência bacteriana está, atualmente, associada a diversos ambientes e pode atingir indivíduos saudáveis, diferentemente do que acontecia no século passado, quando ocorria predominantemente em ambientes hospitalares. O uso de terapias associadas é uma alternativa que pode ser adotada na tentativa de contornar o problema²⁵.

Algumas estratégias podem ser adotadas para evitar o desenvolvimento de resistência bacteriana: prevenção de infecções bacterianas com o uso de vacinas, uso racional de antibióticos, controle e prevenção da disseminação de microrganismos resistentes, descoberta e desenvolvimento de novos antibióticos. Além disso, a caracterização dos genes responsáveis pela resistência, assim como sua localização e diversidade são de grande importância para o entendimento dos fatores envolvidos na resistência²⁵.

3.3 AMOSTRAS AQUOSAS AMBIENTAIS - PREPARAÇÃO

Com a crescente tecnologia empregada nos equipamentos utilizados para a identificação e quantificação de analitos, que cada vez possuem menores limites de detecção e são capazes de ser específicos e sensíveis aos compostos de interesse em misturas complexas, o foco tem se voltado às metodologias para a preparação de amostras. Esta etapa do procedimento analítico ainda é o que pode demandar mais tempo, e é mais suscetível a erros. Um tratamento pobre de uma amostra ou um extrato mal preparado pode invalidar todo o ensaio, e mesmo o mais poderoso método instrumental não poderá fornecer um resultado válido³⁵.

O conceito básico de um método de preparação de amostras é converter uma matriz real em um extrato de formato adequado para a análise por uma técnica analítica. Isso pode ser alcançado através da remoção de potenciais interferentes da amostra, pelo aumento da concentração do analito, pela conversão do analito a uma forma mais adequada para a detecção ou separação, com o objetivo de alcançar um método robusto e reprodutível, que seja independente das variações da matriz³⁵.

Em relação às amostras ambientais aquosas, os principais desafios residem na complexidade da matriz e na baixa concentração dos compostos alvos. Devido a isso, um

procedimento de tratamento de amostras normalmente inclui várias etapas tais como, extração, pré-concentração e remoção de interferentes da matriz³⁶. De modo geral, um dos procedimentos mais utilizado para a preparação de amostras aquosas ambientais é a extração em fase sólida (EFS)³⁷⁻⁴¹, principalmente devido ao baixo consumo de solvente orgânico, altos fatores de concentração, disponibilidade de diversos tipos de adsorventes o que possibilita a aplicação para uma ampla gama de compostos, dentre outros.

3.3.1 Extração em Fase Sólida (EFS)

A técnica de EFS é amplamente utilizada para pré-concentração e remoção de interferentes da matriz de amostras aquosas. A EFS tem como princípio a retenção seletiva dos analitos presentes em uma amostra aquosa, em um adsorvente denominado de “fase sólida” (FS). A FS é colocada dentro de um cartucho que pode ser de teflon ou vidro, entre duas fritas que tem como função reter fisicamente as partículas da FS. Em função destas características químicas da FS, a retenção seletiva dos analitos de interesse poderá ocorrer. Quanto mais específico for o mecanismo de retenção da FS, tanto maior a seletividade e, portanto, maiores as chances de eliminar os interferentes. Portanto a EFS, além de ser o sistema de pré-concentração também poderá fazer às vezes de eliminação de interferentes da matriz.

Genericamente, as principais etapas de um procedimento de EFS são: condicionamento, percolação da amostra, remoção de interferentes, eluição dos analitos de interesse. A Figura 12 apresenta um esquema geral destas etapas.

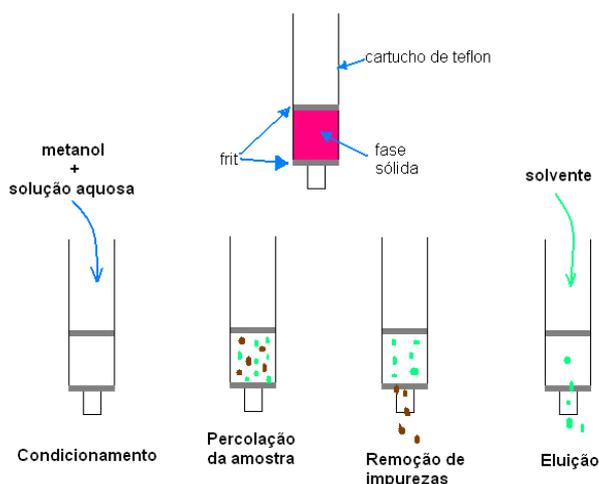


Figura 12. Esquema geral das etapas do procedimento de extração em fase sólida.

Na etapa de condicionamento, a FS é preparada para receber o analito. Para o condicionamento, diversos solventes e/ou mistura de solventes bem como soluções tampão, básicas ou ácidas, podem ser utilizadas. A escolha do melhor condicionante irá depender do mecanismo de retenção envolvido. A etapa de percolação é quando se passa a amostra pela FS de modo que os analitos de interesse fiquem retidos enquanto que os interferentes passem direto. A etapa de remoção de interferentes poderá existir ou não e dependerá da matriz e dos analitos e, por fim, tem-se a etapa de eluição dos analitos de interesse. Da mesma forma que na etapa de condicionamento, várias opções podem ser utilizadas, dependendo do mecanismo de retenção e conseqüentemente do mecanismo de dessorção utilizado para a pré-concentração dos analitos³⁵

O delineamento de um procedimento de EFS tem por objetivo definir as melhores condições no que diz respeito ao que poderá ser utilizado em cada etapa em termo de solvente e/ou mistura de solventes, bem como a FS mais adequada para um determinado conjunto de analitos de interesse sem deixar de lado a matriz. Por sua vez, a matriz desempenha um importante papel na EFS, pois a definição dos parâmetros mencionados poderá mudar de forma significativa dependendo da complexidade da mesma. Por exemplo, se o objetivo é determinar antibióticos em efluente urbano, não basta apenas definir as melhores condições para a pré-concentração deste analitos em água, mas a avaliação deverá ser estendida também para os analitos na matriz que serão efetivamente analisados. Um dos parâmetros que pode ser mais afetado é o volume de quebra (VQ). O VQ é definido como o volume máximo de amostra que pode ser processado com a melhor recuperação possível. Ao utilizarmos volumes superiores ao volume de quebra para dado sistema de EFS a perda da recuperação ocorre quando mesmo o fraco eluente aquoso efetivamente começa a eluir a amostra ou quando ocorre a sobrecarga do cartucho por outros componentes da amostra³⁵.

Resumindo, a sistematização de um procedimento de EFS, deve avaliar os seguintes parâmetros: (1) fase sólida; (2) solvente e volume de solvente para o condicionamento; (3) volume de quebra; (4) necessidade ou não da etapa de remoção de interferentes e solvente e (5) volume utilizado para a eluição. No caso do sistema utilizado para a eluição, a técnica instrumental que será posteriormente utilizada para analisar os analitos também deverá ser considerada.

Os sistemas de EFS que tem sido descritos na literatura para a pré-concentração de antibióticos em amostras aquosas, são apresentados na Tabela 2. Constata-se que a FS para os antibióticos é a OASIS HLB™. Esta fase sólida é constituída de material polimérico que

possui balanço hidrofílico-lipofílico, produzido a partir de uma proporção específica de dois monômeros, tornando-o mais adequado para a retenção de compostos com as duas características, que é ideal para análise de diferentes classes⁴²

Tabela 2. Condições para extração em fase sólida para pré-concentração de antibióticos em amostra aquosa. Artigos publicados nos últimos cinco anos.

Antibiótico	Fase Sólida	Condicionamento	Eluição	Ref
Ciprofloxacino	Oasis HLB	- 6 mL MeOH - 6 mL H ₃ PO ₄ 4,38 mmol L ⁻¹	10 mL MeOH:H ₃ PO ₄ 4,38 mmol L ⁻¹ (95:5), retomados em 1 mL MeOH:H ₃ PO ₄ 4,38 mmol L ⁻¹ (20:80)	43
Clortetraciclina	Oasis HLB	- 3 mL MeOH - 3 mL água	5 mL ácido acético glacial, água e ACN (20:780:200), evaporado a 1,5 mL, diluído em 5 mL ACN	44
Enrofloxacino	Oasis HLB	- 6 mL MeOH - 6 mL H ₃ PO ₄ 4,38 mmol L ⁻¹	10 mL MeOH:H ₃ PO ₄ 4,38 mmol L ⁻¹ (95:5), retomados em 1 mL MeOH:H ₃ PO ₄ 4,38 mmol L ⁻¹ (20:80)	43
Eritromicina	Oasis HLB	- 3 mL MeOH - 3 mL água	5 mL ácido acético glacial, água e ACN (20:780:200), evaporado a 1,5 mL, diluído em 5 mL ACN.	44
Norfloxacino	Oasis HLB	- 6 mL MeOH - 6 mL H ₃ PO ₄ 4,38 mmol L ⁻¹	10 mL MeOH:H ₃ PO ₄ 4,38 mmol L ⁻¹ (95:5), retomados em 1 mL MeOH:H ₃ PO ₄ 4,38 mmol L ⁻¹ (20:80)	43
Sulfametoxazol	Oasis HLB	3 mL MeOH 50 mmol L ⁻¹ HAc 3 mL acetona 50 mM HAc 3 mL água com 5% MeOH	6 mL MeOH 50mM AF + 6 mL acetona 50 mmol L ⁻¹ HAc, retomado em água:ACN (75:25)	23
		- 6 mL MeOH - 6 mL H ₃ PO ₄ 4,38 mmol L ⁻¹	10 mL MeOH:H ₃ PO ₄ 4,38 mmol L ⁻¹ (95:5), retomados em 1 mL MeOH:H ₃ PO ₄ 4,38 mmol L ⁻¹ (20:80)	43
Sulfapiridina	Oasis HLB	3 mL MeOH 50 mmol L ⁻¹ HAc 3 mL acetona 50 mmol L ⁻¹ HAc 3 mL água com 5% MeOH	6 mL MeOH 50 mmol L ⁻¹ AF + 6 mL acetona 50 mmol L ⁻¹ HAc, retomado em água:ACN (75:25)	23
		- 6 mL MeOH - 6 mL H ₃ PO ₄ 4,38 mmol L ⁻¹	10 mL MeOH:H ₃ PO ₄ 4,38 mM (95:5), retomados em 1 mL MeOH:H ₃ PO ₄ 4,38 mmol L ⁻¹ (20:80)	43
Tetraciclina	Oasis HLB	3 mL MeOH 3 mL água	5 mL ácido acético glacial, água e ACN (20:780:200), evaporado a 1,5 mL, diluído em 5 mL ACN.	44
Tilosina	Oasis HLB	3 mL MeOH 3 mL água	5 mL ácido acético glacial, água e ACN (20:780:200), evaporado a 1,5 mL, diluído em 5 mL ACN.	44
Trimetoprima	Oasis HLB	- 6 mL MeOH - 6 mL H ₃ PO ₄ 4,38 mmol L ⁻¹	10 mL MeOH:H ₃ PO ₄ 4,38 mmol L ⁻¹ (95:5), retomados em 1 mL MeOH:H ₃ PO ₄ 4,38 mmol L ⁻¹ (20:80)	43

3.2 CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS NO MODO TANDEM (CL-EM/EM)

A técnica de Cromatografia a líquido acoplada a espectrometria de massas no modo tandem (CL-EM/EM) tem sido a mais utilizada para a determinação de antibióticos em amostra aquosa ambiental⁴⁵. Outros sistemas utilizando cromatografia a líquido com detectores de fluorescência e de UV-Vis, também tem sido utilizados, em menor escala⁴⁵.

Um espectrômetro de massas é constituído por um sistema de ionização, um analisador e o detector, conforme apresentado na Figura 13.

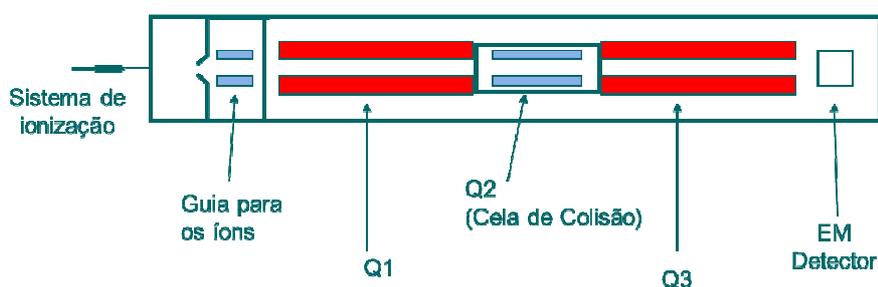


Figura 13. Diagrama de blocos representando um espectrômetro de massas e seus principais componentes.

O sistema de ionização tem a função de remover o solvente oriundo da fase móvel, ionizar os analitos de interesse e reduzir efeitos de matriz (isso é obtido devido aos diferentes desenhos e alternativas que cada fabricante possui, especialmente desenvolvidos para este fim). Dentre os principais sistemas de ionização pode-se citar spray eletrônico (EI, do inglês *electrospray* – neste trabalho será utilizada a palavra em inglês, pois se considera mais adequada); ionização química a pressão atmosférica (APCI, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) e foto spray (do inglês *Photospray*). Neste texto, será abordado apenas a ionização por *electrospray* (EI) que foi a utilizada no trabalho, pois vários textos na literatura podem ser consultados com relação às diferentes fontes de ionização.

Na EI, dois modos de ionização são possíveis: o modo positivo (o analito é carregado positivamente) e modo negativo (o analito é carregado negativamente). A definição por um ou outro dependerá principalmente da estrutura química dos analitos em estudo. Para o caso dos antibióticos objetos desse estudo, dados já publicados mostram que a ionização no modo positivo é a mais adequada. A Figura 14 apresenta o esquema da fonte de ionização por *electrospray*, do equipamento utilizado neste trabalho.

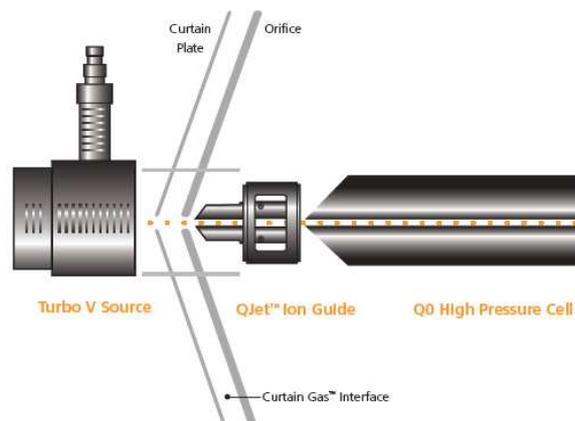


Figura 14. Representação esquemática da fonte de ionização por *eletrospray* do equipamento utilizado neste trabalho com a indicação de seus principais componentes.

A molécula, ionizada com uma carga positiva, é representada por $[M+H^+]$ a qual se refere ao íon molecular. A ionização também pode gerar espécies com carga diferentes da unitária. Esta situação é mais comum para moléculas com maior massa molecular não sendo objeto deste estudo e, portanto, este caso não será abordado.

As moléculas ionizadas e dessolvatadas passam para o analisador de massas. O analisador de massas mais antigo é o quadrupolo simples, o qual ainda hoje é muito utilizado. Atualmente, vários analisadores de massas podem ser encontrados nos equipamentos comerciais. Estes vão desde o sistema em tandem, que é o caso do EM/EM (também denominado de triplo quadrupolo que são dois quadrupolos em sequência com um hexapolo no meio), os sistemas híbridos como o Q-TRAP (em que são colocados em sequência um quadrupolo, um hexapolo e um *ion trap*) até os analisadores mais avançados como o ORBITRAP® Setor Magnético e outros. Estes analisadores permitem obter-se o espectro de massas dos compostos em estudo, sendo este dado utilizado tanto para elucidação estrutural, como para determinação de metabólitos, produtos de degradação e análise confirmatória⁴⁶.

Após o analisador de massas tem-se o detector que tem a função de recolher os dados enviados pelo analisador. Os detectores devem ser sistemas com resolução adequada para processar as informações recebidas. No caso dos espectrômetros de massas, os frequentemente utilizados são: eletromultiplicadores e fotomultiplicadores. No equipamento utilizado neste trabalho o detector é um eletromultiplicador.

O acoplamento da cromatografia a líquido a um espectrômetro de massas traz a grande vantagem de unir um sistema de separação indiscutivelmente robusto e eficiente com

um sistema que fornece o espectro de massas, possibilitando a identificação inequívoca dos analitos presentes na amostra (tempo de retenção e espectro de massas). Estas características têm feito da cromatografia a líquido acoplada a espectrometria de massas em modo tandem (CL-EM/EM) uma das escolhas mais frequentes para a identificação e quantificação de compostos orgânicos em amostras ambientais. A Figura 15 mostra um esquema de um equipamento de espectrometria de massas, um triplo quadrupolo em modo tandem com ionização por *eletrospray*.

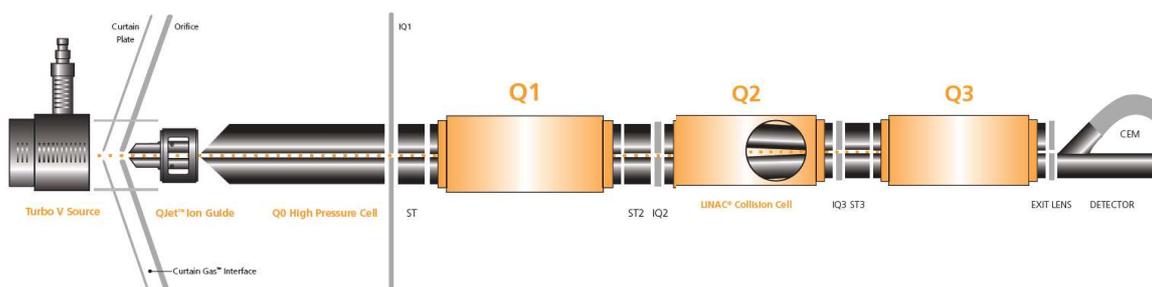


Figura 15. Esquema de equipamento de espectrometria de massas, do tipo triplo quadrupolo em modo tandem, com ionização por *eletrospray*.

O equipamento utilizado permite que os dados sejam adquiridos utilizando diversos modos de operação, a citar: Varredura no primeiro quadrupolo (do inglês *Q1 Scan*), Monitoramento de múltiplas reações (MRM, do inglês *Multiple Reaction Monitoring*), Espectro de varredura do íon produtor – “filhos” (do inglês, *Product Ion Scan*), Varredura do íon precursor – íon pai (do inglês, *Precursor Ion Scan*) e varredura de fragmentos neutros (do inglês, *Neutral Loss Scan*). A Figura 16 apresenta um resumo dos modos de trabalho que podem ser realizados no equipamento de cromatografia a líquido acoplado a espectrômetro de massas em tandem do tipo triplo quadrupolo.

No modo de varredura do íon produtor – “filhos” (do inglês, *Product Ion Scan*), os analitos de interesse (suas respectivas formas ionizadas) são selecionados no primeiro quadrupolo (Q1), enviados para a câmara de colisão, onde são fragmentados de acordo com valores de energia de colisão (CE, do inglês *Collision energy*), previamente estabelecidas e seguem para o terceiro quadrupolo (Q3). Neste, os fragmentos gerados são analisados em função da razão massa/carga que dará origem aos espectros de massas dos compostos selecionado em Q1.

No modo de varredura do íon precursor – íon pai (do inglês, *Precursor Ion Scan*), o objetivo é determinar quais compostos podem gerar, por fragmentação, determinados íons.

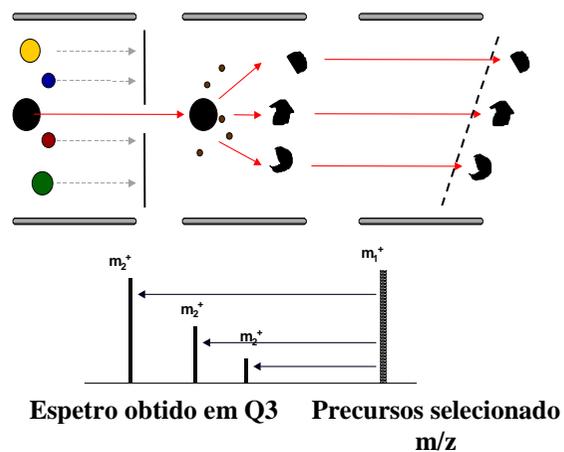
Para isso, selecionam-se os fragmentos de interesse e o sistema irá determinar a que compostos estes íons pertencem.

No modo de varredura de fragmentos neutros (do inglês, *Neutral Loss Scan*), o objetivo é verificar a perda de fragmentos neutros de um íon molecular após a sua fragmentação.

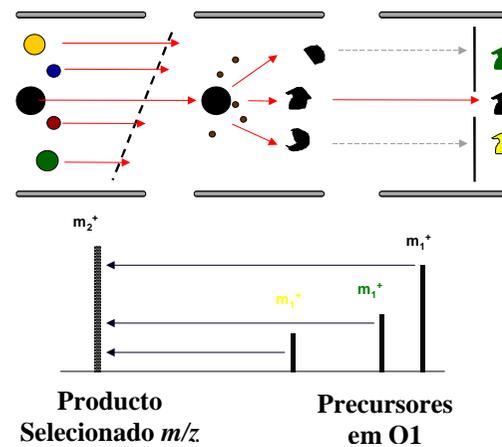
No modo de operação MRM (monitoramento de múltiplas reações), o íon molecular de interesse é selecionado em Q1, fragmentado na câmara de colisão resultando em um fragmento específico de massa que é selecionado em Q3. É utilizado para análise quantitativa em que dois íons são escolhidos, sendo que o mais intenso é utilizado para a quantificação (quantificador) e o outro é utilizado para confirmação do composto de origem (qualificador). Na prática, no primeiro quadrupolo (Q1) ocorre a separação dos íons moleculares selecionados, pela massa de sua forma protonada $[M+H^+]$. Na câmara de colisão (Q2) ocorre a fragmentação destes íons, com energia de colisão previamente estabelecida. No terceiro quadrupolo (Q3), os fragmentos originados são selecionados e chegam ao detector de massas, que neste caso é um eletro multiplicador, localizado ao final da sequência dos quadrupolos. A seleção dos parâmetros ótimos é descrita na seção seguinte, 3.2.1.

A leitura de cada um dos fragmentos oriundos de um íon molecular é realizada em um canal específico. A leitura de cada canal é realizada por um período de milissegundos (ms), um canal após o outro e reiniciando após o último, motivo pelo qual o modo de aquisição é chamado monitoramento múltiplo de reações³⁹.

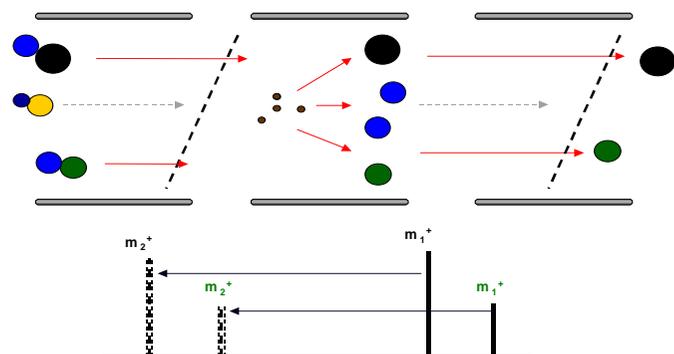
Espectro de varredura do ion produtor (Product Ion Scan “filhos”)



Varredura do ion precursor (Precursor ion scan)



Perda de Fragmento Neutro (Neutral Loss Scan)



Monitoramento de Múltiplas Reações (MRM)

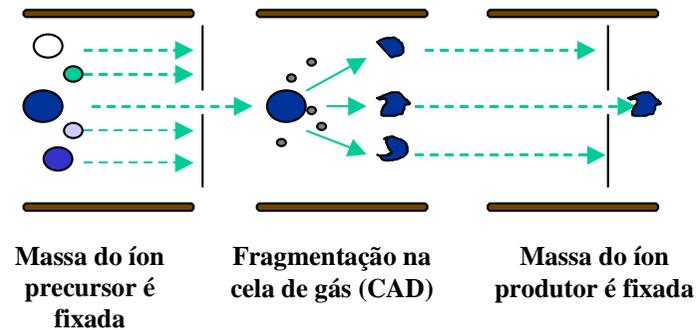


Figura 16. Representação esquemática dos quatro modos de trabalho do espectrômetro de massas tipo triplo quadrupolo.

A técnica de CL-EM/EM tem sido escolhida para a determinação de traços de analitos orgânicos, incluindo antibióticos, em amostras ambientais, por ser capaz de detectar a maior parte dos compostos orgânicos, ser suficientemente sensível (limites de detecção da ordem de ng L^{-1} e $\mu\text{g L}^{-1}$), específica e seletiva. Assim, a necessidade de dados de alta qualidade, em concentrações muito baixas explica o rápido crescimento da utilização desta técnica⁴⁷.

3.2.1 Desenvolvimento e otimização de metodologia analítica empregando CL-EM/EM

O desenvolvimento de uma metodologia por CL-EM/EM se dá através de três passos: otimização das melhores condições para a fragmentação do analito (realizado por infusão), otimização das condições da fonte de ionização (realizado por FIA – do inglês, *flow injection analysis*) e otimização das condições da cromatografia líquida, nesta ordem.

A primeira etapa, a infusão, é a entrada de solução contendo os analitos por fluxo contínuo, geralmente em concentração maior do que a de trabalho (entre 100 e 500 ng mL^{-1}), com fluxo variando entre 5 e $25 \mu\text{L min}^{-1}$, utilizando-se uma seringa conectada a um pistão. A infusão permite que seja obtida uma resposta imediata do sinal quando for realizada alguma alteração nos parâmetros de massas permitindo otimizar a ionização e fragmentação rapidamente. Estes parâmetros estão relacionados a parte do analisador de massas.

Os parâmetros otimizados são CAD (*CAD Gas*, que controla a pressão do gás de colisão durante o *Q3 scan* e *MS/MS scans*), DP (*Declustering Potential*, controla a voltagem no orifício de entrada do triplo quadrupolo), EP (*Entrance Potential*, controla o potencial de entrada dos analitos no *Q0*), CXP (*Collision Cell Exit Potential*, controla o potencial da saída da célula de colisão *Q2*), CE (*Collision Energy*, controla o potencial aplicado na célula de colisão *Q2*), entre outros⁴⁸.

A etapa seguinte é o FIA que tem por objetivo ajustar as condições de ionização do analito, de forma que a maior parcela possível de moléculas do analito seja convertida para a forma ionizada e entre no analisador. É necessária a utilização de uma bomba de cromatografia líquida e um amostrador automático. Uma pequena quantidade de solução padrão de analito é injetada pelo amostrador automático na corrente da cromatografia líquida sem a coluna. Múltiplas injeções da solução são realizadas durante o processo de otimização, com alteração dos parâmetros entre as injeções. Essa etapa ocorre na fonte de ionização do equipamento.

Os parâmetros otimizados nessa etapa são GS1 (*Gas 1*, controla o gás de nebulização, que ajuda na dessolvatação da amostras, restando apenas pequenas gotas), GS2 (*Gas 2*, controla o gás auxiliar, responsável pela evaporação das pequenas gotas restantes da amostra e por prevenir a entrada de solvente no equipamento), TEM (*Temperature*, temperatura do aquecedor, auxilia na evaporação do solvente), CUR (*Curtain Gas*, o gás com fluxo entre o *curtain plate* e o orifício de entrada para o triplo quadrupolo) e IS (*Ion Spray Voltage*, controla a voltagem aplicada à agulha que ioniza a amostra na fonte).

Após a otimização destes dois sistemas, as condições da separação cromatográfica são ajustadas. A definição dos parâmetros a serem utilizados para a separação cromatográfica é realizada através de pesquisa bibliográfica dos métodos existentes que utilizam a técnica para analisar os mesmos analitos e verificação da qualidade dos cromatogramas obtidos pela aplicação destes métodos.

Os fatores que devem ser considerados no desenvolvimento de um método de LC é o modo de ionização selecionado, a coluna analítica a ser utilizada (fase estacionária, diâmetro), a fase móvel utilizada, que pode afetar tanto a cromatografia como o processo de ionização, ou seja, a composição tem de garantir uma boa ionização e uma boa separação cromatográfica (pH, solventes, aditivos).

3.2.2 Avaliação do desempenho do método desenvolvido

Em análises químicas, a obtenção de resultados totalmente livres de erros e incertezas é muito difícil. Cada operação ou conjunto de operações deve ser realizado de modo adequado e correto para que os resultados gerados tenham validade. Isso permite que, ao final de uma análise química, os resultados possam atender, por exemplo, às exigências de órgãos reguladores nacionais e internacionais. Para garantir informações seguras e confiáveis realiza-se uma avaliação denominada validação de ensaio químico⁴⁹.

Por validação entendemos a comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou itens específicos foram atendidos. É fundamental que os laboratórios disponham de meios e critérios objetivos para demonstrar, através da validação, que os métodos de ensaio que executam conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida⁵⁰.

A validação de todo e qualquer método de análise consiste em realizar uma série de testes analíticos e estudos estatísticos, comparando resultados com critérios pré-estabelecidos⁴⁹. Segundo o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de 2010, a validação

de um método analítico deve incluir especificidade e seletividade, faixa de trabalho e faixa linear de trabalho, linearidade, sensibilidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e tendência, precisão, robustez e incerteza da medição⁵⁰.

3.4.2.1 Parâmetros de Validação de Metodologia Analítica

3.4.2.1.1 Especificidade e Seletividade

Além do analito que se pretende identificar e/ou quantificar em uma amostra, a matriz a ser analisada possui outros componentes que podem ter algum efeito na medição, mas que não se deseja quantificar. Um método específico produz resposta apenas para o analito, enquanto um método que é capaz de distinguir a resposta de um analito da de outros é chamado seletivo. Entretanto, os termos especificidade e seletividade são frequentemente utilizados indistintamente ou com diferentes interpretações⁵⁰.

O conhecimento e a definição das interferências direcionam as etapas seguintes do método analítico. Normalmente, é o primeiro passo a ser dado no desenvolvimento da metodologia, cuja avaliação pode ser realizada a partir de amostras em branco com e sem adição de analitos sendo medidas para o teste de interferentes. O resultado dessas medições deve ser tratado e avaliado em bases matemáticas⁴⁹.

3.4.2.1.2 Faixa de Trabalho e Faixa de Trabalho Linear

Para qualquer método quantitativo existe uma faixa de concentrações do analito ou valores da propriedade no qual o método pode ser aplicado. A faixa de trabalho para um método é limitada inferiormente pelos limites de detecção e quantificação do método e superiormente, pela resposta do equipamento de medição⁵⁰.

A faixa de trabalho linear de uma metodologia é o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito onde se demonstra a determinação com precisão, exatidão e linearidade exigidas. É a faixa de concentração onde a sensibilidade (resposta do equipamento) pode ser considerada constante⁵⁰.

A faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser utilizado deve estar dentro da faixa de trabalho. A concentração mais provável da amostra deve situar-se preferencialmente no centro da faixa de trabalho. O limite inferior do método deve ser obrigatoriamente maior que o limite de detecção e maior ou igual ao limite de quantificação. Etapas como diluição e

concentração devem ser cuidadosamente executadas a fim de evitar a introdução de erros sistemáticos⁵⁰.

3.4.2.1.3 Linearidade

Se uma metodologia de análise é capaz de produzir respostas diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, diz-se que ele possui linearidade⁵⁰.

A correlação linear entre o sinal medido e a concentração da espécie é expressa graficamente por meio da chamada curva analítica, onde a abscissa representa a concentração do analito e a ordenada apresenta o sinal do detector. Para a construção de uma curva analítica, sugere-se a utilização de, no mínimo, seis valores de concentração⁴⁹.

A relação matemática utilizada para o cálculo da concentração dos analitos pode ser obtida usando o modelo conhecido como regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados, representada na equação da reta abaixo:

$$y = ax + b$$

onde:

y = resposta medida (absorbância, altura ou área do pico, etc.);

x = concentração;

a = inclinação da curva de calibração – sensibilidade;

b = interseção com o eixo y, quando x = 0.

A linearidade pode ser observada pelo gráfico. Utiliza-se normalmente o coeficiente de correlação linear (r) para indicar se a reta obtida por ser considerada adequada. Um valor maior que 0,90 é usualmente requerido⁵⁰.

Pode-se obter a linearidade por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real⁵⁰.

3.4.2.1.4 Sensibilidade

A sensibilidade demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito. É determinada simultaneamente aos testes de linearidade. Depende da natureza do analito e da técnica de detecção utilizada⁵⁰.

3.4.2.1.5 Limite de Detecção

Em determinações de nível traço, é importante saber o menor valor de concentração do analito detectável no equipamento. Segundo a IUPAC, limite de detecção (LD) é o resultado único e simples que, associado a uma probabilidade, pode ser distinguido do valor de um branco adequado. Já para o INMETRO⁵⁰, é a concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95% ou 99% de confiança de que a concentração do analito é maior que zero. É determinado através de uma análise completa de uma dada matriz contendo o analito. Em cromatografia, normalmente se utiliza o ruído da linha de base para obter o LD, considerando-se que a razão sinal/ruído deve ser 3:1⁴⁹.

3.4.2.1.6 Limite de Quantificação

O limite de quantificação é a menor concentração de analito capaz de ser determinada com um nível aceitável de precisão e veracidade⁵⁰. Pode ser determinado da mesma maneira que o LD, entretanto com uma razão sinal/ruído de 10:1⁴⁹. Na prática, corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco)⁵⁰.

3.4.2.1.7 Exatidão e Tendência

A exatidão é a concordância entre o resultado encontrado e o valor de referência aceito como verdadeiro. Quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, implica numa combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos (tendência)⁵⁰.

Existem várias maneiras de se avaliar a exatidão de um método analítico; através da utilização de material de referência certificados que, quando disponíveis, são preferidos por exibirem relação direta com os padrões internacionais; comparação entre métodos analíticos, para avaliar o grau de proximidade dos resultados obtidos entre dois métodos, e a avaliação pode ser intra e interlaboratoriais⁴⁹.

3.4.2.1.8 Precisão

Precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. As duas formas mais comuns de expressá-la são por meio da repetitividade e a reprodutibilidade, sendo usualmente expressa pelo desvio padrão⁵⁰.

A repetitividade é a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo analito, efetuadas sob as mesmas condições (procedimento, analista, equipamento, local, em um curto espaço de tempo)⁵⁰.

Já a reprodutibilidade é o grau de concordância de um mensurando sob diferentes condições de análise. Pode-se variar laboratório, operadores, equipamento. É interessante a verificação da reprodutibilidade de um método através de comparação interlaboratorial⁵⁰.

3.4.2.1.9 Robustez

A robustez é a capacidade de um método se manter inalterado frente a pequenas variações. O teste de *Youden* é o mais utilizado para determinar se uma metodologia analítica é robusta⁵⁰.

3.4.2.1.10 Incerteza da Medição

Estudos de validação geram dados que devem comprovar o desempenho adequado do método, além dos fatores que individualmente influenciam as possíveis variações a que o método é suscetível. Esses dados podem ser tratados de forma a gerarem uma estimativa da incerteza associada ao método, quando esse se encontra em rotina⁵⁰.

3.4.3 Análise de Resíduos de Fármacos na Literatura: Publicações

O desenvolvimento de técnicas analíticas capazes de detectar substâncias orgânicas em níveis de concentração cada vez mais baixos aumentou o interesse na determinação de fármacos, de uma maneira geral, em amostras aquosas ambientais. Este crescimento tem sido significativo e pode ser observado em função do número de publicações cada vez maior com relação a esse assunto. A Figura 17 apresenta o resultado de publicações na base de dados *Scopus* para os últimos dez anos cruzando as palavras-chave *pharmaceutical x water x LC-MS/MS*.

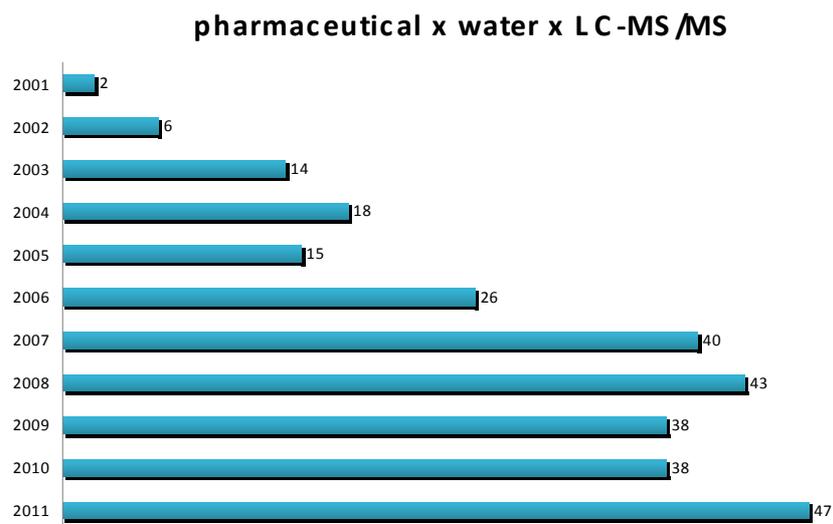


Figura 17. Publicações referentes às palavras-chave *pharmaceutical x water x LC-MS/MS* dos últimos dez anos, pela base de dados *Scopus*.

*A busca por artigos que resultou no gráfico acima foi realizada no site *www.scopus.com*, no dia 26 de setembro de 2011.

Dentro do grupo dos fármacos, o número de artigos que retratam o estudo de resíduos de antibióticos também é grande e crescente, como pode ser visto na Figura 18, que apresenta um gráfico das publicações dos últimos seis anos, obtido através do cruzamento das palavras-chave *antibiotics x water x LC-MS/MS*, utilizando a mesma base de dados.

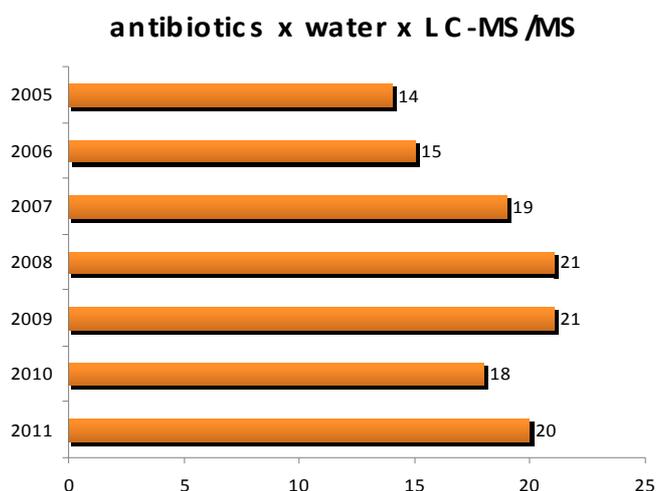


Figura 18. Publicações referentes às palavras-chave *antibiotics x water x LC-MS/MS* dos últimos seis anos.

*A busca por artigos que resultou no gráfico acima foi realizada no site *www.scopus.com*, no dia 26 de setembro de 2011.

Ainda, buscou-se pelas publicações referentes ao assunto principal do trabalho, que é a ocorrência de fármacos em águas. A Tabela 3 traz um apanhado de trabalhos publicados em 2011 relacionadas à detecção e quantificação de PPCPs em amostras aquosas ambientais. Como é possível perceber, a grande maioria apresenta antibióticos no seu conjunto de analitos e utiliza a técnica analítica de CL-EM/EM.

Tabela 3. Trabalhos publicados em 2011 relativos a métodos analíticos para detecção e quantificação de PPCPs em amostras aquosas ambientais

Compostos	Matriz	Equipamento utilizado	Ano	País	Referência
12 antibióticos	Águas superficiais	CL-EM/EM	2011	China	51
51 fármacos e hormônios	Águas superficiais e água potável	CL-EM/EM	2011	França	52
10 antibióticos	Efluentes de fazenda e águas superficiais	CL-EM/EM	2011	China	53
17 antibióticos	Águas superficiais	CL-EM/EM	2011	China	54
47 fármacos (26 antibióticos)	Efluente urbano e águas superficiais	CLUE-EM/EM	2011	Espanha	55
29 fármacos e 12 drogas de abuso	Água potável	CLUE-EM/EM	2011	Espanha	56
6 antibióticos	Água potável e água de piscicultura	CLAE-DF	2011	Espanha	57
21 antibióticos	Águas superficiais	CLUE-EM/EM	2011	China	58
20 PPCPs	Efluentes urbanos	CL-EM/EM	2011	Coreia	59
4 antibióticos	Efluentes urbanos (influentes e efluente) e águas de recebimento	CLAE-DF	2011	China	60
48 fármacos e hormônios	Água potável – afluentes e efluente de ETA	CL-EM/EM	2011	Canadá	61

3.5 TRATAMENTO DE EFLUENTES URBANOS

De um modo geral, no Brasil, em torno de 20% do efluente doméstico passa por uma ETE⁶². Em Porto Alegre este percentual é menor, sendo que a meta para 2015 é de que 70% do efluente urbano esteja totalmente canalizado e boa parte seja tratado⁸. Estes dados mostram a grande importância deste assunto, principalmente se compararmos com o cenário mundial, em que no caso da maioria dos países desenvolvidos, o tratamento de águas residuárias chega a 100%.

Em termos de processos utilizados para tratamento de águas residuárias estes são bastante conhecidos e amplamente descritos na literatura. Na Tabela 5, estes processos são apresentados de forma resumida, pois o escopo deste trabalho não está centrado na abordagem dos mesmos, mas apenas na utilização das amostras geradas por eles.

As amostras utilizadas para a realização deste trabalho foram fornecidas por uma ETE da cidade de Porto Alegre – RS que utiliza o processo de tratamento de lodos ativados convencional sem decantação primária, compreendendo tanques com aeração por ar difuso, recirculação de lodo, decantadores secundários, adensamento do equalizado através de centrífugas, tratamento de lodo por digestão anaeróbia e desidratação através de centrífugas⁸. Sua vazão média observada é de 246,0 L s⁻¹. A Tabela 4 apresenta as características do afluente e efluente da ETE, com o respectivo percentual de remoção (média obtida ao longo do período de 4 anos, em coletas realizadas com frequência mensal).

Tabela 4. Características das águas residuárias na ETE do estudo

Características	Afluente	Efluente	% remoção na ETE
pH	7,0	6,6	-
DBO ₅ (mg O ₂ L ⁻¹)	203,8	31,5	84,54
Sólidos Suspensos Totais a 105°C (mg L ⁻¹)	212,5	67,6	68,19

Tabela 5. Níveis de tratamento, descrição e exemplos de processos utilizados para o tratamento de águas residuárias

Nível do Tratamento	Descrição ⁶³	Exemplos de Processos ^{63, 64}
Tratamento preliminar	Remoção de sólidos grosseiros, constituintes do efluente como trapos, pedaços de madeira, graxa e outros materiais flutuantes, que podem causar problemas operacionais e de manutenção. Realizado com filtros resistentes colocados na entrada da ETE.	Gradeamento, sedimentação, peneiramento, separação água-óleo.
Tratamento primário	Remoção através de operação física, geralmente sedimentação, de uma porção dos sólidos em suspensão e matéria orgânica.	Filtração, flotação, separação de partículas discretas, precipitação química, clarificação de efluentes.
Tratamento primário avançado	Remoção aprimorada de sólidos suspensos e matéria orgânica do efluente. Tipicamente, compostos químicos são adicionados ou é realizada filtração.	Lodos ativados convencionais e suas variantes: aeração prolongada, lagoas aeradas facultativas; processos anaeróbios, como lagoas e biodigestores anaeróbios.
Tratamento secundário	Remoção de matéria orgânica biodegradável (suspensa e em solução) e sólidos suspensos, através de processos biológicos e químicos. Desinfecção também está incluída na definição de tratamento secundário convencional.	Radiação ultravioleta, cloração, ozonação,
Tratamento terciário	Remoção de sólidos suspensos residuais (que restaram depois do tratamento secundário), usualmente por filtração granular média ou <i>microscreens</i> (filtros mecânicos com tamanho de poro de 10 – 100 µm). Desinfecção e remoção de nutrientes restantes também fazem parte desta etapa.	Osrose reversa
Tratamento avançado	Remoção de materiais sólidos e dissolvidos remanescentes depois do tratamento biológico normal quando necessário para várias aplicações de reutilização da água.	

O processo secundário utilizado é o de lodo ativado, com frequência empregado no tratamento biológico de águas residuárias domésticas e industriais⁶³. A primeira referência que se tem do estudo desse processo remonta ao início dos anos 1880, quando a pesquisa de efluentes em tanques e o aceleração da oxidação da matéria orgânica nessa condição foram investigados por Angus Smith⁶³.

Este processo de tratamento por lodo ativado consiste, por definição, dos seguintes componentes: um reator no qual os microrganismos responsáveis pelo tratamento são mantidos suspensos e aerados; separação sólido-líquido, geralmente por sedimentação, em um tanque, e reciclagem do sistema pelo retorno dos sólidos removidos na sedimentação ao reator⁶³. Existem numerosas configurações possíveis para esses três componentes.

Geralmente, lodos ativados são usados conjuntamente com tratamentos preliminares e primários, tanto físicos quanto químicos, e pós-tratamento, como desinfecção. Historicamente, a maioria das plantas de lodos ativados possui um tanque de sedimentação anterior ao tanque de aeração⁶³, o que não é observado no caso da ETE em estudo. Em locais que possuem períodos de clima quente, podem ocorrer problemas com odores no caso da utilização deste pré-tanque⁶³. Esse fator, juntamente com disponibilidade de espaço físico, possivelmente justifica a supressão desta etapa.

3.5.1 Publicações relacionadas à degradação de antibióticos em efluentes urbanos

Muitos trabalhos vêm sendo publicados com foco na quantificação de resíduos de fármacos, principalmente antibióticos, e no decréscimo de concentração que apresentam depois de processos de tratamento de efluentes.

Alguns dados da literatura são apresentados na Tabela 6. As faixas de concentração dizem respeito exclusivamente aos antibióticos encontrados nos trabalhos, bem como a taxa de remoção se referem a esses resíduos.

Tabela 6. Dados da literatura sobre a incidência e eficiência de remoção de antibióticos em águas residuárias

Analitos	Matriz	Tratamento	Concentração (ng L ⁻¹)	Eficiência de Remoção (%)	País	Referência
18 antibióticos	Efluente urbano, hospitalar e de fazenda	Primário e secundário	<LQ – 4240	1 – 100	China	65
73 fármacos (25 antibióticos)	Efluentes urbanos e águas receptoras	Primário e secundário	4 – 46	20 – 99	Espanha	10
16 fármacos (2 antibióticos)	Efluentes urbanos e amostras de sedimentos	Primário, secundário e digerido	<LQ	–	Espanha	39
21 antibióticos	Efluentes urbanos	NC	2,1 – 720	17,1 – 100	China	66
13 fármacos (3 antibióticos)	Efluentes urbanos	Primário e secundário	2,2 – 6600	12 – 100	China	38
29 fármacos (5 antibióticos)	Efluentes urbanos e águas superficiais	NC	<LQ – 4220	34 – 75	Espanha / Croácia	40
11 fármacos (6 antibióticos)	Efluentes urbanos e águas superficiais	NC	<LQ – 3080	29 – 75	Luxemburgo	67
13 antibióticos	Efluentes urbanos e águas superficiais	NC	10 – 2000	68 – 80	Alemanha	68
31 fármacos (3 antibióticos)	Efluentes urbanos	Tratamento convencional (lodo ativado), comparado a osmose reversa	90 – 425	29 – 57	Espanha	69

26 compostos (3 antibióticos)	Efluentes urbanos, águas superficiais e potável	Biorreator de membrana seguido de filtração por membranas combinada com radiação UV	3,4 – 136	9 – 17%	Coreia do Sul	3
40 fármacos (1 antibiótico)	Efluentes urbanos e hospitalares	NC	12 – 20	40%	Noruega	70
19 antibióticos	Efluentes urbanos	NC	<LQ - 855	>0 – 84,4%	Espanha	71
58 compostos (7 antibióticos)	Efluentes urbanos	NC	271 - 13426	0 – 64%	Espanha	18
13 fármacos (1 antibiótico)	Efluente urbano	Filtração e lodo ativado	271-322	0	Reino Unido	72
4 antibióticos	Efluente urbano	NC	29,6 – 667,1	52,69 – 84,52%	Portugal	73
28 antibióticos	Efluente hospitalar e urbano	Processos convencionais	<LQ - 64000	< 80%	Austrália	74
11 fármacos (6 antibióticos)	Efluente	Lodo ativado seguido de nanofiltração e osmose reversa	500 – 1500	> 99%	Israel	75

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Solventes

Os solventes utilizados nos procedimentos de limpeza dos materiais foram acetona comercial e etanol comercial.

Os solventes utilizados no método analítico para análise dos antibióticos foram água ultrapura (Milli-Q) com resistividade controlada em 18,2 M Ω cm, metanol (JT BAKER, grau de pureza 99,9%), acetona PAR (Vetec, grau de pureza 99,8%) e acetonitrila grau LC Mass Spec (Tedia, grau de pureza 99,9%). Todos solventes utilizados têm grau de pureza adequado para análise de resíduo.

4.1.2 Reagentes

Os reagentes utilizados no estudo dos antibióticos foram ácido fórmico PA (Sigma-Aldrich, grau de pureza \geq 88,0%), ácido acético glacial (JT Baker, grau de pureza 99,8%) e formaldeído (Merck, puríssimo) com grau de pureza para análise.

Para a extração em fase sólida foram utilizados cartuchos OASIS HLB® (Waters, Milliford, USA) contendo 200 mg de fase sólida com capacidade de 6 mL.

4.1.3 Padrões

Os padrões dos antibióticos utilizados no desenvolvimento do trabalho foram: eritromicina A diidratada, marca Fluka Analytical, lote 8057X, grau de pureza 95,5%; ciprofloxacino, marca Fluka Analytical, lote SZE8287X, grau de pureza 99,9%; norfloxacino, marca Fluka Analytical, lote 079K1159, grau de pureza 99,0%; sulfametoxazol, marca Fluka Analytical, lote 7131X, grau de pureza 99,9%; cefalexina, marca Sigma-Aldrich, lote SZE8168X, grau de pureza 99,8%; trimetoprima, marca Fluka Analytical, lote SZE7271X, grau de pureza 99,1%; cloridrato de tetraciclina, marca Fluka Analytical, lote SZE7303X, grau de pureza 97,7%; azitromicina diidratada, marca Sigma-Aldrich, lote 020M47031, grau de pureza 99,0%; enrofloxacino, marca Fluka Analytical, lote SZE8287, grau de pureza 99,1%; tartarato de tilosina, marca Fluka Analytical, lote SZBA105XV, grau de pureza

84,6%; ceftiofur, marca Fluka Analytical, lote SZBA174X, grau de pureza 97,7%, sulfapiridina, marca Fluka Analytical, lote 6338X, grau de pureza 99,7%; cloridrato de demeclociclina hemiidratada, marca Fluka Analytical, lote 6129X, grau de pureza 93,7%. Todos os padrões foram conservados em recipiente fechado, ao abrigo da luz, calor e umidade (dessecador).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Limpeza dos Materiais de Laboratório

A limpeza dos materiais utilizados é de extrema importância para qualquer tipo de análise, mas constitui etapa crítica na análise de compostos em nível de traço, uma vez que a quantidade de analito é muito pequena e, portanto, qualquer contaminação interfere na análise, podendo até mesmo mascarar o composto de interesse.

Toda a vidraria e materiais comuns de laboratório foram lavados com detergente neutro diluído comercial e enxaguados com água destilada em abundância, enxaguado novamente com água ultrapura e por último com acetona comercial. A vidraria não volumétrica é levada ao forno a 300°C por duas horas e após, depois de fria, é embalada com papel alumínio. O material volumétrico, após o enxágüe com acetona comercial e evaporação da mesma à temperatura ambiente, é feito um enxágüe com hexano p.a. e após estar completamente seco é embalado com papel alumínio.

4.2.2 Preparação das soluções padrão estoque e de trabalho

A preparação das soluções estoque, foi feita pela pesagem de aproximadamente 10 mg (0,0100g) do padrão de cada analito (ou padrão interno), separadamente, que foram transferidos para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi ajustado com solvente adequado para cada analito (concentração final de 1 mg mL^{-1}).

A partir da solução estoque de cada analito (ou padrão interno), as soluções de trabalho foram adequadamente diluídas (chamada *solução mista* ou *mix*). As soluções de trabalho foram obtidas pela diluição adequada solução estoque de cada composto, em acetonitrila : água (90:10).

4.2.3 Preparação da fase móvel

A fase móvel utilizada foi preparada diariamente com acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico e água ultrapura com 0,1% de ácido fórmico.

4.2.4 Otimização dos parâmetros para análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em modo tandem (CL-EM/EM)

A otimização dos parâmetros de espectrometria de massas dos analitos foi realizada, inicialmente, pela infusão direta de solução dos analitos, na concentração de 100 a 200 ng mL⁻¹ através de seringa conectada a um pistão, com fluxo de 10 uL min⁻¹.

Após a otimização destes parâmetros, o cromatógrafo a líquido foi conectado ao espectrômetro de massas sem a coluna e foi realizado o FIA onde foram otimizados os parâmetros relativos à fonte de ionização.

Uma vez que a detecção dos analitos é possível após a otimização dos parâmetros relacionados à espectrometria de massas, foi realizada a otimização da separação por cromatografia líquida. A coluna analítica utilizada para o desenvolvimento do trabalho foi ZORBAX Eclipse XDB-C18 (150 mm × 4,6 mm, 5 µm) de fase reversa, com dupla reação de capeamento, que consiste na desativação de grupos silanóis residuais pela reação com trimetilmtoxissilano ou similar. Diferentes gradientes da fase móvel foram utilizados para a separação dos compostos.

4.2.5 Estabilidade das soluções em solvente dos antibióticos

A estabilidade dos antibióticos em solvente foi avaliada através da preparação de soluções mistas na concentração de 100 µg L⁻¹ durante 30 dias de maneira regular, durante 4 meses, e análise, ao final, de todas as soluções concomitantemente. Dessa forma, a primeira solução preparada, no primeiro dia, equivaleria ao último dia do teste de estabilidade. O objetivo da análise ao final do período é evitar possíveis variações relativas ao detector, e avaliar somente a perda referente ao período de estocagem.

A estabilidade dos padrões internos não foi avaliada, pois as soluções destes eram preparadas no momento da utilização.

4.2.6 Avaliação do efeito de matriz

A avaliação do efeito da matriz sobre a resposta de cada analito no CL-EM/EM foi determinada pela comparação das inclinações das curvas analíticas em fase móvel e na matriz. Para ter uma matriz em condições de ser utilizada para este procedimento, utilizou-se o percolado da EFS do efluente da saída.

4.2.7 Determinação da supressão iônica no CL-EM/EM com ionização por *eletrospray*

A determinação da supressão iônica foi realizada através da infusão pós-coluna de uma solução mista dos analitos em solvente, com injeção de um solvente puro e de uma amostra da matriz através da coluna cromatográfica, simulando uma análise normal e observando-se o efeito dos interferentes da matriz no sinal do analito⁷⁸.

4.2.8 Extração em fase sólida (EFS)

A fim de verificar qual seriam as melhores condições para a EFS, foram realizados experimentos com dados já publicados dos analitos de interesse. Os procedimentos selecionados estão apresentados na Figura 19.

Utilizou-se 100 mL de uma solução aquosa contendo $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito. A amostra foi percolada, numa vazão de 5 mL min^{-1} , e a fase sólida foi mantida sob vácuo por 5 minutos. A seguir foi feita a eluição e novamente o sistema ficou sob vácuo por mais 5 minutos, a fim de remover todo o solvente da fase sólida. As amostras foram evaporadas a secura a aproximadamente $40 \text{ }^\circ\text{C}$ e reconstituídas em 1 mL de fase móvel (acetonitrila:água, 90:10).

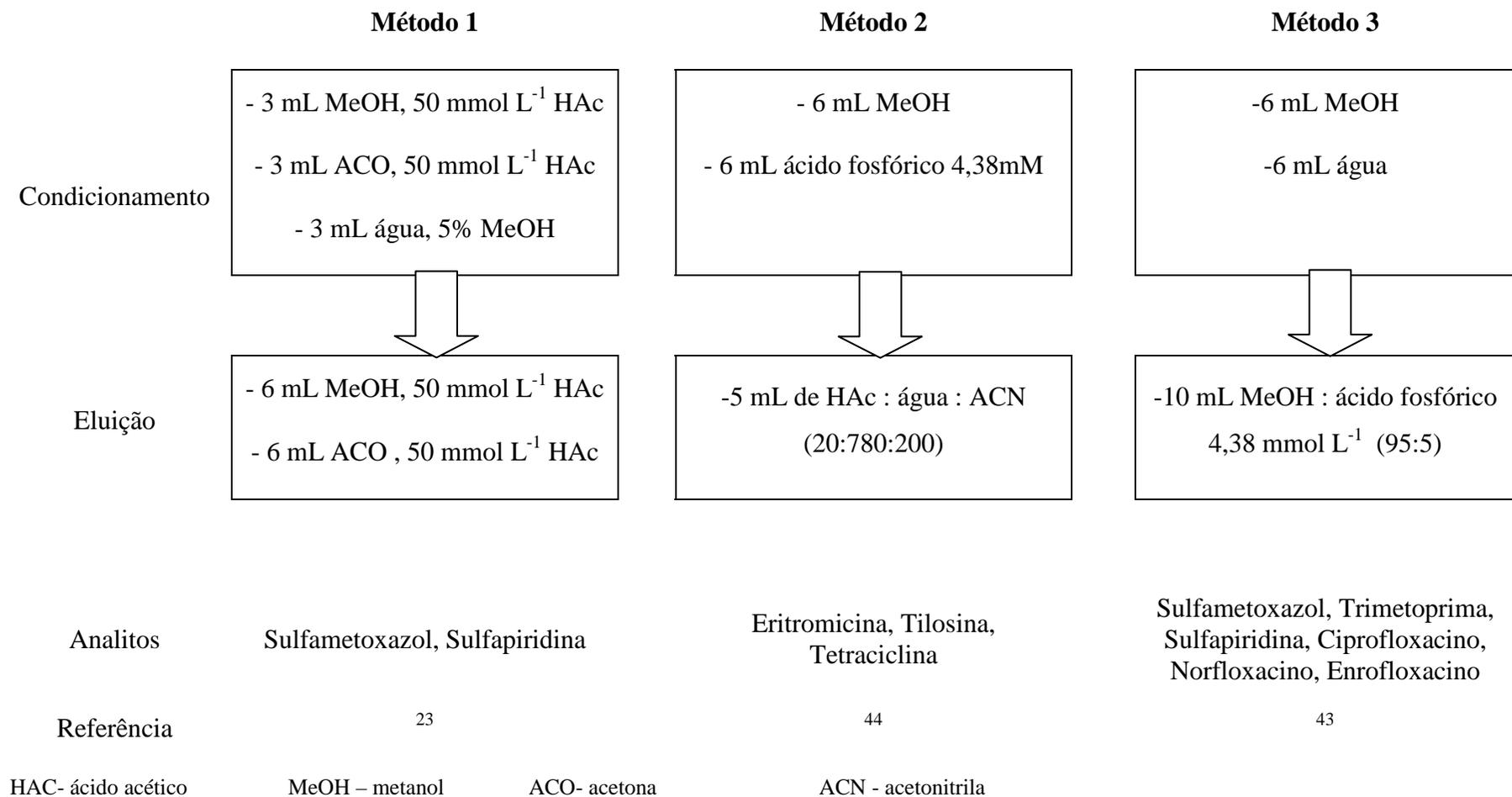


Figura 19. Protocolos de EFS testados

4.2.9 Recuperação

A avaliação da recuperação foi realizada com 100 mL de soluções dos analitos nas concentrações em torno de 2,0; 1,0; 0,75; 0,50; 0,30 e 0,10 $\mu\text{g L}^{-1}$ em amostra de efluente da ETE. Paralelamente foi também analisado amostra somente do efluente sem a adição dos analitos. Essas soluções foram processadas utilizando EFS, e analisadas pelo método de CL-EM/EM.

A quantificação foi realizada com curva analítica em que cada solução foi preparada utilizando o efluente como solvente. A recuperação foi expressa como porcentagem de analito no extrato final após a etapa de pré-concentração. A Equação 1 representa o cálculo da recuperação em percentual.

$$\text{Rec (\%)} = [(\text{valor obtido} - \text{valor real}) \times 100] / \text{valor real} \quad \text{Eq 1}$$

4.2.10 Determinação do volume de quebra

O volume de quebra foi determinado utilizando-se soluções contendo a mesma massa de analito, nos seguintes volumes: 25, 50, 100 e 250 mL, em três matrizes diferentes; água ultrapura, água potável e efluente. Estas soluções foram submetidas à EFS e os extratos finais foram analisados por CL-EM/EM, nas condições determinadas. Após a análise, os valores de recuperação foram colocados em um gráfico de volume de solvente em função da recuperação, para cada analito⁷⁶.

4.2.11 Avaliação de parâmetros de desempenho do método de quantificação de antibióticos: linearidade, intervalo de trabalho, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, repetitividade e reprodutibilidade

A linearidade foi avaliada através da injeção nas concentrações de 0,5 a 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ (0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 7,5, 10,0, 15,0, 20,0, 30,0, 50,0, 75,0, 100, 150,0 e 200,0). Os padrões internos utilizados foram tilosina, enrofloxacino, sulfapiridina, ceftiofur e demeclociclina, todos na concentração de 50 ng mL^{-1} . As curvas foram realizadas na fase móvel e na matriz.

A avaliação do limite de detecção foi realizada experimentalmente, através da análise de soluções diluídas. O limite de detecção para cada analito foi determinado como sendo três vezes a razão sinal/ruído.

De maneira similar, a avaliação do limite de quantificação foi feita calculando-se a concentração relativa ao sinal do ruído, e o valor de LQ correspondente foi o valor encontrado multiplicado dez vezes.

Para obtenção dos valores de LD e LQ instrumental, foram considerados os pontos da curva analítica em fase móvel; já para o LD e LQ do método, a curva analítica em matriz foi considerada, e o valor obtido foi dividido pelo fator de concentração aplicado na amostra, resultando na concentração real ambiental que é possível detectar/quantificar.

Uma vez que em espectrometria de massas um analito é caracterizado por seu íon molecular, e confirmado por seus fragmentos quantificador e qualificador, essa técnica já é considerada uma técnica altamente específica, portanto, já apresenta resultados adequados em relação a esse critério de validação.

A exatidão foi avaliada pela análise de 7 amostras em três níveis de concentração, 10, 50 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. A concentração de cada uma das amostras foi calculada, utilizando equação da reta obtida por curva analítica em fase móvel analisada no mesmo dia que as amostras.

A repetitividade foi avaliada pela análise de três níveis de concentração, com sete replicatas em cada ponto. As amostras foram preparadas simultaneamente pelo mesmo analista e analisadas no mesmo dia, no mesmo equipamento sob as mesmas condições. O objetivo é a avaliação da concordância entre os resultados em cada nível de concentração

A avaliação da reprodutibilidade foi realizada através da análise e determinação da concentração de três lotes, em que se variou uma condição em cada lote, conforme descrito na Tabela 7. Cada um dos três lotes era composto por 7 replicatas em três níveis de concentração (10, 50 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$).

Tabela 7. Variações realizadas nos lotes utilizados para avaliação da reprodutibilidade do método

Variação		
Lote	Equipamento	Analista
A	Equipamento utilizado na validação	Analista responsável pela validação
B	Equipamento utilizado na validação	<u>Analista diferente</u>
C	<u>Equipamento diferente</u>	Analista responsável pela validação

As concentrações foram calculadas através de equação da reta obtida por curva analítica processada no mesmo dia do experimento, e foram realizadas comparações entre os lotes A × B e A × C a fim de avaliar se o método exibia reprodutibilidade.

4.3 EQUIPAMENTOS

O equipamento utilizado no desenvolvimento da metodologia e posterior análise das amostras foi um cromatógrafo líquido 1100 Series, marca Agilent Technologies / triplo quadrupolo em modo tandem API 5000, marca MDS SCIEX (Applied Biosystems).

A coluna utilizada foi uma ZORBAX Eclipse XDB-C18 (150 mm × 4,6 mm, 5 µm), marca Agilent, com coluna de guarda SecurityGuard Guard Cartridges Kit, da marca Phenomenex, recheada com SecurityGuard Cartridges C18 (4,0 × 3,0 mm 5 µm).

Na etapa de EFS, foi utilizado um coletor (manifold), marca Supelco, e um evaporador Tec Vap TE – 0194 marca Tecnal.

4.4 ÁREA DE ESTUDO – ÁGUAS RESIDUÁRIAS

4.4.1 Efluentes urbanos

Amostras de efluentes urbanos foram coletadas em uma ETE de Porto Alegre.

4.4.2 Coleta, técnica de amostragem, preservação e preparação das amostras de efluente

As coletas foram realizadas mensalmente, entre janeiro e agosto deste ano. Foram coletadas amostras na entrada e na saída da estação, a fim de avaliar se os compostos de interesse sofreram alguma redução na concentração durante o tratamento. As amostras foram coletadas em vidro âmbar para evitar fotodegradação.

Ao chegar ao laboratório, as amostras foram filtradas para que materiais grosseiros fossem removidos. Em seguida, foram passadas por filtros de tamanho de poro de 2 µm, 1,2 µm e 0,45 µm, para que sólidos presentes não saturassem o cartucho no momento da EFS. Existem perdas relacionadas ao processo de filtração; entretanto, a concentração na fase líquida ainda se mantém maior devido ao coeficiente de partição do processo.

Após o procedimento de filtração, são adicionados 2 mL de formaldeído para cada litro de amostra, a fim de impedir a proliferação de microorganismos, e foram mantidas sob

refrigeração a 4 ± 2 °C, ao abrigo da luz. No momento do processamento, as amostras foram retiradas da refrigeração, deixadas por 1 hora a temperatura ambiente (20 °C), foram novamente filtradas a 0,45 µm e estão prontas para a EFS.

4.4.3 Pontos de coleta selecionados

A fim de avaliar a taxa de remoção dos analitos durante o processo de tratamento convencional de efluentes, as amostras foram colhidas no início do processo (entrada da ETE – afluente “Af”) e no final (saída da ETE – efluente “Ef”).

4.4.4 Sazonalidade

As amostras foram recolhidas na estação de tratamento de esgotos da cidade de Porto Alegre no período de janeiro a agosto de 2011, totalizando 16 amostras. O objetivo das coletas em diferentes meses é avaliar a possível sazonalidade de incidência de algum composto, indicando assim que em determinada época do ano ele possa ser mais consumido.

4.4.5 Preparo das amostras reais de efluentes urbanos

As amostras coletadas foram mantidas armazenadas sob refrigeração por períodos inferiores a um mês, para evitar que os analitos sofressem degradação nesse período, prejudicando a avaliação da sua concentração ambiental.

O preparo é iniciado retirando-se a amostra do refrigerador para que atinja o equilíbrio térmico. Assim que a temperatura ambiente é atingida, a amostra é, novamente, filtrada em filtro de celulose com tamanho de poro de 0,45 µm, e então está pronta para iniciar o processo de extração em fase sólida.

O volume de amostra percolado é de 100 mL; as amostras são processadas em triplicata.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS PARA ANÁLISE POR CL-EM/EM

A infusão da solução padrão de cada um dos analitos, separadamente, em concentrações que variaram de 100 a 200 $\mu\text{g L}^{-1}$, num fluxo de 10 $\mu\text{L min}^{-1}$, foram utilizadas para estabelecer os parâmetros do analisador de massas (Tabela 8).

Tabela 8. Parâmetros otimizados para o analisador de massas dos analitos e padrões internos, por ionização por *electrospray* no modo positivo.

Analito	Íon Molecular [M+H ⁺]	Fragmento	DP	CXP	CE
Macrolídeos					
Eritromicina	734.0	159.0	126	37	16
		576.0	126	23	22
Azitromicina	749.5	591.4	271	39	22
		158.2	271	51	24
Tilosina (PI)	916.0	174.0	56	47	22
		101.0	56	59	16
Fluoroquinolonas					
Ciprofloxacino	332.0	288.0	51	23	34
		314.0	51	23	32
Norfloxacino	320.0	276.0	51	25	30
		233.0	51	33	26
Enrofloxacin (PI)	360.0	316.0	51	27	34
		245.0	51	37	36
Sulfonamidas					
Sulfametoxazol	254.0	108.0	41	21	12
		156.0	41	33	22
Trimetoprima	291.0	275.0	45	25	15
		230.0	45	22	15
Sulfapiridina (PI)	250.0	156.0	26	23	10
		108.0	26	33	46
Cefalosporinas					
Cefalexina	348.0	158.0	106	15	22
		106.0	106	35	14
Ceftiofur (PI)	524.0	241.0	126	25	16
		210.0	126	35	10
Tetraciclina					
Tetraciclina	445.0	410.0	126	29	16
		427.0	126	31	48
Demeclociclina (PI)	465.0	448.0	126	23	48
		430.0	126	31	13

DP: Declustering Potential

CXP: Collision Exit Cell Potential

CE: Collision Energy

O FIA foi realizado com uma solução mista dos analitos na concentração de 50 µg L⁻¹ para determinar os parâmetros da ionização. A solução foi analisada 54 vezes; 27 variações dos parâmetros foram testadas, em duplicata, e o melhor resultado foi selecionado automaticamente pelo equipamento e encontra-se descrito na Tabela 9.

Tabela 9. Parâmetros para a ionização por *electrospray* no modo positivo

Parâmetro	Valor
Potencial de Entrada (EP)	10
Gás de Colisão (CAD)	6
Gás de cortina (CUR)	15
Gás de Nebulização (GS1)	45
Gás Auxiliar (GS2)	45
Voltagem do Spray Eletrônico (IS)	4500
Temperatura, °C (TEM)	450

5.1.1 Condições de separação por cromatografia líquida

Como fase móvel utilizou-se: (A) solução aquosa 0,1% de ácido fórmico (água ultrapura) e (B) acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico. Em espectrometria de massas, é necessário que as moléculas estejam ionizadas, positiva ou negativamente, de acordo com o modo de ionização que se trabalha, que no caso é o modo positivo. A adição de um ácido muitas vezes se faz necessária para auxiliar a ionização das moléculas. Um dos ácidos mais adequados pra este fim é o ácido fórmico, pois é um ácido fraco e muito volátil, condição imprescindível para a análise por CL-EM/EM. O volume de injeção utilizado foi de 15 µL.

Os gradientes avaliados estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Gradientes de composição de fase móvel avaliados para a separação cromatográfica dos antibióticos em estudo

Gradiente A			Gradiente B			Gradiente C		
Tempo (min)	%A	%B	Tempo (min)	%A	%B	Tempo (min)	%A	%B
0	95	5	0	85	15	0	75	25
6	95	5	14	50	50	7	75	25
11	20	80	17	2	98	11	2	98
12	20	80	24	2	98	13	2	98
13	95	5	30	85	15	23	75	25
18	95	5	33	85	15	26	75	25

A Figura 20 apresenta os cromatogramas obtidos no modo MRM para os três gradientes de fase móvel.

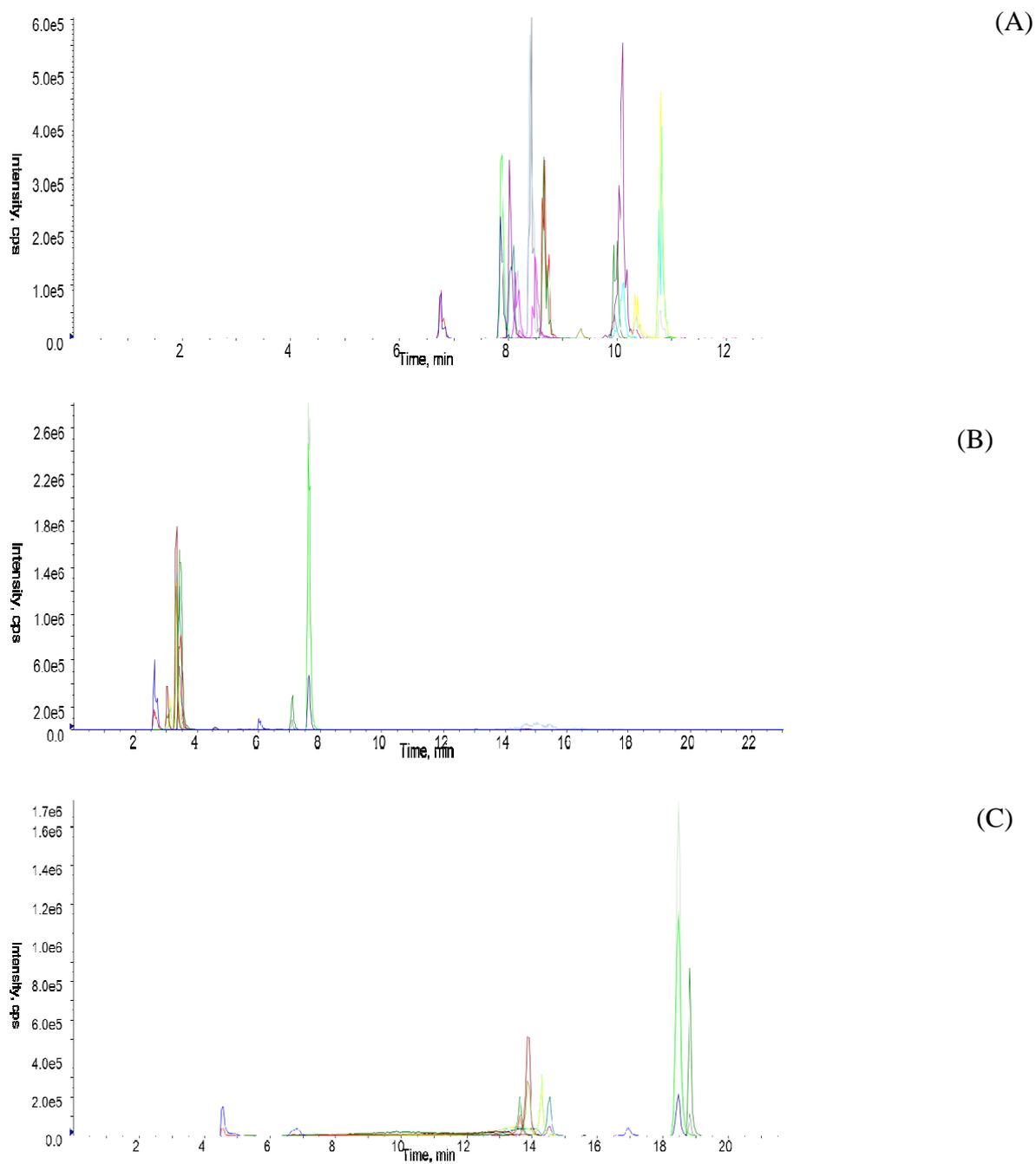


Figura 20. Cromatogramas no modo MRM da solução mista dos antibióticos e seus respectivos padrões internos, nos três gradientes de fase móvel avaliados.

A partir da análise dos cromatogramas obtidos, observa-se que para o gradiente C os tempos de retenção são muito altos sendo necessário 20 minutos para a eluição completa dos

compostos. No gradiente B os tempos de retenção são muito baixos, e a maioria elui no volume morto, o que é inadequado para a análise. No gradiente A obtiveram-se os melhores resultados: o tempo total para a eluição completa de todos os compostos foi inferior a 12 minutos e não há nenhum que elua no volume morto. Portanto, o gradiente A foi estabelecido como o mais adequado para as análises a serem realizadas neste trabalho.

Nas Figuras 21 e 22 são apresentados os cromatogramas das soluções padrão em fase móvel, no modo MRM separadamente, apenas dos analitos (Figura 21, na concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$) e apenas dos padrões internos utilizados (Figura 22, na concentração de $50 \mu\text{g L}^{-1}$).

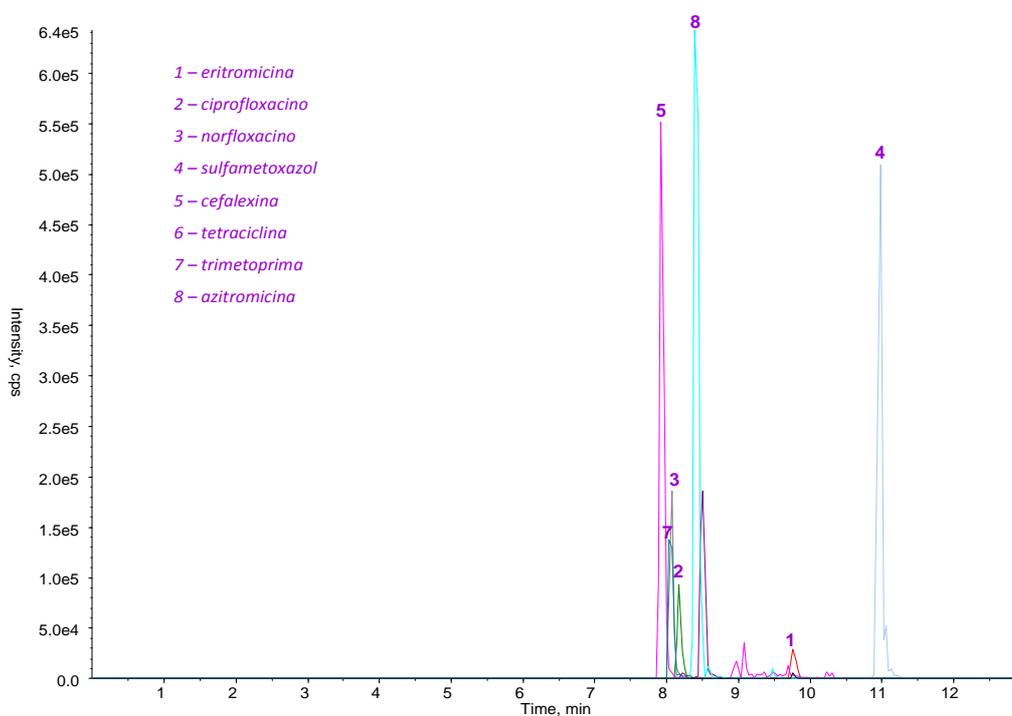


Figura 21. Cromatograma da solução dos antibióticos, em fase móvel, no modo MRM na concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$.

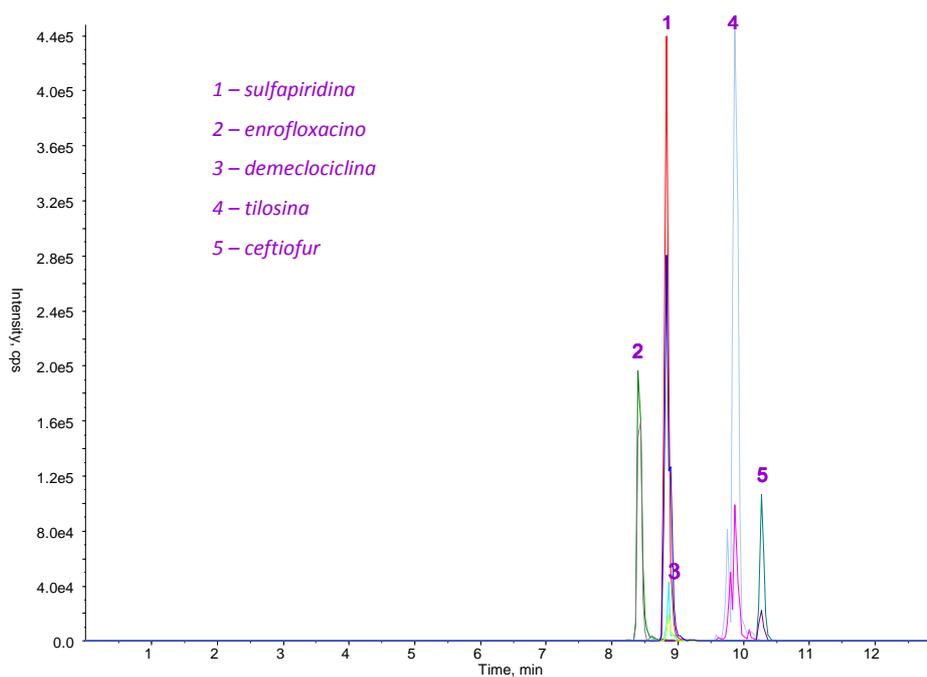


Figura 22. Cromatograma da solução dos padrões internos, em fase móvel, no modo MRM na concentração de $50 \mu\text{g L}^{-1}$.

A Tabela 11 apresenta os tempos de retenção de todos os compostos nas condições de análise estabelecidas utilizando-se o gradiente de fase móvel A.

Tabela 11. Tempos de retenção dos antibióticos obtidos a partir da análise por CL-EM/EM.

Analito	Tempo de Retenção (min)
Eritromicina	9,65
Ciprofloxacino	8,09
Norfloxacino	7,98
Sulfametoxazol	10,81
Cefalexina	7,61
Tetraciclina	8,15
Trimetoprima	7,59
Azitromicina	8,20

Observa-se que em alguns casos os tempos de retenção são quase sobreponíveis e pelos cromatogramas é possível verificar que os picos não ficariam completamente resolvidos se fosse um cromatograma convencional. No entanto, por MRM, como cada transição monitorada é tratada por um canal separadamente, os picos não se sobrepõem.

5.2 ESTABILIDADE DOS ANALITOS EM FASE MÓVEL

Em trabalho anterior realizado com estes analitos, a estabilidade da solução estoque, em diferentes solventes que irá depender do analito em questão, na concentração de 1 mg mL⁻¹, de cada analito variou de 2 a 6 meses.

Durante um mês, realizou-se teste de estabilidade de soluções diluídas dos analitos, na concentração de 100 µg L⁻¹ em fase móvel. Ao final de 39 dias, as soluções foram analisadas.

Foi realizado um estudo do desvio apresentado no decorrer dos dias do teste de estabilidade prolongado das soluções.

Tabela 12. Porcentagem da área original dos antibióticos, em solução em fase móvel, na faixa de concentração de trabalho (100 µg L⁻¹), obtidas como a razão de área em relação ao norfloxacino no período de 39 dias.

Analito	Dia											
	2	4	6	8	13	19	21	27	29	35	39	
ERT	88,9	81,3	74,7	74,2	58,2	58,6	53,4	51,4	48,1	44,2	36,7	
CPF	95,9	93,9	96,6	96,9	92,8	98,7	97,7	98,6	97,1	94,7	97,4	
NRF	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	
SMX	97,2	91,7	99,0	93,7	78,2	74,2	69,8	68,0	99,2	59,9	54,6	
CFX	121,5	103,7	82,0	65,0	45,8	114,3	86,8	95,0	101,3	86,8	59,9	
TRI	100,8	90,8	92,4	103,0	87,9	90,2	84,8	87,2	86,2	88,5	82,9	
AZT	110,1	105,6	95,1	87,0	86,8	98,9	99,8	91,2	99,3	78,9	74,9	
TC	90,7	87,5	105,2	99,0	101,4	107,4	103,2	89,1	109,7	108,3	96,1	

A estabilidade foi avaliada comparando-se os valores de áreas obtidos para os compostos em relação ao norfloxacino, que se apresentou estável no decorrer dos estudos, uma vez que não foram utilizados padrões internos.

Observa-se que a maioria dos antibióticos se mantém estável ao final do experimento, com exceção da eritromicina, que apresenta uma perda de cerca de 60% em relação à área apresentada no início do estudo. O antibiótico sulfametoxazol teve perda de cerca de 40%, similar à cefalexina. Os demais compostos mantiveram áreas maiores que 80% da área inicial.

5.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DE MATRIZ

A fonte de ionização por *eletrospray* é atualmente a fonte de ionização mais utilizada⁷⁷. A eficiência na formação de íons utilizando *eletrospray* depende principalmente, de duas etapas: a dessolvatação do composto de interesse e a transferência de uma carga para o analito, caso ele já não esteja carregado. Efeito de matriz é a alteração da eficiência de ionização com a presença de substâncias que coeluem. É sabido que a resposta de compostos orgânicos por *eletrospray* poderá diminuir à medida que a concentração de outros compostos aumenta. O mecanismo exato de efeitos de matriz não é conhecido, mas provavelmente se origina a partir da competição entre os analitos e as substâncias coeluentes⁷⁷.

As curvas analíticas em solvente e na matriz, para ciprofloxacino, norfloxacino, sulfametoxazol e tetraciclina se mostraram sobreponíveis ou praticamente sobreponíveis, ou seja, a intensidade do sinal desses analitos não é alterada significativamente pela presença da matriz.

Já para azitromicina, trimetoprima, eritromicina e cefalexina, a diferença de inclinação entre a curva em solvente e a curva em matriz é significativa e, portanto, tal fato deve ser considerado no momento da quantificação de amostras reais, se esta for realizada por curva em solvente.

As Figuras 23 a 30 apresentam as curvas analíticas em fase móvel (CFM) e em matriz (CM) para os analitos.

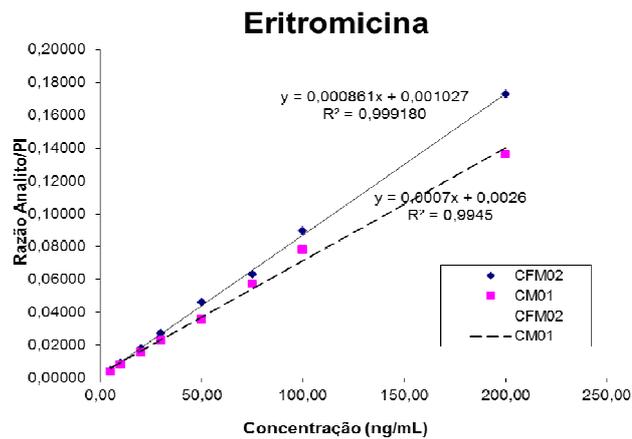


Figura 23. Curvas analíticas na fase móvel (CFM) e na matriz (CM) para a eritromicina.

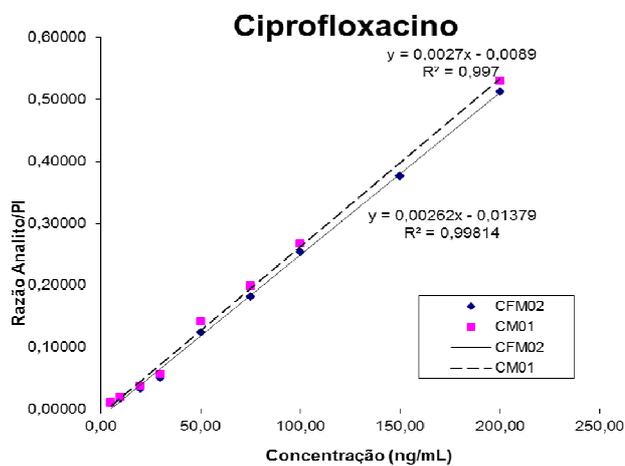


Figura 24. Curvas analíticas na fase móvel (CFM) e na matriz (CM) para a ciprofloxacino.

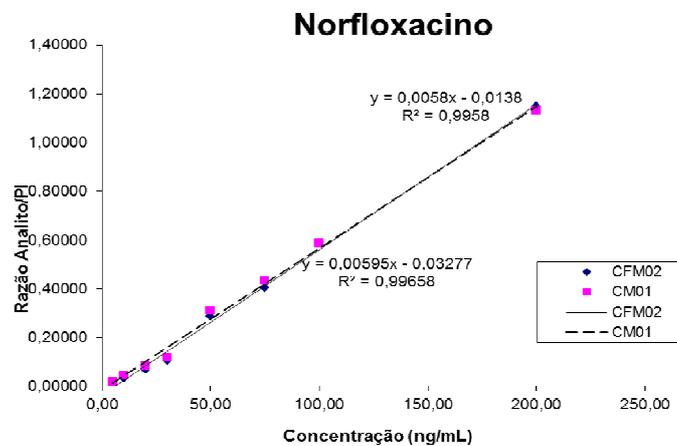


Figura 25. Curvas analíticas na fase móvel (CFM) e na matriz (CM) para o norfloxacinó.

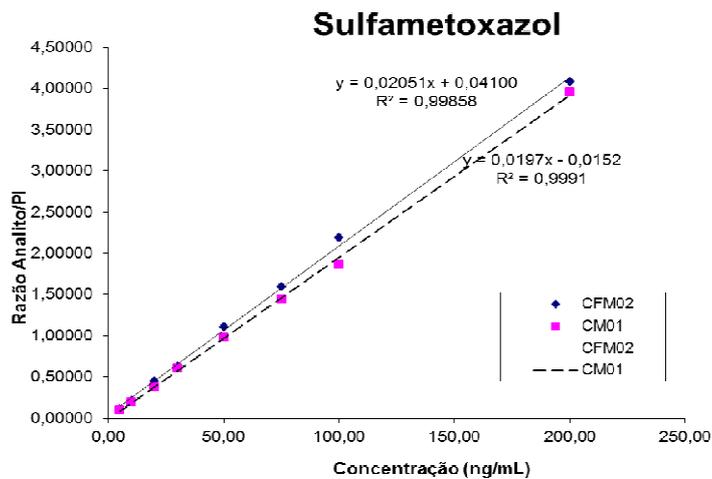


Figura 26. Curvas analíticas na fase móvel (CFM) e na matriz (CM) para o sulfametoxazol.

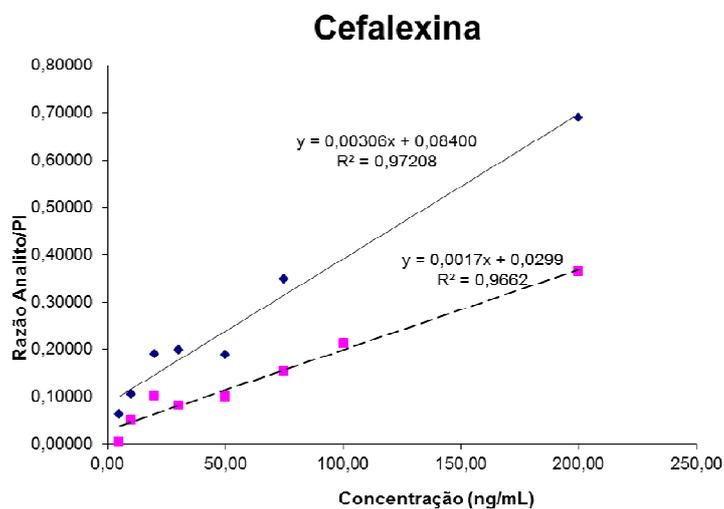


Figura 27. Curvas analíticas na fase móvel (CFM) e na matriz (CM) para a cefalexina.

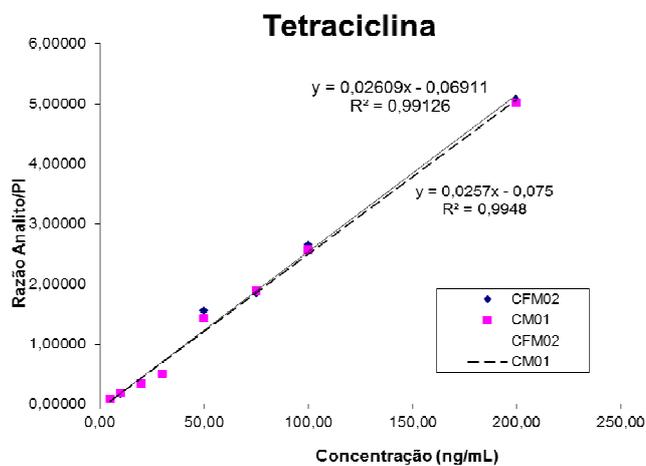


Figura 28. Curvas analíticas na fase móvel (CFM) e na matriz (CM) para a tetraciclina.

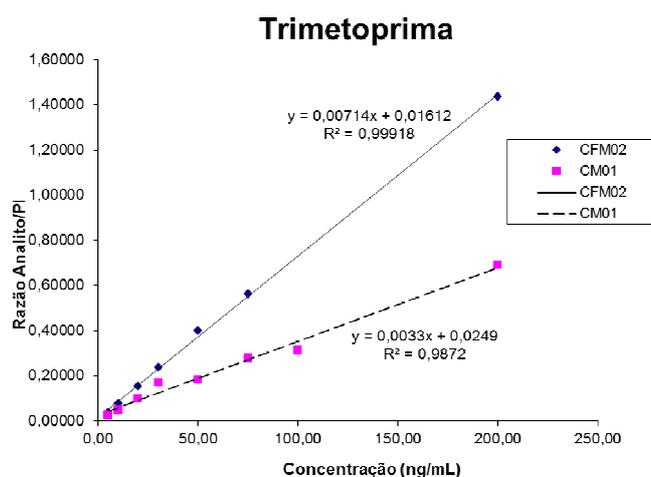


Figura 29. Curvas analíticas na fase móvel (CFM) e na matriz (CM) para o trimetoprima.

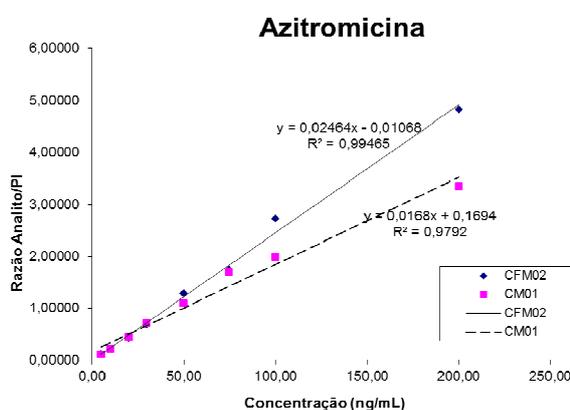


Figura 30. Curvas analíticas na fase móvel (CFM) e na matriz (CM) para a azitromicina.

Para os analitos que apresentaram diferença significativa no coeficiente **a** (azitromicina, trimetoprima, cefalexina e eritromicina), utilizou-se a curva na matriz para a quantificação. Nos demais, utilizou-se a curva em fase móvel.

5.4 DETERMINAÇÃO DA SUPRESSÃO IÔNICA NO CL-EM/EM COM IONIZAÇÃO POR *ELETR*SPRAY

Como discutido na seção anterior, a presença de coeluentes da amostra pode interferir na ionização dos compostos de interesse, diminuindo assim a sensibilidade da técnica. Na determinação da supressão iônica, busca-se identificar em que áreas esse efeito ocorre, através da injeção da matriz e de um solvente, utilizando uma infusão pós-coluna, conforme descrito por Bonfoglio em 1999⁷⁸.

Idealmente, na injeção da matriz, conforme os interferentes da matriz são eluídos da coluna cromatográfica, eles interferem no sinal dos analitos, que na injeção do solvente puro se mantém constante. Dessa forma, é possível avaliar se existe supressão dos íons dos analitos, e em quais regiões do cromatograma esse efeito acontece.

Todos os analitos apresentaram uma área de supressão no cromatograma no tempo que corresponde ao volume morto da coluna. A faixa que apresenta diminuição no sinal do analito inicia, em todos os cromatogramas, em torno de 2 minutos, e se mantém com maior ou menor intensidade, dependendo do analito, até os 5 minutos aproximadamente.

Após essa faixa, alguns analitos apresentam aproximadamente a mesma intensidade para o solvente e para o extrato branco (norfloxacino, sulfametoxazol, cefalexina, tetraciclina e azitromicina), e outros apresentam uma diminuição do sinal (eritromicina, ciprofloxacino e trimetoprima).

A faixa de eluição dos analitos se encontra entre 7 e 11 minutos. Em todos os cromatogramas, é possível verificar que não há supressão nessa faixa e, portanto, o efeito de supressão não provoca efeitos na análise cromatográfica.

Os cromatogramas em modo MRM de todos os analitos estão apresentados nas Figuras 31 a 38.

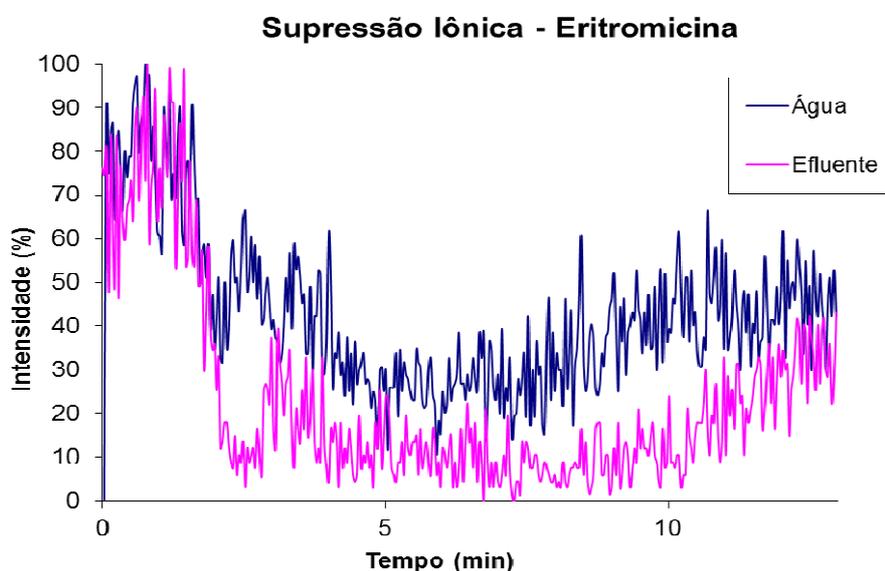


Figura 31. Avaliação da supressão iônica para a transição quantificadora da eritromicina

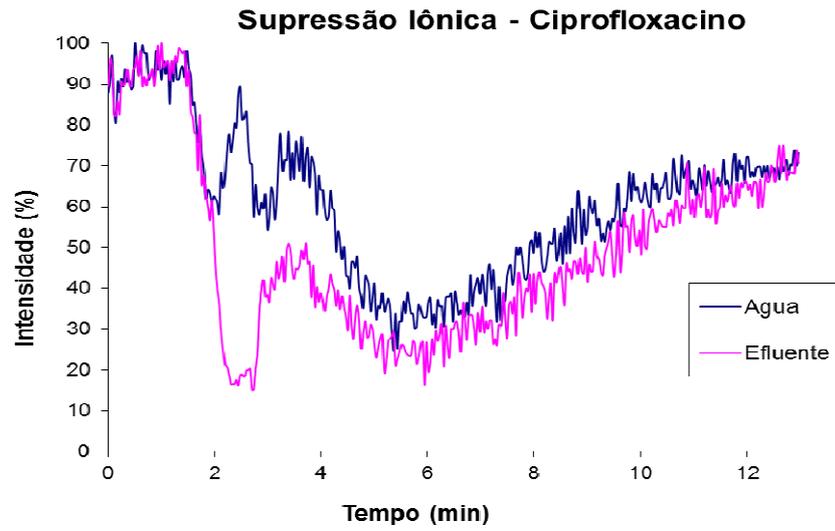


Figura 32. Avaliação da supressão iônica para a transição quantificadora do ciprofloxacino

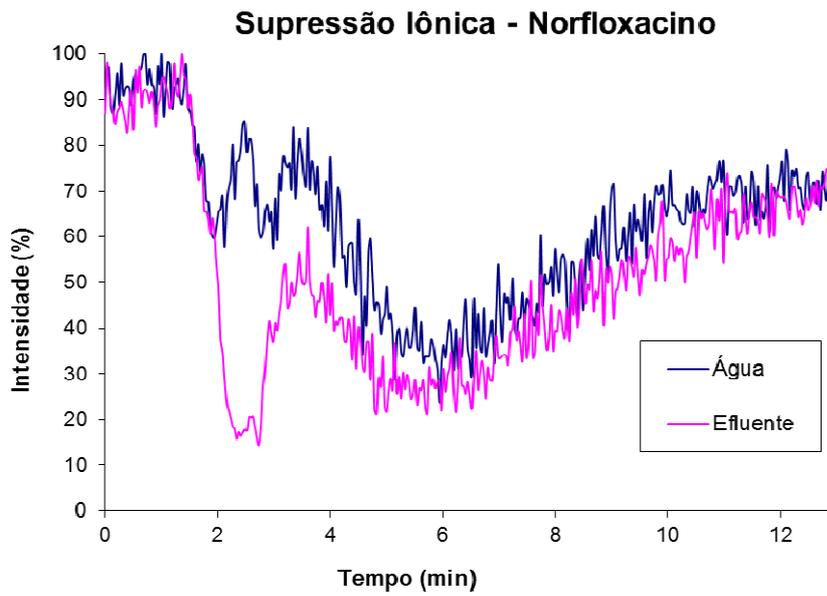


Figura 33. Avaliação da supressão iônica para a transição quantificadora do norfloxacino

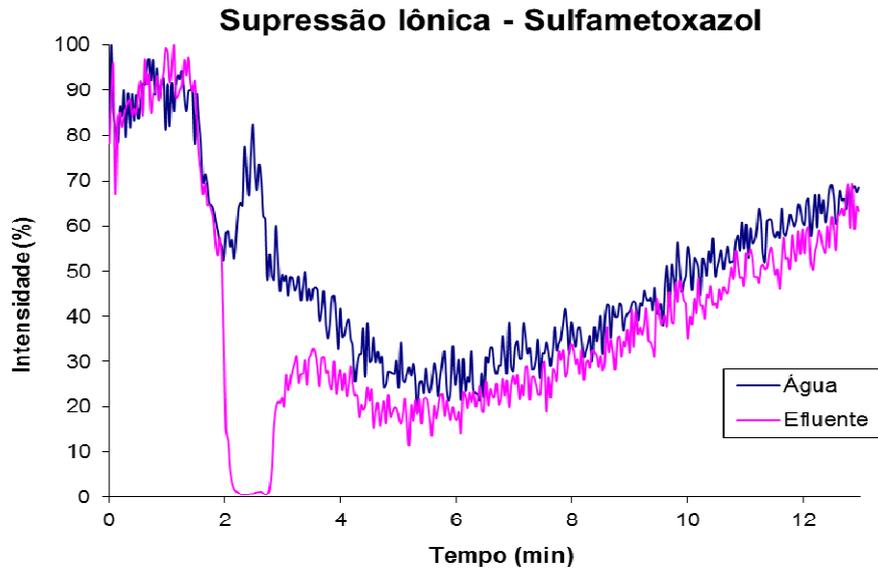


Figura 34. Avaliação da supressão iônica para a transição quantificadora do sulfametoxazol

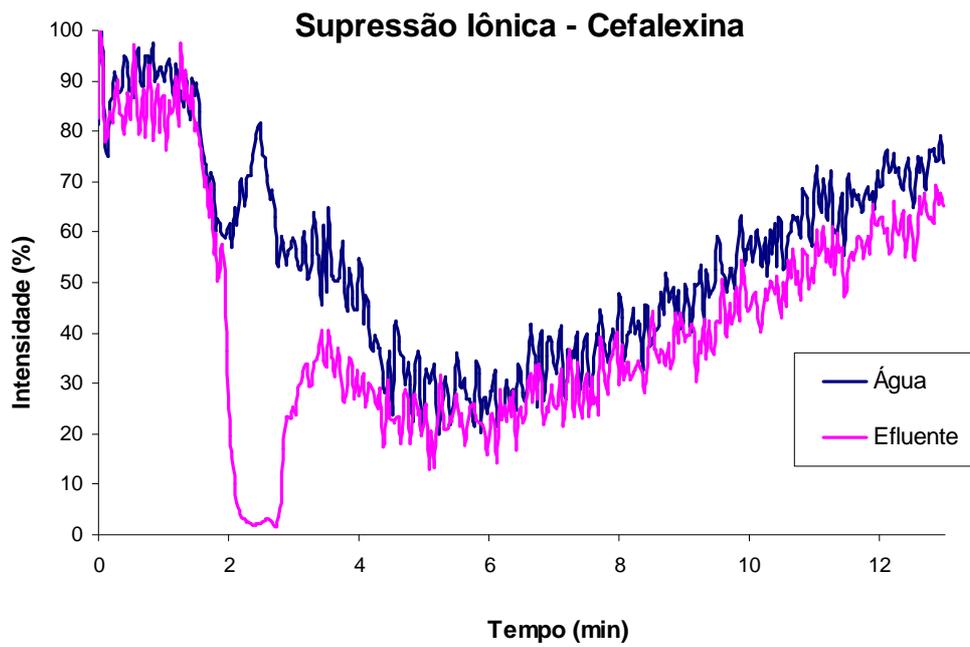


Figura 35. Avaliação da supressão iônica para a transição quantificadora da cefalexina

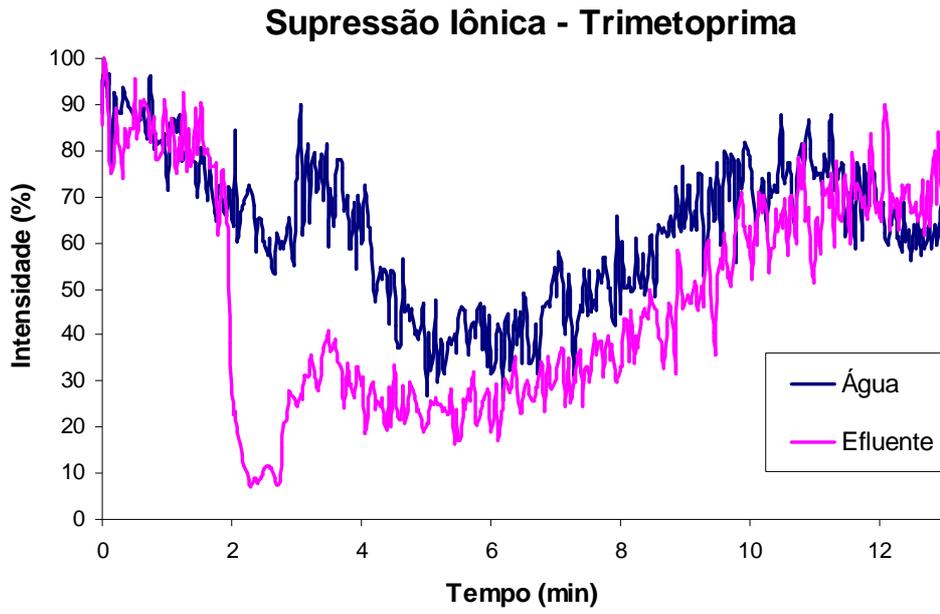


Figura 36. Avaliação da supressão iônica para a transição quantificadora da trimetoprima

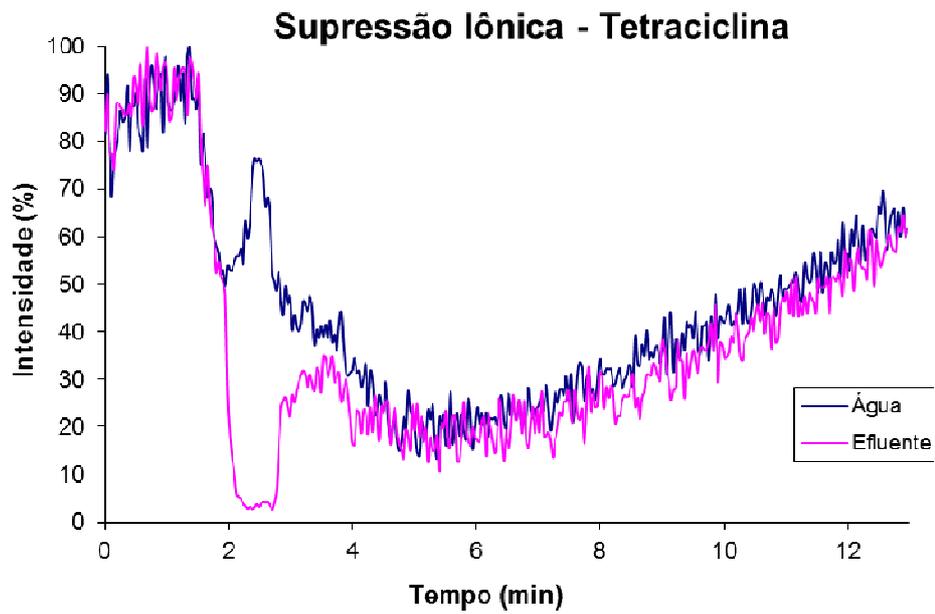


Figura 37. Avaliação da supressão iônica para a transição quantificadora da tetraciclina

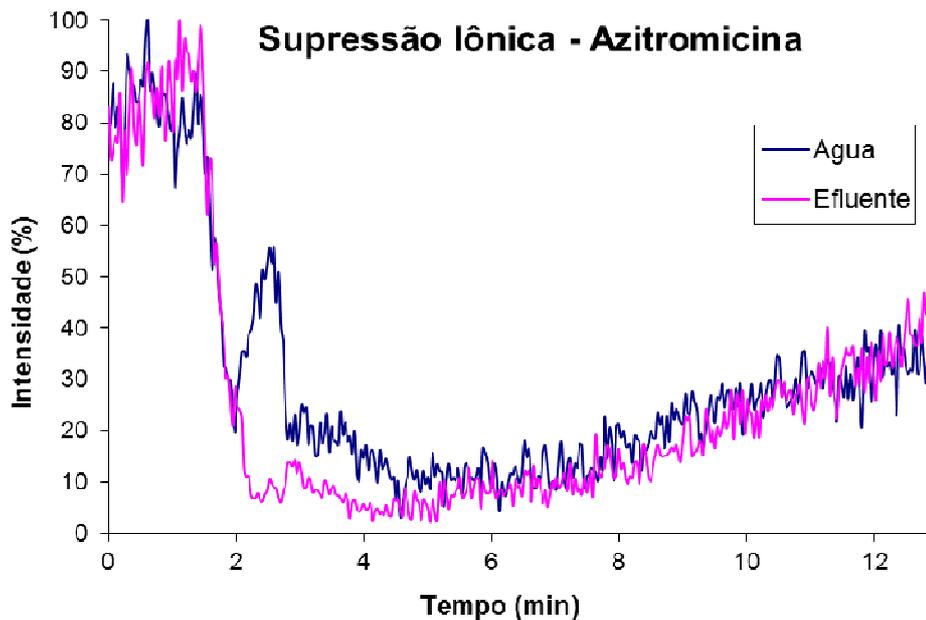


Figura 38. Avaliação da supressão iônica para a transição quantificadora da azitromicina

5.5 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

Os valores de áreas obtidas para cada analito empregando os três procedimentos de EFS avaliados são apresentados nas Figuras 39 e 40. A avaliação foi realizada em termos de área, não de concentração, por não haver método quantitativo validado no momento e também porque o objetivo era avaliar a resposta dos analitos e qualidade dos picos.

O cartucho utilizado nos testes foi o OASIS[®] HLB, Waters, o mais utilizado nas extrações de fármacos com diferentes características, por conter balanço hidrofílico-lipofílico (N-vinilpirrolidona e divinilbenzeno, respectivamente), capaz de reter compostos polares e apolares.

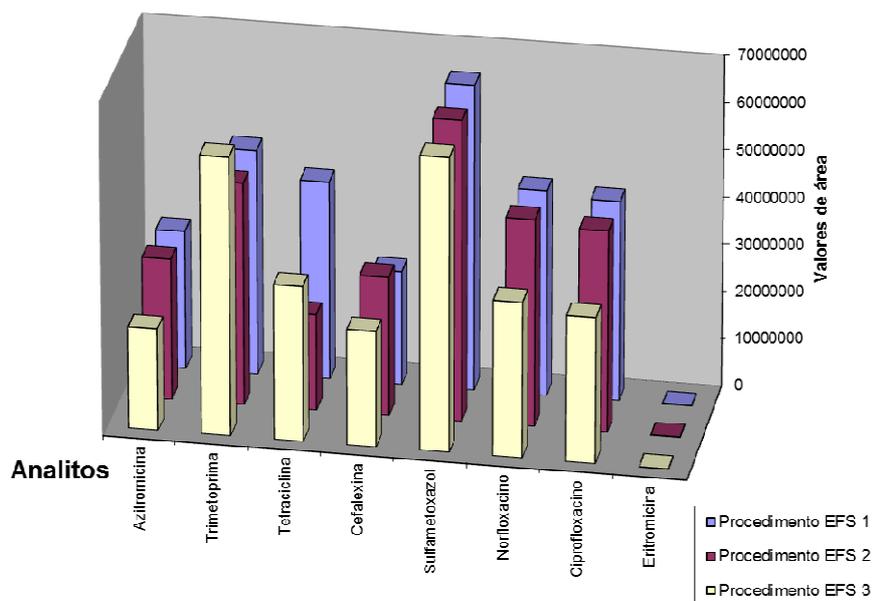


Figura 39. Valores de área dos analitos em função do procedimento de EFS

Uma vez que os valores de eritromicina se mostraram consideravelmente mais baixos que os valores dos demais analitos, o composto é apresentado separadamente, na Figura 8.

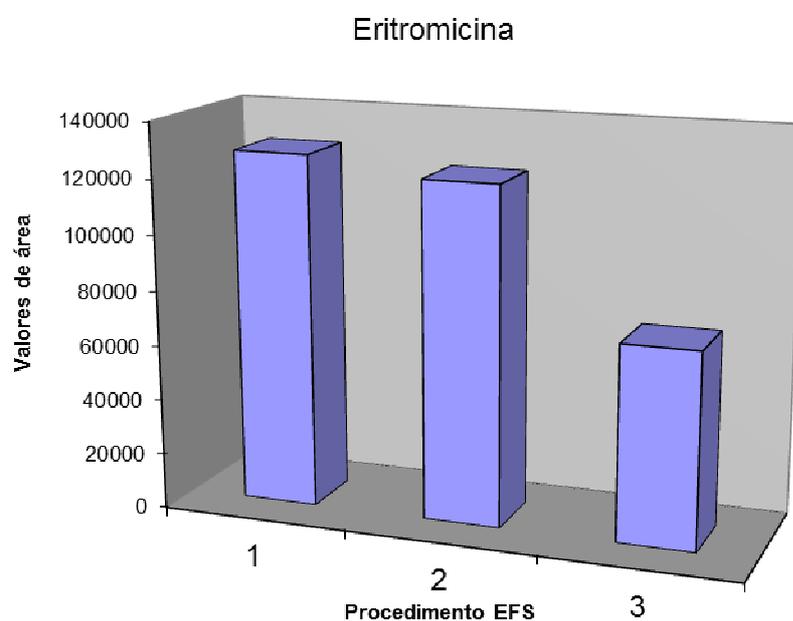


Figura 40. Valores de área da eritromicina em função do procedimento de EFS

A partir dos dados observados nas Figuras 39 e 40, o procedimento 1 foi escolhido uma vez que a resposta de área foi considerada melhor para todos os compostos. Observa-se

que no caso da trimetoprima, a resposta é melhor no método 3, porém neste procedimento há uma perda muito grande em termos de área para os demais compostos, o que comprometeria significativamente a recuperação da maioria. O procedimento 2 apresenta valores de área aceitáveis, com exceção da tetraciclina em que se observa uma redução de área.

5.6 DETERMINAÇÃO DO VOLUME DE QUEBRA

Os dados de volume de quebra em água ultrapura, água potável e efluente estão apresentados nas Figuras 41, 42 e 43, respectivamente. O método utilizado foi a divisão da recuperação apresentada por cada analito pela recuperação do analito norfloxacino, para cada volume de solução. O norfloxacino foi escolhido por apresentar recuperação uniforme para todos os volumes testados. O método utilizado visa diminuir erros relativos à não adição do padrão interno.

Os dados de recuperação, para cada analito não tiveram variações significativas, no entanto optou-se por utilizar 100 mL uma vez que este volume resultaria em um adequado fator de concentração e não haveria grande efeito de matriz em função de maior volume da própria amostra que contem muitas substâncias dissolvidas que eluem junto com os analitos, conforme se pode observar pela coloração final dos extratos.

A azitromicina não foi avaliada, uma vez que foi incluída no método após definição do volume ideal para os demais analitos.

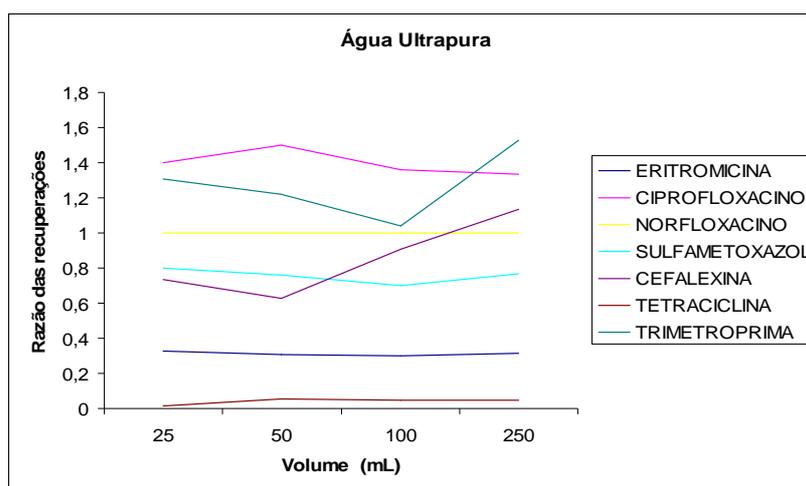


Figura 41. Gráfico de volume de quebra, da razão da recuperação dos antibióticos (recuperação dos analitos pela recuperação do norfloxacino), em função de diferentes volumes da solução (25, 50, 100 e 250 mL) em água ultrapura.

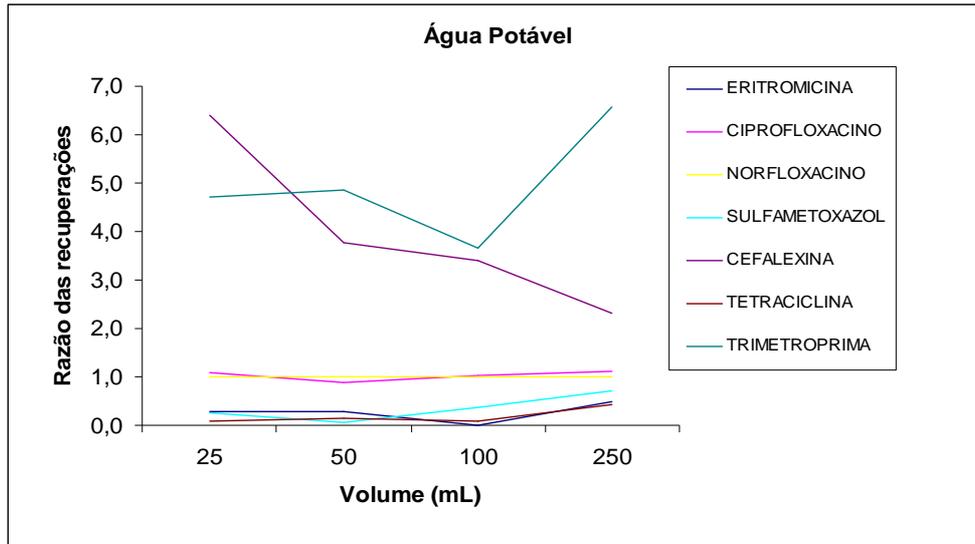


Figura 42. Gráfico de volume de quebra, da razão da recuperação dos antibióticos (recuperação dos analitos pela recuperação do norfloxacino), em função de diferentes volumes da solução (25, 50, 100 e 250 mL) em água potável

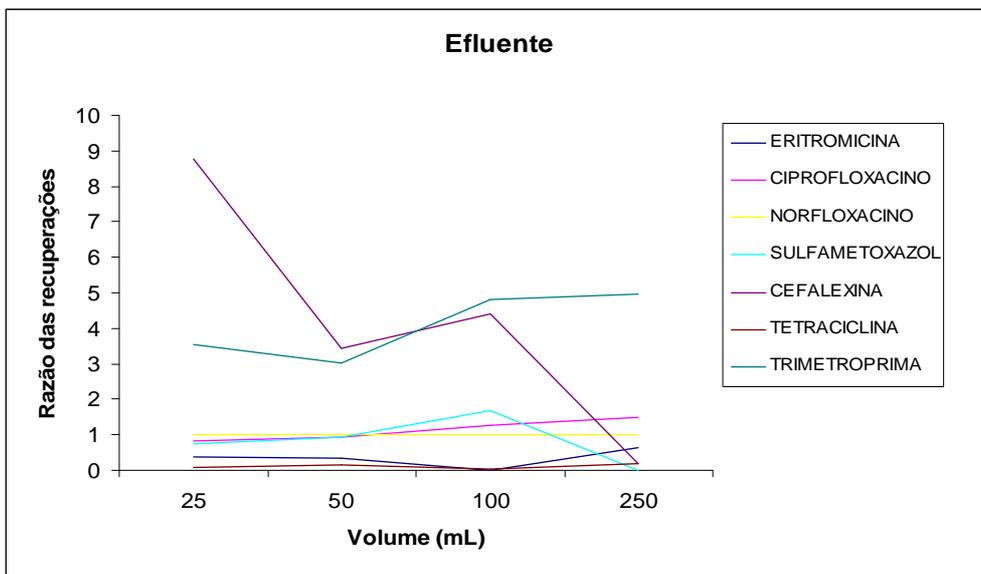


Figura 43. Gráfico de volume de quebra, da razão da recuperação dos antibióticos (recuperação dos analitos pela recuperação do norfloxacino), em função de diferentes volumes da solução (25, 50, 100 e 250 mL) em efluente de saída.

5.7 PARÂMETROS DE DESEMPENHO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO: LINEARIDADE E INTERVALO DE TRABALHO, DETERMINAÇÃO DO LIMITE DE DETECÇÃO, LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO, EXATIDÃO, REPETITIVIDADE E REPRODUTIBILIDADE

5.7.1 Recuperação

Os valores de área encontrados para cada uma das soluções processadas pelo método de EFS foram quantificados pela equação da reta obtida de uma curva em matriz. Esses valores foram comparados aos valores da curva em matriz. A média desses valores e o desvio padrão foram calculados e estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Valores de recuperação para cada analito

Analito	Recuperação (%)	Desvio Padrão
ERT	71,2	24,3
CPF	149,0	37,0
NRF	101,6	22,1
SMX	66,0	16,1
CFX	68,5	24,9
TRI	76,7	16,4
TC	70,3	11,4
AZT	76,0	21,1

Pode-se observar que todos os analitos tiveram uma recuperação adequada. O ciprofloxacino, entretanto, apresentou uma recuperação acima de 100%. Este fato pode ser explicado em parte devido ao fato de que esse analito apresenta um aumento na intensidade na presença de matriz, o que pode ser observado no gráfico de efeito de matriz pela comparação de curvas analíticas na fase móvel e na matriz. A curva na matriz do ciprofloxacino fica

posicionada acima da curva na fase móvel, o que demonstra que a intensidade do sinal do analito é maior na matriz.

5.7.2 Linearidade e Intervalo de Trabalho

As equações de reta resultantes para os analitos são apresentadas na Tabela 14, juntamente com seu coeficiente de determinação r^2 . Para este trabalho, foi estipulado que o valor de r^2 deveria ser superior a 0,95 para que uma equação de reta fosse considerada satisfatória.

O intervalo de trabalho selecionado foi de 0,50 a 30,00 $\mu\text{g L}^{-1}$; o ponto inferior da curva variou de analito para analito, uma vez que a menor concentração considerada foi aquela onde a relação sinal/ruído foi superior a 3. O intervalo de trabalho foi selecionado com fim no ponto de concentração igual a 30,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ após a injeção de amostra real e verificação da adequação aos valores de área nessa faixa de concentração.

Tabela 14. Equações de reta e coeficiente de correlação para cada analito.

Analito	Equação da Reta	r^2	Linearidade
Eritromicina	$y = 0,000909 x - 0,000103$	0,999	Satisfatória
Ciprofloxacino	$y = 0,00163 x + 0,00017$	0,997	Satisfatória
Norfloxacino	$y = 0,00360 x - 0,00243$	0,999	Satisfatória
Sulfametoxazol	$y = 0,02142 x + 0,00185$	0,998	Satisfatória
Cefalexina	$y = 0,00837 x + 0,01792$	0,992	Satisfatória
Tetraciclina	$y = 0,01606 x + 0,00047$	0,998	Satisfatória
Trimetoprima	$y = 0,00775 x - 0,00162$	0,999	Satisfatória
Azitromicina	$y = 0,02260 x - 0,01624$	0,996	Satisfatória

O coeficiente de correlação foi superior a 0,99 em todos os casos, e o critério linearidade foi satisfeito para todos os analitos.

As curvas analíticas para cada analito nos intervalos de trabalhos selecionados são apresentadas abaixo, nas Figuras 44 a 51.

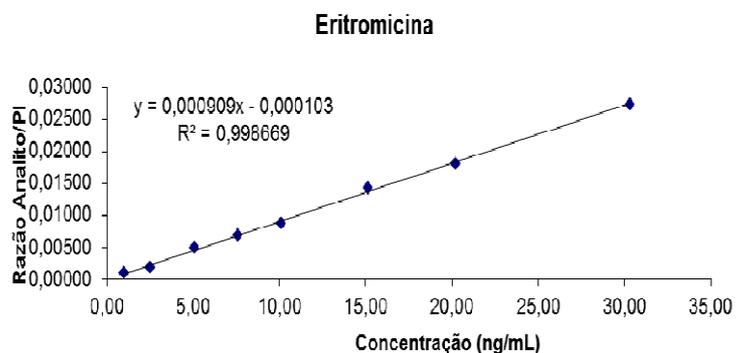


Figura 44. Curva de calibração da eritromicina em fase móvel

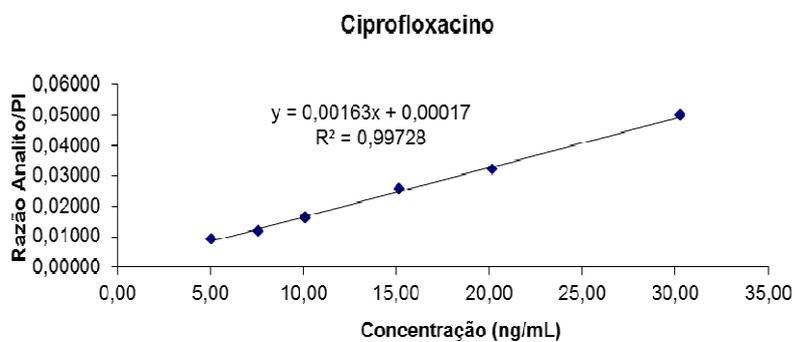


Figura 45. Curva de calibração do ciprofloxacino em fase móvel

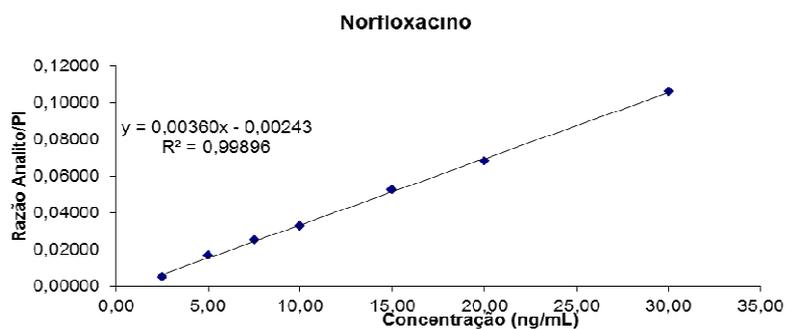


Figura 46. Curva de calibração do norfloxacino em fase móvel

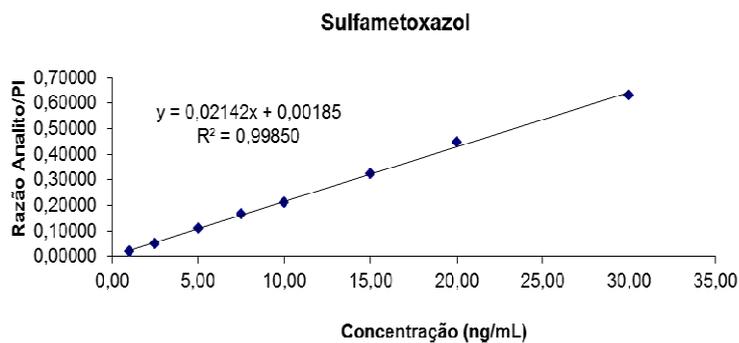


Figura 47. Curva de calibração do sulfametoxazol em fase móvel

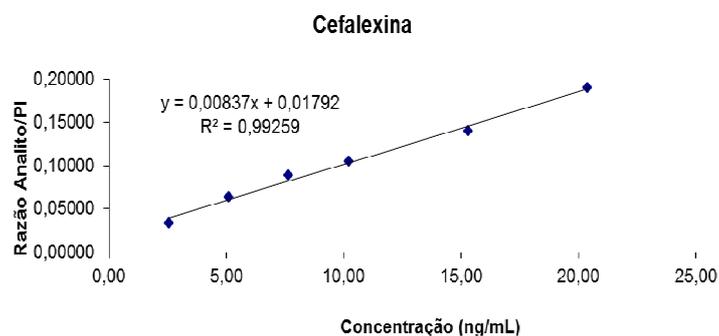


Figura 48. Curva de calibração da cefalexina em fase móvel

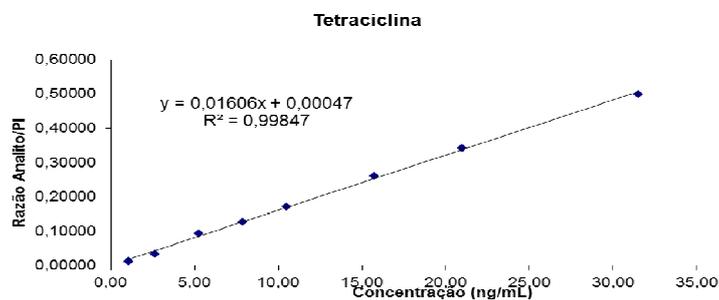


Figura 49. Curva de calibração da tetraciclina em fase móvel

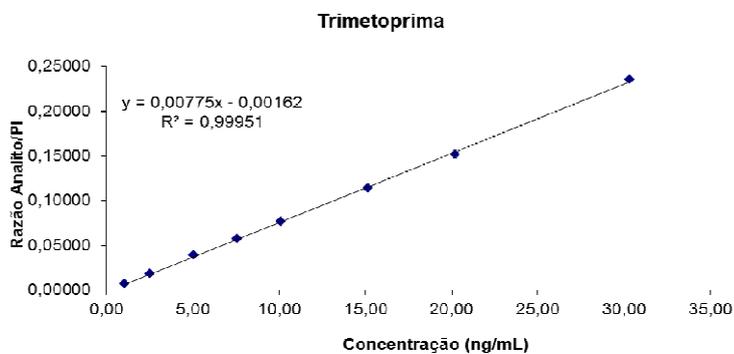


Figura 50. Curva de calibração da trimetoprima em fase móvel

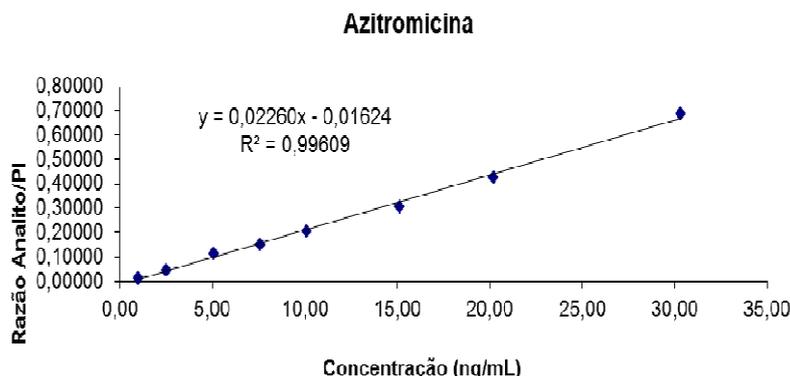


Figura 51. Curva de calibração da azitromicina em fase móvel

5.7.3 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) do equipamento foi calculado através do ponto mais baixo da curva em fase móvel de cada analito. Foram consideradas a altura do pico e a altura do ruído e através desses valores calculou-se a concentração do ruído que, multiplicada por três e dividida pelo fator de concentração (100), nos dá o LD instrumental.

De maneira similar, foi calculado o LD do método, utilizando, entretanto, o ponto mais baixo da curva em matriz de cada analito para fazer o cálculo. O valor calculado foi dividido por 100 vezes, que corresponde ao fator de concentração (FC) aplicado.

As Equações 2 e 3 definem o cálculo utilizado para obtenção do LD instrumental, utilizando os pontos mais baixos da curva em fase móvel.

$$\text{Conc do ruído}(\text{ng L}^{-1}) = \frac{\text{altura do ruído (cm)} \times \text{conc da amostra (ng L}^{-1})}{\text{altura do pico da amostra (cm)}} \quad \text{Eq 2}$$

$$\text{LD (s/FC)} = \text{concentração do ruído (ng L}^{-1}) \times 3 \quad \text{Eq 3}$$

Para o cálculo do limite de detecção do método, aplicam-se as equações 2 e 3 nos pontos da curva em matriz, e ainda divide-se pelo fator de concentração aplicado pela metodologia de EFS, conforme a Equação 4.

$$\text{LD (c/FC)} = \frac{\text{LD (s/FC)}}{100} \quad \text{Eq 4}$$

A Figura 52 mostra como são definidas a altura do pico e altura do ruído, em centímetros, utilizadas nos cálculos acima.

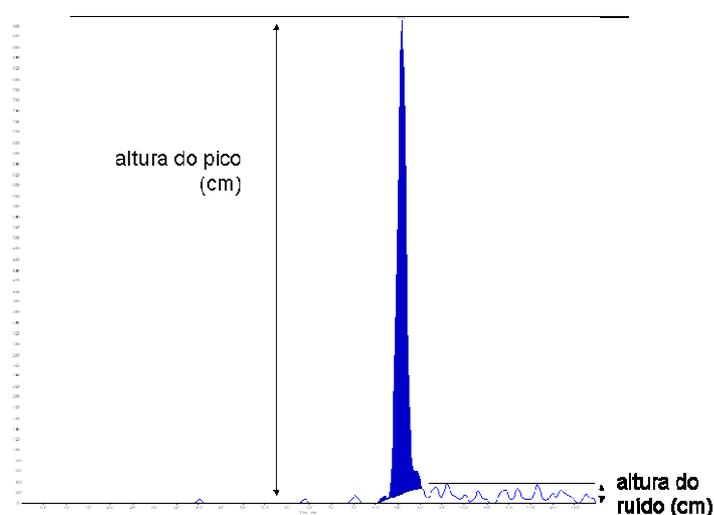


Figura 52. Altura do pico e altura do ruído

De maneira similar ao cálculo do LD, o limite de quantificação LQ foi calculado com base na concentração calculada do ruído. A partir dos menores pontos da curva em fase móvel, foi calculado o LQ instrumental para cada analito, multiplicando-se a concentração do ruído por 10.

O LQ do método foi calculado com base nos menores pontos da curva em matriz, e considerando-se o fator de concentração aplicado (100 vezes).

Para o cálculo do LQ instrumental, utilizou-se o valor obtido como concentração do ruído pela Equação 2, através dos pontos mais baixos da curva em fase móvel, aplicando-o na Equação 5.

$$\text{LQ (s/FC)} = \text{concentração do ruído (ng L}^{-1}\text{)} \times 10 \quad \text{Eq 5}$$

O valor de LQ (s/FC) encontrado para as menores concentrações de cada analito na curva em matriz foi utilizado para o cálculo do LQ do método, conforme Equação 6.

$$\text{LQ (c/FC)} = \frac{\text{LD (s/FC)}}{100} \quad \text{Eq 6}$$

Os valores calculados como limite de detecção e de quantificação instrumental estão apresentados na Tabela 15. Já os valores de limite de detecção e quantificação do método estão na Tabela 16.

Tabela 15. Valores obtidos para o limite de detecção e de quantificação instrumental, obtidos com soluções dos analitos na fase móvel.

Analito	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Eritromicina	0,318	1,061
Ciprofloxacino	0,213	0,712
Norfloxacino	0,901	3,006
Sulfametoxazol	0,047	0,158
Cefalexina	0,181	0,605
Tetraciclina	0,243	0,810
Trimetoprima	0,305	1,019
Azitromicina	0,033	0,110

Tabela 16. Valores obtidos para o limite de detecção e de quantificação do método, obtidos com soluções dos analitos na matriz e considerando o fator de concentração de 100 vezes devido a pré-concentração.

Analito	LD (ng L^{-1})	LQ (ng L^{-1})
Eritromicina	2,14	7,14
Ciprofloxacino	3,27	10,91
Norfloxacino	3,71	12,36
Sulfametoxazol	0,72	2,41
Cefalexina	18,52	61,73
Tetraciclina	3,03	10,12
Trimetoprima	2,36	7,86
Azitromicina	0,49	1,63

5.7.4 Exatidão

A exatidão refere-se à concordância entre o valor real (valor de referência) da concentração de um analito em uma amostra e o estimado pelo processo analítico⁵⁰.

Inicialmente, os valores de concentração para cada amostra foram calculados através de equação da reta de curva analítica obtida no mesmo dia. Os *outliers* de cada grupo foram excluídos, respeitando-se um $n \geq 3$ para cada conjunto de dados.

Os valores de exatidão obtidos são apresentados na Tabela 17.

Tabela 17. Valores de exatidão para os analitos nas concentrações 10, 50 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Analito	Nível de concentração		
	10 $\mu\text{g L}^{-1}$	50 $\mu\text{g L}^{-1}$	100 $\mu\text{g L}^{-1}$
ERT	+ 4,5	- 2,6	- 8,9
CPF	+ 22,7	+ 6,1	+ 8,6
NRF	+ 6,1	+ 7,6	+ 2,0
SMX	- 14,6	- 2,2	- 3,8
CFX	+ 20,5	+ 1,5	+ 5,2
TRI	- 16,8	- 1,1	- 4,5
TC	+ 9,5	+ 19,8	+ 15,5
AZT	+ 6,0	+ 4,7	+ 2,2

Para que os valores de exatidão de um analito estejam conforme, em concentrações maiores ou iguais a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, a variação aceita é - 20 % a + 10 %. Com exceção da TC os demais analitos cumprem esta regra. No caso da TC é conhecido que a mesma epimeriza e a este fato pode-se atribuir seu comportamento diferenciado com relação aos demais antibióticos⁷⁹.

Uma vez que a baixa exatidão só é observada para um analito, pode-se dizer que não há ocorrência de erros sistemáticos que poderiam estar contribuindo para desvios ou tendências nos resultados.

5.7.5 Repetitividade

A repetitividade é definida como a proximidade da concordância entre os resultados em sucessivas determinações do mesmo mensurando realizadas sob as mesmas condições de trabalho⁸⁰.

A repetitividade foi avaliada pela análise de amostras (n=7) em três níveis de concentração (10, 50 e 100 µg L⁻¹). As amostras foram quantificadas por equação da reta obtida por curva analítica determinada no mesmo dia do experimento, e foram calculados os valores de desvio padrão, média e desvio padrão relativo para cada analito em cada nível.

Para avaliação da repetitividade, optou-se pela utilização da equação de Horwitz⁸¹:

$$RSD_r < 2/3 [2^{(1-0,5 \log C)}] \quad \text{Eq 7}$$

onde

RSD_r = desvio padrão relativo das amostras referentes à repetitividade

C = concentração

Para as concentrações de trabalho, os valores de RSD_r são apresentados na Tabela 18. As concentrações de trabalho são baixas, e assim o valor máximo permitido de RSD_r se torna alto. O critério estabelecido é que o valor de RSD_r não deveria ultrapassar 20%.

Tabela 18. Valores máximos de RSD_r para as concentrações utilizadas no experimento

Nível de concentração (µg L ⁻¹)	RSD _r menor que
10	40
50	31,3
100	28

Os valores de desvio padrão relativo para cada analito em cada nível de concentração são apresentados na Tabela 19.

Tabela 19. Desvios padrão relativo para os antibióticos em cada nível de concentração

Analito	Nível de concentração		
	10 µg L ⁻¹	50 µg L ⁻¹	100 µg L ⁻¹
ERT	11,74	3,75	4,04
CPF	10,83	5,89	3,54
NRF	11,45	8,69	4,51
SMX	11,14	3,07	3,59
CFX	3,49	4,90	2,15
TRI	9,11	4,10	2,86
TC	16,29	6,51	4,10
AZT	10,29	7,21	3,22

Os valores de desvio padrão relativo obtidos para os analitos, em cada nível de concentração, não excederam 20% e foram considerados satisfatórios.

5.7.6 Reprodutibilidade

A partir da análise de três lotes, onde houve variação de uma condição em cada um deles, formados por três níveis de concentração e $n = 7$ em cada um deles, foi definido se o método reproduziria ou não os resultados.

As amostras foram quantificadas através de curva analítica construída no mesmo dia dos experimentos, e os valores de concentração dos lotes foram comparados da seguinte maneira: $A \times B$ e $A \times C$.

Para avaliação da reprodutibilidade, optou-se pela utilização da equação de Horwitz⁸¹:

$$RSD_R < 2^{(1 - 0,5 \log C)} \quad \text{Eq 8}$$

onde

RSD_R = desvio padrão relativo das amostras referentes à reprodutibilidade

C = concentração

Para as concentrações de trabalho, os valores de RSD_R são apresentados na Tabela 20. Uma vez que os valores de concentração são muito baixos, o valor de Horwitz para o desvio

padrão relativo máximo permitido se torna alto; por esse motivo, utilizou-se como critério interno $RSD_R < 40$.

Tabela 20. Valores máximos de RSD_R para as concentrações utilizadas no experimento

Nível de concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	RSD_R menor que
10	60
50	47
100	42

A Tabela 21 apresenta os valores de RSD_R obtidos na comparação dos lotes A e B, ou seja, na variação do analista.

Tabela 21. Valores de RSD_R obtidos na comparação de lotes de diferentes analistas

Analitos	Nível de concentração		
	$10 \mu\text{g L}^{-1}$	$50 \mu\text{g L}^{-1}$	$100 \mu\text{g L}^{-1}$
ERT	18,61	4,15	4,83
CPF	18,71	7,40	12,00
NRF	17,56	10,25	12,43
SMX	16,13	3,80	4,11
CFX	14,36	28,18	15,38
TRI	10,11	5,40	4,44
TC	14,58	7,36	4,59
AZT	10,48	7,11	9,35

Da mesma maneira, a Tabela 22 apresenta os valores de RSD_R para cada analito, em cada nível de concentração, quando se comparou os valores de concentração obtidos para os lotes A e C, onde a condição variada foi o equipamento utilizado na análise.

Tabela 22. Valores de RSD_R obtidos na comparação de lotes processados em diferentes equipamentos

Analitos	Nível de concentração		
	10 $\mu\text{g L}^{-1}$	50 $\mu\text{g L}^{-1}$	100 $\mu\text{g L}^{-1}$
ERT	33,61	35,33	38,51
CPF	16,82	8,23	8,01
NRF	18,60	9,53	9,54
SMX	14,66	11,30	10,06
CFX	19,03	17,91	12,84
TRI	33,72	31,20	29,36
TC	16,37	9,57	4,51
AZT	10,75	18,04	16,43

Para todos os compostos, os valores obtidos foram menores que o critério interno estabelecido, $RSD_R < 40$, que é ainda menor que o valor determinado pela equação de Horwitz, que varia entre 42 e 60. Para a grande maioria dos analitos, o valor de RSD_R ficou abaixo de 20. Esse experimento constatou que o método desenvolvido é reprodutível.

5.8 ANÁLISE DE AMOSTRA REAL

Dezesseis amostras provenientes de uma Estação de Tratamento de Esgotos localizada na cidade de Porto Alegre foram tratadas através do processo extrativo desenvolvido e analisadas pelo método de CL-EM/EM.

As amostras da ETE foram coletadas mensalmente de janeiro a agosto de 2011, em pontos localizados na entrada e na saída das águas da planta, que serão chamados Af (afluente) e Ef (efluente). O objetivo da coleta antes e após o tratamento da ETE é relacionar alguma possível diminuição da concentração dos analitos no decorrer do processo de tratamento convencional da água, no caso de termos o analito detectado e este poder ser quantificado.

As amostras foram filtradas de acordo com o procedimento descrito no item referente à coleta de amostras desse trabalho, adicionou-se formaldeído para a preservação e

armazenou-se sob refrigeração até o momento do tratamento, que não deveria exceder o período de um mês, a fim de assegurar que não haveria perdas dos analitos.

As amostras foram processadas em triplicata pelo método de EFS. Os *vials* contendo as amostras foram encaminhados ao LANAGRO-RS, onde foi realizada a detecção e quantificação das amostras pela metodologia desenvolvida, utilizando CL-EM/EM, no modo MRM.

Para a quantificação, optou-se pela utilização de uma curva em fase móvel (CFM), e para aqueles analitos que apresentaram efeito de matriz, utilizou-se a curva em matriz (CM). Corrigiu-se também a concentração de acordo com a recuperação apresentada por cada analito, a fim de considerar possíveis perdas ocorridas durante o processo extrativo.

Na Tabela 23, são apresentadas as concentrações referentes às amostras reais. Os resultados considerados válidos foram aqueles onde a concentração obtida ultrapassou o valor de LQ estipulado para o analito.

Tabela 23. Concentração dos antibióticos, em ng L⁻¹, e desvio padrão relativo (DPR%) no afluente (Af) e efluente (Ef) da ETE, em cada mês

	Concentração (ng L ⁻¹) (DPR%)															
	Janeiro		Fevereiro		Março		Abril		Maio		Junho		Julho		Agosto	
	Af	Ef	Af	Ef	Af	Ef	Af	Ef	Af	Ef	Af	Ef	Af	Ef	Af	Ef
Eritromicina	<LD	<LD	<LD	<LD	35,18 (33,9)	<LD	85,55	<LQ	46,52 (6,9)	<LQ	1586,54 (19,2)	515,25 (14,3)	<LD	<LD	<LD	<LD
Ciprofloxacino	304,00 (1,63)	78,60 (5,0)	326,26 (2,9)	71,41 (11,9)	93,57 (2,5)	90,89 (5,5)	231,70 (16,1)	42,73 (7,2)	349,89 (11,5)	81,68 (19,9)	282,27 (7,4)	<LD	183,74 (27,3)	158,33 (11,2)	297,03 (0,1)	78,90 (6,2)
Norfloxacino	232,53 (4,6)	52,39 (6,7)	214,84 (13,9)	55,80 (11,4)	72,90 (3,8)	58,21 (3,6)	133,99 (11,9)	47,32 (12,1)	113,95 (9,3)	37,73 (21,7)	276,19 (53,0)	<LD	196,91 (64,3)	90,70 (11,7)	184,90 (1,6)	86,09 (6,1)
Sulfametozaxol	34,22 (12,2)	9,79 (21,6)	22,52 (7,5)	9,45 (12,4)	252,24 (1,6)	178,54 (11,4)	510,96 (2,1)	218,09 (6,2)	592,44 (1,8)	393,95 (7,9)	1528,63 (0,4)	915,37 (2,5)	538,15 (11,5)	333,96 (11,5)	305,84 (9,9)	121,82 (5,0)
Cefalexina	<LD	<LD	<LD	<LD	149,59 (5,3)	<LD	<LD	<LD	344,52 (3,8)	<LD	864,78 (88,7)	483,20	1174,02 (9,3)	494,14 (6,4)	955,65 (47,5)	158,31 (35,8)
Tetraciclina	102,38 (19,6)	<LD	152,56 (30,4)	<LD	125,68 (10,4)	20,75 (1,3)	142,94 (17,0)	27,78 (15,5)	104,45 (28,1)	20,34 (16,4)	<LD	<LD	47,68 (82,3)	<LD	<LD	<LD
Trimetoprima	177,14 (5,0)	94,84 (6,4)	105,38 (38,3)	83,87 (11,2)	122,36 (6,1)	70,68 (10,1)	221,52 (3,5)	122,06 (9,8)	355,04 (3,4)	173,52 (13,7)	6376,54 (39,1)	2761,02 (33,8)	289,19 (1,7)	209,14 (4,9)	262,42 (0,1)	129,29 (7,8)
Azitromicina	10,04 (11,6)	10,91 (9,4)	13,72 (3,5)	<LD	12,45 (3,8)	10,01 (5,4)	32,51 (16,7)	20,58 (12,7)	20,00 (6,1)	13,93 (12,1)	148,18 (80,2)	106,78 (15,9)	312,92 (12,4)	62,85 (10,4)	55,34 (0,4)	49,86 (2,4)

DPR(%) = desvio padrão relativo

Todos os antibióticos puderam ser detectados e quantificados. A eritromicina teve a menor incidência, tendo sido detectada sete vezes, das quais cinco vezes pode ser quantificada. Os antibióticos sulfametoxazol, trimetoprima e azitromicina foram detectados e quantificados em todas as amostras, sendo a trimetoprima a que exibiu maior concentração entre todos os antibióticos analisados, no afluente do mês de junho. As fluoroquinolonas ciprofloxacino e norfloxacino foram detectadas e quantificadas todos os meses, com exceção da amostra de saída do mês de junho. A cefalexina foi quantificada oito vezes, e a tetraciclina nove.

Para a maioria dos antibióticos, a maior concentração foi observada nos meses correspondentes ao inverno. A maior concentração dessas substâncias no inverno já foi apontada⁶⁶, e pode ser até duas vezes maiores na estação fria em relação ao verão.

5.8.1 Avaliação da degradação dos analitos durante a permanência na ETE

A avaliação da decomposição dos oito antibióticos em estudo durante o tratamento da ETE foi avaliada pela comparação da sua concentração na entrada e na saída da planta.

A concentração apresentada antes do processo foi considerada como total (100%) e a com os valores de concentração do efluente da ETE calculou-se a fração degradada, em porcentagem. Houve casos em que a concentração do analito ao final do processo foi virtualmente maior que a concentração inicial; nesses casos, considera-se que houve amostragem não-homogênea e/ou erro relacionado ao equipamento analítico, ou ainda, perdas substanciais em relação ao processo extrativo.

A Tabela 24 apresenta a porcentagem de remoção dos analitos, de acordo com as amostras. Neste trabalho, consideramos remoção tanto a passagem dos antibióticos a outros compostos, os produtos de degradação, quanto sua remoção por algum tipo de processo físico. Considerando que o processo principal da ETE estudada é biológico, há remoção dos antibióticos, porém pela natureza destes compostos, eles tendem a ocasionar a morte dos microrganismos presentes no lodo.

Tabela 24. Porcentagem de remoção dos antibióticos após o tratamento da ETE, em cada mês

	% Remoção							
	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago
ERT	-	-	100,0	100,0	100,0	67,5	-	-
CPF	74,1	78,1	2,9	81,6	76,7	100,0	13,8	73,4
NRF	77,5	74,0	20,1	64,7	66,9	100,0	53,9	53,4
SMX	71,4	58,0	29,2	57,3	33,5	40,1	37,9	60,2
CFX	-	-	100,0	-	100,0	44,1	57,9	83,4
TC	100,0	100,0	83,5	80,6	80,5	-	-	-
TRI	46,5	20,4	42,2	44,9	51,1	56,7	27,7	50,7
AZT	-8,7	100,0	19,6	36,7	30,3	27,9	79,9	9,9

As maiores taxas de remoção foram apresentadas pela tetraciclina, que variaram de 80,5 a 100%, seguida da eritromicina, que foram de 67,5 a 100%. A cefalexina foi integralmente removida nos meses de março e maio, e nos meses subsequentes sua remoção variou de 44,1 a 83,4%. Ciprofloxacino e norfloxacino tiveram 100% de diminuição da concentração no mês de junho, e nos demais meses as taxas variaram consideravelmente, de 2,9 a 81,6%. A azitromicina teve remoção completa no mês de fevereiro, nos demais meses a remoção variou de 9,9 a 19,9%, com exceção do mês de janeiro, onde apresentou remoção negativa, possivelmente relacionada ao desvio padrão da análise. A trimetoprima manteve taxas na faixa dos 50%, e a remoção do sulfametoxazol variou de 29,9 a 71,4%.

Pode-se afirmar que para a maioria dos analitos, ocorreu degradação durante o processo convencional de tratamento de efluentes. Entretanto, também é possível observar que essa decomposição, na maioria das vezes, é incompleta. Para que haja decomposição completa, muitos estudos de processos oxidativos avançados vêm sendo desenvolvidos, e sugerem que é possível uma remoção eficiente destes compostos.

6 CONCLUSÃO

Este trabalho apresentou os resultados da validação de uma metodologia analítica por CL-EM/EM para determinação de oito antibióticos de diversas classes em amostras ambientais aquosas. A principal dificuldade encontrada foi analisar em um mesmo método estes compostos devido a diversidade química dos mesmos, principalmente com relação à pré-concentração.

A interferência da matriz é mais evidente no preparo de amostra em si do que na análise instrumental, uma vez que a supressão iônica, apesar de existente não afetou a faixa de tempo de retenção de eluição dos compostos.

O método se mostrou linear na faixa de trabalho estabelecida, apresentou LD e LQ baixos, preencheu os critérios de exatidão, repetitividade e reprodutibilidade e, portanto, mostrou desempenho adequado para a quantificação dos compostos no nível de concentração exigido.

Foram processadas 16 amostras ambientais oriundas de ETE da cidade de Porto Alegre. Foi possível detectar e quantificar todos os analitos. A eritromicina apresentou menor incidência, e sulfametoxazol, trimetoprima e azitromicina foram detectadas e quantificadas em todas as amostras. A maior concentração foi observada para a trimetoprima no mês de junho, período que, de maneira geral, apresentou as maiores concentrações para todos antibióticos, fato justificado na literatura, por ser período de inverno.

As taxas de remoção dos compostos após o tratamento da ETE variaram de 2,9 a 100%. A tetraciclina apresentou as maiores taxas (80,5 a 100%). De maneira geral, os antibióticos apresentaram decréscimo na concentração, confirmando dados apresentados em outros trabalhos da literatura, onde se observa que a remoção para estes resíduos ocorre de forma parcial.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kummerer, K., *Chemosphere* **2009**, 417-434.
2. Kummerer, K., *Journal of Environmental Management* **2009**, 2354-2366.
3. Kim, S.; Cho, J.; Kim, I.; Vanderford, B.; Snyder, S., *Water Research* **2007**, 1013-1021.
4. Petrovic, M.; Hernando, M.; Diaz-Cruz, M.; Barcelo, D., *Journal of Chromatography A* **2005**, 1-14.
5. Langin, A.; Alexy, R.; Konig, A.; Kummerer, K., *Chemosphere* **2009**, 347-354.
6. Wise, R., *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2002**, 585-586.
7. Elmolla, E.; Chaudhuri, M., *Journal of Hazardous Materials* **2010**, 445-449.
8. Departamento Municipal de Águas e Esgotos. Plano Diretor de Esgotos. 5ª edição ed.; Prefeitura Municipal de Porto Alegre: 2009.
9. Elmolla, E.; Chaudhuri, M., *Journal of Hazardous Materials* **2009**, 1476-1481.
10. Gros, M.; Petrovic, M.; Ginebreda, A.; Barcelo, D., *Environment International* **2010**, 15-26.
11. Abellan, M.; Gimenez, J.; Esplugas, S., *Catalysis Today* **2009**, 131-136.
12. Kuster, M.; Alda, M. J. L. d.; Hernando, M. D.; Petrovic, M.; Martín-Alonso, J.; Barcelo, D., *Journal of Hydrology* **2008**, 358, 112-123.
13. Gomez, M.; Petrovic, M.; Fernandez-Alba, A.; Barcelo, D., *Journal of Chromatography A* **2006**, 224-233.
14. Nakata, H.; Kannan, K.; Jones, P.; Giesy, J., *Chemosphere* **2005**, 759-766.
15. Bila, D.; Dezotti, M., *Quimica Nova* **2003**, 523-530.
16. Stumpf, M.; Ternes, T.; Wilken, R.; Rodrigues, S.; Baumann, W., *Science of the Total Environment* **1999**, 135-141.
17. Segura, P.; Gagnon, C.; Sauve, S., *Analytica Chimica Acta* **2007**, 147-157.
18. Bueno, M.; Aguera, A.; Gomez, M.; Hernando, M.; Garcia-Reyes, J.; Fernandez-Alba, A., *Analytical Chemistry* **2007**, 9372-9384.
19. Jelic, A.; Petrovic, M.; Barcelo, D., *Talanta* **2009**, 363-371.
20. Jia, A.; Xiao, Y.; Hu, J.; Asami, M.; Kunikane, S., *Journal of Chromatography A* **2009**, 4655-4662.
21. Ferrer, I.; Zweigenbaum, J.; Thurman, E., *Journal of Chromatography A* **2010**, 5674-5686.
22. Koo, S.; Jo, C.; Shin, S.; Myung, S., *Bulletin of the Korean Chemical Society* **2010**, 1192-1198.
23. Diaz-Cruz, M.; Garcia-Galan, M.; Barcelo, D., *Journal of Chromatography A* **2008**, 50-59.
24. Trovo, A.; Nogueira, R.; Aguera, A.; Fernandez-Alba, A.; Sirtori, C.; Malato, S., *Water Research* **2009**, 3922-3931.
25. Guimaraes, D.; Momesso, L.; Pupo, M., *Quimica Nova* **2010**, 667-679.
26. Korolkovas, A.; Burckhalter, J. H., *Química Farmacêutica*. Guanabara Koogan: 2008; p 783.
27. Peters, D.; Friedel, H.; McTavish, D., *Drugs* **1992**, 750-799.
28. Booth, N. H.; McDonald, L. E., *Farmacologia e Terapêutica em Veterinária*. Sexta Edição ed.; Editora Guanabara Koogan S.A.: Rio de Janeiro, 1992; p 1000.
29. de Paula, F. C. C. R. Desenvolvimento de um método para quantificação simultânea de Sulfametoxazol e trimetoprima em ovos de galinha utilizando a cromatografia Líquida de Alta Eficiência Bidimensional. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.

30. Krause, L. G. T. Degradação do Antibiótico Sulfametoxazol por Ozonização e Avaliação da Atividade Antimicrobiana. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.
31. Kubota, D. Estudo Físico-Químico do Complexo de Inclusão do Fármaco Trimetoprim com a β Ciclodextrina Aleatoriamente Metilada. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2010.
32. da Silva, J. M. B.; Hollenbach, C. B. Fluoroquinolonas X Resistência Bacteriana na Medicina Veterinária *Arquivos do Instituto Biológico* [Online], 2010, p. 363-369.
33. Oka, H.; Ito, Y.; Matsumoto, H., *Journal of Chromatography A* **2000**, 109-133.
34. Chen, Y.; Lin, C., *Journal of Chromatography A* **1998**, 95-105.
35. Smith, R., *Journal of Chromatography A* **2003**, 3-27.
36. Pedroso, R. C. R. Desenvolvimento de Métodos de Análise por CLAE-UV para os antimicrobianos Tetraciclina, Sulfametoxazol e Trimetoprim utilizando materiais à base de sílica e poliméricos como sistemas de pré-concentração. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.
37. Jin, H.; Kumar, A.; Paik, D.; Ha, K.; Yoo, Y.; Lee, Y., *Microchemical Journal* **2010**, 139-147.
38. Sui, Q.; Huang, J.; Deng, S.; Yu, G.; Fan, Q., *Water Research* **2010**, 417-426.
39. Martin, J.; Santos, J.; Aparicio, I.; Alonso, E., *Journal of Separation Science* **2010**, 1760-1766.
40. Gros, M.; Petrovic, M.; Barcelo, D., *Talanta* **2006**, 678-690.
41. Seifrtova, M.; Aufartova, J.; Vytlačilova, J.; Pena, A.; Solich, P.; Novakova, L., *Journal of Separation Science* **2010**, 2094-2108.
42. Waters Corporation. Oasis HLB: Sample Extraction Products. 1998.
43. Renew, J.; Huang, C., *Journal of Chromatography A* **2004**, 1042 (1-2), 113-121.
44. De Alwis, H.; Heller, D., *Journal of Chromatography A* **2010**, 1217 (18), 3076-3084.
45. Bueno, M. J. M.; Aguera, A.; Hernando, M. D.; Gomez, M. J.; Fernandez-Alba, A. R., *Journal of Chromatography A* **2009**, 1216, 5995-6002.
46. Tong, L.; Li, P.; Wang, Y.; Zhu, K., *Chemosphere* **2009**, 1090-1097.
47. Petrovic, M.; Farre, M.; de Alda, M.; Perez, S.; Postigo, C.; Kock, M.; Radjenovic, J.; Gros, M.; Barcelo, D., *Journal of Chromatography A* **2010**, 4004-4017.
48. Applied Biosystems. API 5000 LC/MS/MS System - Operator's Manual. MDS Sciex. Ed. 2005.
49. Moracci, L. F. S. Resíduos de Agrotóxicos em Lodo de Estação de Tratamento de Água: Validação de Metodologia Analítica Utilizando Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas em Tandem (LC-MS/MS). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
50. INMETRO, Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. In *DOQ-CGCRE-008*. Ed. 2003.
51. Luo, Y.; Xu, L.; Rysz, M.; Wang, Y.; Zhang, H.; Alvarez, P. J. J., *Environmental Science & Technology* **2011**, 45 (1827-1833).
52. Vulliet, E.; Cren-Olivé, C.; Grenier-Loustalot, M.-F., *Environment Chemical Letters* **2011**, 9, 103-114.
53. Wei, R.; Ge, F.; Huang, S.; Chen, M.; Wang, R., *Chemosphere* **2011**, 82, 1408-1414.
54. Zhou, L.-J.; Ying, G.-G.; Zhao, J.-L.; Yang, J.-F.; Wang, L.; Yang, B.; Liu, S., *Environmental Pollution* **2011**, 159, 1877-1885.
55. Gracia-Lor, E.; Sancho, J. V.; Hernández, F., *Journal of Chromatography A* **2011**, 1218, 2264-2275.
56. Boleda, M. R.; Galceran, M. T.; Ventura, F., *Environmental Pollution* **2011**, 159, 1584-1591.

57. Rodriguez, E.; Navarro-Villoslada, F.; Benito-Pena, E.; Marazuela, M.; Moreno-Bondi, M., *Analytical Chemistry* **2011**, 83 (6), 2046-2055.
58. Zou, S.; Xu, W.; Zhang, R.; Tang, J.; Chen, Y.; Zhang, G., *Environmental Pollution* **2011**, 159, 2913-2920.
59. Behera, S. K.; Kim, H. W.; Oh, J.-E.; Park, H.-S., *Science of the Total Environment* **2011**, 409, 4351-4360.
60. Tong, C.; Zhuo, X.; Guo, Y., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**, 59, 7303-7309.
61. Kleywegt, S.; Pileggi, V.; Yang, P.; Hao, C.; Zhao, X.; Rocks, C.; Thach, S.; Cheung, P.; Whitehead, B., *Science of the Total Environment* **2011**, 409, 1481-1488.
62. Agência Nacional das Águas. www.ana.gov.br (acesso em 05/10/2011).
63. Tchobanoglous, G.; Burton, F. L.; Stensel, H. D., *Wastewater Engineering, Treatment and Reuse*. 4th Ed; McGraw-Hill: 2003.
64. Chaves, E. S., Esgotos. Florianópolis, 2008.
65. Chang, X.; Meyer, M.; Liu, X.; Zhao, Q.; Chen, H.; Chen, J.; Qiu, Z.; Yang, L.; Cao, J.; Shu, W., *Environmental Pollution* **2010**, 1444-1450.
66. Li, B.; Zhang, T.; Xu, Z.; Fang, H. H. P., *Analytica Chimica Acta* **2009**, 645, 64-72.
67. Pailler, J.-Y.; Krein, A.; Pfister, L.; Hoffmann, L.; Guignard, C., *Science of the Total Environment* **2009**, 407, 4736 - 4743.
68. Hartig, C.; Storm, T.; Jekel, M., *Journal of Chromatography A* **1999**, 163-173.
69. Radjenovic, J.; Petrovic, M.; Barcelo, D., *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2007**, 1365-1377.
70. Langford, K. H.; Thomas, K. V., *Environment International* **2009**, 35, 766-770.
71. Garcia-Galan, M.; Diaz-Cruz, M.; Barcelo, D., *Talanta* **2010**, 355-366.
72. Roberts, P. H.; Thomas, K. V., *Science of the Total Environmental* **2006**, 356, 143-153.
73. Seifrtová, M.; Pena, A.; Lino, C. M.; Solich, P., *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2008**, 391, 799-805.
74. Watkinson, A. J.; Murby, E. J.; Kolpin, D. W.; Constanzo, S. D., *Science of the Total Environmental* **2009**, 407, 2711-2723.
75. Sahar, E.; David, I.; Gelman, Y.; Chikurel, H.; Aharon, A.; Messalem, R.; Brenner, A., *Desalination* **2011**, 273, 142-147.
76. Fritz, J. S., *Analytical Solid-Phase Extraction*. John Wiley & Sons, Inc.: 1999; p 209.
77. Taylor, P., *Clinical Biochemistry* **2005**, 38 (4), 328-334.
78. Bonfiglio, R.; King, R.; Olah, T.; Merkle, K., *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1999**, 13 (12), 1175-1185.
79. Pedroso, R. C. R.; Peralba, M. d. C. R.; Santos, J. H. Z. d.; Pizzolato, T. M.; Fröelich, P. E., *Química Nova* **2011**, 34, 206 - 212.
80. Eurachem Work Group. The Fitness for Purpose of Analytical Methods. EURACHEM: 1998.
81. CIPAC, Guidelines on method validation to be performed in support of analytical methods for agrochemical formulations. In 3807, CIPAC.