

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

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS DE ANÁLISE POR CLAE-UV
PARA OS ANTIMICROBIANOS TETRACICLINA,
SULFAMETOXAZOL E TRIMETOPRIMA UTILIZANDO
MATERIAIS À BASE DE SÍLICA E POLIMÉRICOS COMO
SISTEMAS DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO**

Rosana Cristina Ribeiro Pedroso

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, 2007

O presente trabalho foi realizado entre julho de 2005 e outubro de 2007, no Instituto de Química da UFRGS, sob orientação da Professora Doutora Tânia Mara Pizzolato e co-orientação do Professor Doutor Pedro Fröhlich (Faculdade de Farmácia / UFRGS) e inteiramente pela autora.

Rosana Cristina Ribeiro Pedroso

Esta Dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de **MESTRE EM QUÍMICA**, e aprovada em sua forma final, pela orientadora, pelo co-orientador e pela Comissão Examinadora, no Programa de Pós-Graduação em Química da UFRGS.

Orientadora: Doutora Tânia Mara Pizzolato

Co-orientador: Doutor Pedro Fröhlich

Comissão Examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Martha Bohrer Adaime
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

Prof^ª. Dr^ª. Maria Teresa Raya-Rodriguez
Universidade Federal do Rio grande do Sul – UFRGS

Prof^ª. Dr^ª. Liane Lucy de Lucca Freitas
Universidade Federal do Rio grande do Sul – UFRGS

Coordenador da Pós-Graduação:

Prof^ª. Dr^ª. Nadya Pesce da Silveira

Ao meu marido Alexandre pelo amor e compreensão durante este período de trabalho.

À minha família, mãe, irmãs, irmãos e sobrinhos queridos, berço genético da minha conduta e persistência.

*Não há caminhos que não possam ser abertos para pessoas
que nunca desistem.*

AGRADECIMENTOS

À professora Tânia Pizzolato e ao professor Pedro Fröhlich pela orientação e acolhida, nesse período de aprendizado.

Aos colegas e amigos Sandra Azevedo, Susinéia da Silva, João Pocos, Elanir Zanette, Luiza Monti, Cláudia Brum, Anelise Schaurich e Boaventura Velho do LAFERGS/FEPPS pelo incentivo e compreensão.

Ao colega e amigo Airton Monza pela experiência de pós-graduação e clareza repassada a mim nos momentos difíceis.

À Jozi F. Estanislau pelo apoio e amizade desses últimos meses.

Aos familiares e amigos pelo carinho e atenção.

À direção da FEPPS por disponibilizar-me tempo para que eu pudesse realizar este trabalho.

Às colegas Mary e Carmen do laboratório de medicamentos do LACEN/FEPPS.

Ao arquiteto Sérgio Soares pela visão e boa vontade de ter-me conduzido à direção do DMAE.

Às biólogas Sônia Krigger e Maria da Graça Ortolan e à equipe de coleta do DMAE: Ricardo, Ivan e Rogério.

E especial agradecimento à minha mãe Clotildes pelo amor incondicional, às minhas irmãs Rosângela e Tânia pela presença e amor, aos meus irmãos, sobrinhos, cunhados, cunhadas e a minha querida sobrinha Patrícia pela dedicação e amor.

ÍNDICE

| | |
|---|------|
| ÍNDICE..... | I |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | V |
| ÍNDICE DE TABELAS..... | VII |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS..... | VIII |
| RESUMO..... | XI |
| ABSTRACT..... | XII |
| | |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1. Objetivos..... | 2 |
| 1.1.1. Objetivo geral..... | 2 |
| 1.1.2. Objetivos específicos..... | 3 |
| | |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 4 |
| 2.1. Contextualização, ocorrência, destino e efeitos de fármacos no meio ambiente..... | 4 |
| 2.2. Poluentes emergentes, impacto ambiental e análise..... | 7 |
| 2.3. Legislação, avaliação ambiental de fármacos de uso humano..... | 8 |
| 2.4. Tetraciclina, sulfametoxazol e trimetoprima..... | 14 |
| 2.4.1. Tetraciclina..... | 14 |
| 2.4.2. Sulfametoxazol/trimetoprima..... | 16 |
| 2.5. Preparação de amostras aquosas ambientais..... | 17 |
| 2.5.1. Extração em fase sólida..... | 18 |
| 2.5.2. Volume de quebra..... | 19 |
| 2.6. Adsorventes utilizados na extração em fase sólida..... | 20 |
| 2.7. Determinação de antimicrobianos (tetraciclina, sulfametoxazol e trimetoprima) por cromatografia líquida de alta eficiência em diferentes matrizes..... | 23 |
| 2.8. Avaliação de desempenho da metodologia de quantificação de tetraciclina, sulfametoxazol e trimetoprima empregando extração em fase sólida..... | 38 |
| | |
| 3. PARTE EXPERIMENTAL..... | 46 |
| 3.1. Materiais..... | 46 |

| | |
|---|----|
| 3.1.1. Solventes..... | 46 |
| 3.1.2. Reagentes..... | 46 |
| 3.1.3. Padrões..... | 46 |
| 3.1.4. Fases sólidas à base de sílicas..... | 47 |
| 3.1.5. Fases sólidas poliméricas..... | 47 |
| 3.1.6. Outras fases sólidas..... | 48 |
| 3.2. Métodos..... | 48 |
| 3.2.1. Preparação das soluções padrão estoque e de trabalho..... | 48 |
| 3.2.2. Fases móveis para as análises dos antimicrobianos por cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV (CLAE/UV)..... | 49 |
| 3.2.3. Determinação simultânea da tetraciclina, sulfametoxazol e trimetoprima por CLAE/UV..... | 49 |
| 3.2.4. Estabilidade das soluções aquosa de tetraciclina, sulfametoxazol e trimetoprima..... | 50 |
| 3.2.5. Avaliação do perfil cromatográfico dos métodos de quantificação dos antimicrobianos..... | 50 |
| 3.2.6. Avaliação dos parâmetros de desempenho do método de quantificação dos antimicrobianos: seletividade, limite de detecção instrumental, limite de quantificação instrumental, curva analítica (linearidade) e intervalo..... | 50 |
| 3.2.7. Estudo de adsorção/dessorção das fases sólidas frente à tetraciclina, sulfametoxazol e trimetoprima..... | 51 |
| 3.2.8. Planejamento experimental..... | 54 |
| 3.2.9. Determinação do volume de quebra..... | 54 |
| 3.3. Equipamentos..... | 55 |
| 3.4. Limpeza dos materiais de laboratório..... | 56 |
| 3.5. Áreas de estudo – água potável e água do arroio Dilúvio..... | 57 |
| 3.5.1. Água potável..... | 57 |
| 3.5.2. Descrição do arroio Dilúvio da região de Porto Alegre (RGS) Brasil..... | 57 |
| 3.5.2.1. Seleção dos pontos de amostragem..... | 58 |
| 3.5.2.2. Coleta, técnica de amostragem, preservação e preparação das amostras de água do arroio..... | 60 |
| 3.6. Avaliação dos parâmetros de desempenho na extração em fase sólida na matriz de água do arroio Dilúvio e na água potável: curvas analíticas (linearidade), | |

| | |
|---|----|
| intervalo, limite de detecção do método, limite de quantificação do método, precisão e exatidão para determinação de tetraciclina, sulfametoxazol e trimetoprima..... | 60 |
| 3.7. Quantificação dos antimicrobianos nas amostras de água do arroio Dilúvio..... | 61 |
| | |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES..... | 62 |
| 4.1. Determinação simultânea de tetraciclina, sulfametoxazol e trimetoprima por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de UV (CLAE/UV)..... | 62 |
| 4.2. Seleção da fase móvel para a quantificação de tetraciclina..... | 63 |
| 4.3. Estabilidade da solução aquosa de tetraciclina..... | 65 |
| 4.4. Avaliação do perfil cromatográfico do método de quantificação de tetraciclina..... | 66 |
| 4.5. Parâmetros de desempenho do método de quantificação de tetraciclina..... | 67 |
| 4.5.1. Seletividade..... | 67 |
| 4.5.2. Limite de detecção instrumental (LDI), limite de quantificação instrumental (LQI)..... | 68 |
| 4.5.3. Curva analítica (linearidade) e intervalo..... | 68 |
| 4.6. Estudo de adsorção/dessorção das fases sólidas frente à tetraciclina..... | 68 |
| 4.7. Volume de quebra de TC em água ultrapura e limite de detecção e de quantificação do método..... | 73 |
| 4.8. Parâmetros de desempenho de extração em fase sólida na matriz de água do arroio Dilúvio e na água potável na determinação de tetraciclina..... | 74 |
| 4.8.1. Curva analítica (linearidade) e intervalo..... | 74 |
| 4.8.2. Volume de Quebra..... | 74 |
| 4.8.3. Limite de detecção do método (LDM), limite de quantificação do método (LQM) e precisão..... | 75 |
| 4.8.4. Exatidão..... | 76 |
| 4.9. Quantificação de tetraciclina na amostra de água do arroio Dilúvio..... | 76 |
| 4.10. Estabilidade da solução aquosa de sulfametoxazol e trimetoprima..... | 78 |
| 4.11. Avaliação do perfil cromatográfico do método de quantificação de sulfametoxazol e trimetoprima..... | 78 |
| 4.12. Parâmetros de desempenho do método de quantificação de sulfametoxazol e trimetoprima..... | 79 |
| 4.12.1. Seletividade..... | 79 |

| | |
|---|-----|
| 4.12.2. Limite de detecção instrumental, limite de quantificação instrumental..... | 79 |
| 4.12.3. Curva analítica (linearidade) e intervalo..... | 80 |
| 4.13. Estudo de adsorção/dessorção das fases sólidas frente a sulfametoxazol e trimetoprima..... | 80 |
| 4.14. Volume de quebra de SMX e TM em água ultrapura e limite de detecção e quantificação do método..... | 84 |
| 4.15. Parâmetros de desempenho de extração em fase sólida na matriz de água do arroio Dilúvio e na água potável na determinação de Sulfametoxazol e Trimetoprima..... | 85 |
| 4.15.1. Curva analítica (linearidade) e intervalo..... | 85 |
| 4.15.2. Volume de Quebra..... | 85 |
| 4.15.3. Limite de detecção do método, limite de quantificação do método e precisão..... | 86 |
| 4.15.4. Exatidão..... | 87 |
| 4.16. Quantificação de sulfametoxazol e trimetoprima na amostra de água do arroio Dilúvio..... | 88 |
| 4.17. Outras fases sólidas..... | 88 |
| | |
| 5. CONCLUSÃO..... | 92 |
| | |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS..... | 94 |
| | |
| 7. ANEXOS..... | 100 |

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Rotas de exposição de fármacos usados na medicina humana e veterinária no meio ambiente.

Figura 2: Fórmula estrutural da tetraciclina.

Figura 3: Instabilidade catalítica ácida da tetraciclina.

Figura 4: Fórmulas estruturais de sulfametoxazol e de trimetoprima.

Figura 5: Etapas do procedimento da pré-concentração/extração em sólidos adsorventes.

Figura 6: Estrutura proposta para o adsorvente Zr/SiO₂.

Figura 7: Fórmulas estruturais do estireno, divinilbenzeno e do metacrilato de glicidila.

Figura 8: Adaptador de transferência (A) e coluna de extração montada num sistema a vácuo (B).

Figura 9: O arroio Dilúvio e suas oito estações de amostragem.

Figura 10: Quelação de metais com a TC.

Figura 11: Cromatogramas de produto de degradação de TC nos eluídos do solvente de diluição na sílica 110°C (A) e no polímero SDVB (B).

Figura 12: Cromatograma da solução branco do solvente de diluição da sílica 200°C.

Figura 13: Recuperação da TC nos eluatos.

Figura 14: Recuperação da TC no eluído das fases sólidas poliméricas utilizando solvente de diluição como eluente.

Figura 15: Recuperação da TC no eluído das fases sólidas à base de sílica utilizando solvente de diluição como eluente.

Figura 16: Mecanismo de adsorção entre o antimicrobiano tetraciclina e as sílicas sintetizadas.

Figura 17: Mecanismo de partição entre o antimicrobiano tetraciclina e a sílica comercial.

Figura 18: Volume de quebra da solução de TC em água ultrapura para a sílica 200°C.

Figura 19: Volume de quebra da solução de TC em água potável para a sílica 200°C.

Figura 20: Volume de quebra da solução de TC em água do arroio para a sílica 200°C.

Figura 21: Cromatograma de análise de TC na amostra ambiental na metodologia em estudo.

Figura 22: Cromatograma da solução branco do eluente metanol:água 50% da sílica C18.

Figura 23: Recuperação de SMX e TM nos eluatos das diferentes fases sólidas.

Figura 24: Recuperação de SMX e TM no eluído utilizando metanol 100% e acetonitrila 100%.

Figura 25: Recuperação de SMX e TM no eluído com FM, MeOH e ACN a 50%.

Figura 26: Mecanismo de partição entre os antimicrobianos SMX e TM e a sílica comercial.

Figura 27: Mecanismo de adsorção entre os antimicrobianos SMX e TM e as sílicas sintetizadas.

Figura 28: Volume de quebra da solução de SMX e TM em água ultrapura para a sílica comercial.

Figura 29: Volume de quebra da solução de SMX e TM em água potável para a sílica comercial.

Figura 30: Volume de quebra da solução de SMX e TM em água do arroio para a sílica comercial.

Figura 31: Cromatograma de análise de SMX e TM na amostra ambiental na metodologia em estudo.

Figura 32: Avaliação da recuperação de SMX e TM nos eluatos das novas sílicas.

Figura 33: Avaliação da recuperação de SMX e TM utilizando FM como eluente nas diferentes sílicas.

Figura 34: Avaliação da recuperação de SMX e TM utilizando metanol:água (50:50) como eluente nas diferentes sílicas.

Figura 35: Avaliação da recuperação de SMX e TM utilizando acetonitrila:água (50:50) como eluente nas diferentes sílicas.

Figura 36: Cromatogramas da solução branco ACN 100% da sílica 110°C (A) e solução branco ACN 100% da sílica C18 (B).

Figura 37: Cromatogramas da solução branco ACN 50% da sílica C18 (A) e solução branco FM da sílica 200°C (B).

Figura 38: Cromatogramas da solução branco MeOH 50% da sílica 110°C (A) e solução branco ACN 50% da sílica 110°C (B).

Figura 39: Cromatogramas da solução branco FM da sílica C18 (A) e solução branco FM da sílica 110°C (B).

Figura 40: Cromatogramas da solução branco FM da sílica 450°C (A) e solução branco ACN 50% da sílica 200°C (B).

Figura 41: Cromatogramas da solução branco ACN 100% da sílica 450°C (A) e solução branco ACN 50% da sílica 450°C (B).

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I: Propriedades físico-químicas de TC, SMX e TM.

Tabela II: Determinação de antimicrobianos por CLAE em diferentes matrizes.

Tabela III: Avaliação dos parâmetros de quantificação e/ou validação da Tabela II.

Tabela IV: Características físico-químicas das sílicas utilizadas no estudo de retenção dos antimicrobianos.

Tabela V: Características físico-químicas dos polímeros utilizados no estudo de retenção dos antimicrobianos.

Tabela VI: Características físico-químicas das novas sílicas utilizadas no estudo de retenção dos antimicrobianos.

Tabela VII: Composição das fases móveis na quantificação por CLAE de TC, SMX e TM.

Tabela VIII: Composição dos eluentes utilizados nos estudos de adsorção/dessorção da TC.

Tabela IX: Composição dos eluentes utilizados para os estudos de adsorção/dessorção de SMX e TM.

Tabela X: Planejamento experimental para o estudo de adsorção/dessorção.

Tabela XI: Soluções utilizadas para a determinação do volume de quebra.

Tabela XII: Avaliação da estabilidade da solução aquosa de tetraciclina.

Tabela XIII: Avaliação da qualidade das curvas analíticas nos intervalos propostos na metodologia da TC.

Tabela XIV: Avaliação da qualidade das curvas analíticas nos intervalos propostos na quantificação de amostras ambientais.

Tabela XV: Precisão, LDM e LQM da TC em água potável e da água do arroio.

Tabela XVI: Estudo de estabilidade da solução aquosa de SMX e TM.

Tabela XVII: Avaliação da qualidade das curvas analíticas nos intervalos propostos na metodologia de SMX e TM.

Tabela XVIII: Avaliação da qualidade das curvas analíticas nos intervalos propostos na quantificação de amostras ambientais.

Tabela XIX: Precisão, LDM e LQM da SMX e TM em água potável e da água do arroio.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcAce - Ácido Acético
AcFor - Ácido Fórmico
AcOxa - Ácido Oxálico
AceAmônio - Acetato de Amônio
AceSódio - Acetato de sódio
ACN - Acetonitrila
AIBN - 2,2'-azobisbutironitrila
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC - *Association of Official Analytical Chemists*
ATC - Anidrotetraciclina
CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
Cp₂ZrCl₂ - Diclorobis(ciclopentadienil)zircônio (IV)
CQ - Controle de Qualidade
C8 - Sílica modificada com hidrocarboneto linear C8 (grupo octil)
C18 - Sílica modificada com hidrocarboneto linear C18 (grupo octadecil)
CV - Coeficiente de Variação
DAD - Detector de Arranjo de Diodos
DI - Diâmetro Interno
DP - Desvio Padrão
DPR - Desvio Padrão Relativo
DVB - Divenilbenzeno
EATC - 4-epianidrotetraciclina
EFS - Extração em Fase Sólida
EM - Espectrômetro de Massas
ENT - Efluentes Não Tratados
ET - Efluente Tratado
ETA - Estação de Tratamento de Água
ETE - Estação de Tratamento de Esgoto
ETC - 4-epitetraciclina
EU - *European Union*

FM - Fase Móvel
ForAm - Formato de Amônio
FosDis - Fosfato Dissódio
GARP - Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas
GMA - Metacrilato de Glicidila
GODS - Grupo Octadecil
HCi - Ácido Cítrico
HFos - Ácido Fosfórico
HLB - Balanço Hidrofílico-Lipofílico
IES - Ionizadores de *Eletrospray*
IQPA – Ionizadores Químicos a Pressão Atmosférica, do inglês APCI
ICH - *International Conference on Harmonization*
INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
ISO - *Internacional Standard Organization*
IT – *íon trap*
IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry*
k - Fator de Retenção
LAFERGS - Laboratório Farmacêutico do Estado do Rio Grande do Sul
LAPPS - Laboratório de Produção de Padrões Secundários
LD - Limite de Detecção
Log Kow - logaritmo do coeficiente de partição octanol/água
LQ - Limite de Quantificação
LRM - Limite Residual Máximo
MeOH - Metanol
MON - Material Orgânico Natural
N - Número de Pratos da Coluna
Na₂EDTA - Etilenodiamina Tetraacetato Dissódio
OTC - Oxitetraciclina
pH - Potencial de Hidrogênio
PI – Padrão Interno
pKa - Constante de Dissociação Ácida
PTFE – Politetrafluoroetileno
RP – Fase reversa

Rs - Resolução

S - Estireno

SAs - Sulfonamidas

SMX - Sulfametoxazol

S/R - Razão Sinal Ruído

tC18 – Trifuncional grupo octadecil

TC - Tetraciclina

TCA - Ácido Tricloroacético

TEA - Trietilamina

TF - Fator de alargamento

TFA - Ácido Trifluoroacético

THF - Tetrahydrofurano

TM - Trimetoprima

t_M - Tempo Morto

Tr - Tempo de Retenção

USP 28 - *The United States Pharmacopeia, 28^o ed*

US-FDA - *United States Food and Drug Administration*

UV-Vis – Radiação Ultravioleta e Visível

WHO - *World Health Organization*

RESUMO

Este trabalho apresenta um estudo sobre o desenvolvimento de métodos de análise de alguns antimicrobianos em meio aquoso, utilizando novos materiais à base de sílica e poliméricos como sistemas de pré-concentração/extração em nível de traços. A determinação quantitativa da eficiência de extração e concentração destes materiais, frente aos compostos em estudo, foi realizada através de cromatografia líquida com detector espectrofotométrico na região do ultravioleta (CLAE-UV). Os métodos cromatográficos utilizados são farmacopêicos e por estarem fora do seu escopo de análise de compostos majoritários e de matriz, eles foram re-validados.

A capacidade de retenção das fases sólidas foi avaliada frente aos antimicrobianos Tetraciclina (TC), Sulfametoxazol (SMX) e Trimetoprima (TM) empregando a extração em fase sólida (EFS) *off line* e a quantificação foi conduzida através de dois métodos cromatográficos, um para TC e outro para SMX e TM. Os resultados, expressos em recuperação, ficaram restritos aos sólidos à base de sílica, pois não foi possível concluir este estudo nos polímeros devido às dificuldades de síntese dos mesmos. O melhor percentual de recuperação para TC (70%) foi quando utilizou como eluente o solvente de diluição (Tabela VIII) na sílica 200°C e metanol:água (50:50) para SMX (40%) e TM (90%) na sílica comercial (C18 da Waters).

Alguns parâmetros de desempenho dos melhores resultados foram avaliados nas amostras padrão e nas amostras reais. Os dados foram tratados estatisticamente obtendo-se curvas analíticas com baixa dispersão no conjunto de pontos experimentais e menor incerteza dos coeficientes de regressão, estimados nos intervalos propostos. O volume de quebra foi de 25 mL e o fator de concentração foi de 5 para os três analitos. A precisão foi avaliada pela repetibilidade, obtendo-se coeficientes de variação dentro dos limites de concentração aceitos em análises de traços. Foram avaliados os limites de detecção (3,6 µg/l para TC; 0,3 µg/l para SMX e 0,3 µg/l para TM) e quantificação (12 µg/l para TC; 1,1 µg/l para SMX e 0,9 µg/l para TM) do método, em água do arroio Dilúvio.

As análises das amostras coletadas no arroio Dilúvio de Porto Alegre e na água potável coletada da torneira do Laboratório de Análises Ambientais do Instituto de Química em agosto de 2007 não apresentaram os antimicrobianos em estudo, nos níveis detectáveis pelos métodos.

ABSTRACT

This work presents a study for the development of some methods of analysis of antimicrobials in aqueous medium; using home-made silica-based and polymeric materials as a pre-concentration/extraction system in trace level. The quantitative determination of the efficiency of extraction and concentration of these materials compared to the pharmaceuticals in study was made through liquid chromatography with ultraviolet spectrophotometer detector in the ultraviolet region (CLAE-UV). The chromatographic methods used are pharmacopoeia and because they are out of the target analysis of majority compounds and the source, they were revalidated.

The retention capacity of these solid phases was evaluated considering the antimicrobials: tetracycline (TC), sulfamethoxazol (SMX) and trimetoprim (TMI) using solid-phase extraction (SFE) off line and the quantification was lead through two chromatographic methods, one for TC and another one for SMX and TM. The results, known in recovery, were restricted to silica-based solids; therefore, it was not possible to conclude this study for polymers due to the synthesis difficulties. The best percentage of recovery for TC (70%) was when it was used as eluente solvent of dilution (Table VIII) in 200°C silica and methanol:water (50:50) for SMX (40%) and TM (90%) in commercial silica (C18 Waters).

Some performance parameters were evaluated for standard and for real sample. The data were statistically evaluated resulting in analytical curves with low dispersion in the set of experimental points and lower uncertainty of the coefficients regression, predicted in the intervals considered. The breakthrough volume, in all cases was determined as 25 mL resulting in a concentration factor of 5. The precision was evaluated for analysis repeatability with acceptable coefficient of variation inside of limits of concentration in trace level. The limits of detection (3,6 µg/l for TC; 0,3 µg/l for SMX and 0,3 µg/l for TM) and quantification (12 µg/l for TC; 1,1 µg/l for SMX and 0,9 µg/l for TM) were determined in Dilúvio stream water.

The analyses of the samples collected in Dilúvio stream in Porto Alegre and the tap water collected in the lab, in August 2007 did not present antimicrobials contamination, in the levels detected by the method.

1. INTRODUÇÃO

O monitoramento de fármacos residuais no meio ambiente vem ganhando interesse, nos últimos anos, pois têm sido encontrados em efluentes de estação de tratamento de esgotos e águas naturais em concentrações na faixa de $\mu\text{g/l}$ e ng/l ⁽¹⁾. A principal entrada desses produtos no meio ambiente resulta de suas aplicações em medicina humana e veterinária, que após a administração são parcialmente metabolizados e excretados. Isto é decorrente de que os fármacos são desenvolvidos para serem persistentes, mantendo suas propriedades químicas o bastante para servir ao propósito terapêutico. Assim, 50% a 90% de uma dosagem de fármaco são excretados inalterados podendo persistir no meio ambiente ⁽¹⁾, além de estarem constantemente entrando no ambiente.

Um dos grupos de fármacos residuais que merece uma atenção especial é o dos antimicrobianos. Eles têm sido amplamente discutidos na literatura, devido ao seu potencial de desenvolvimento de bactérias resistentes no meio ambiente ⁽¹⁾. Dentre os antimicrobianos, a tetraciclina, que é produzida a partir de cepas de microrganismos ou como produto semi-sintético, a sulfametoxazol e a trimetoprima, que são antimicrobianos sintéticos, representam três classes de antimicrobianos largamente usados na medicina humana e veterinária ⁽²⁻¹⁰⁾.

Para detecção de fármacos no meio ambiente aquático em nível de traços, a literatura tem descrito métodos baseados na extração em fase sólida (EFS) e subsequente determinação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a espectrômetro de massas (EM) ^(2-4, 6, 10-14). A detecção por espectrometria de massas é usada para assegurar a identificação das substâncias. Detectores de arranjo de diodos (DAD) acoplado a CLAE também têm sido uma alternativa para análise de fármacos. CLAE-DAD e CLAE-UV são bastante utilizados por serem técnicas robustas e por envolverem equipamentos de menor custo do que o CLAE-EM, apesar de não serem detectores específicos como o EM.

A complexidade da matriz ambiental envolve um grande número de compostos que podem interferir em uma amostra, dificultando a análise direta. As técnicas de extração e/ou pré-concentração auxiliam significativamente a análise dos componentes de interesse em matrizes complexas, principalmente em baixas concentrações. Atualmente, a EFS é um dos procedimentos mais empregados para extração e/ou pré-concentração de analitos em

nível de traços em matrizes complexas ou não. A EFS emprega adsorventes empacotados em cartuchos, pelo qual a amostra é percolada, os analitos de interesse são pré-concentrados e posteriormente eluídos para serem analisados. Os mecanismos de retenção envolvidos são idênticos àqueles da cromatografia a líquido em coluna. Atualmente um grande número de adsorventes está disponível comercialmente ⁽¹⁵⁾, no entanto a obtenção de adsorventes produzidos em laboratórios também é uma alternativa promissora.

Nos laboratórios do Instituto de Química da UFRGS, fases sólidas à base de sílica e poliméricas têm sido produzidas com o objetivo de serem empregadas na análise de traços de poluentes orgânicos, em substituição às fases comerciais. Em estudos anteriores, foram preparadas duas fases sólidas resultante do método *grafting*, obtendo-se sílicas funcionalizadas com diclorobis (ciclopentadienil) zircônio (IV) ⁽¹⁶⁾ e outra a partir do método por polimerização radicalar em suspensão, obtendo-se polímeros com diferentes percentagens de metacrilato de glicidila em percentagens fixas de divinilbenzeno, variando a quantidade de estireno ⁽²⁹⁾.

Avaliar a capacidade de adsorção dessas fases frente aos fármacos tetraciclina, sulfametoxazol e trimetoprima, utilizando metodologia para a quantificação dos respectivos antimicrobianos constitui o desafio deste trabalho empregando EFS *off line*.

Para demonstrar que as metodologias empregadas, nas condições em que são praticadas, têm as características necessárias para obtenção de resultados com qualidade, este trabalho se propõe, também, avaliar os parâmetros de desempenho das metodologias, na faixa de concentração usada.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Química Analítica e Ambiental (LQAA) e na Central Analítica do Instituto de Química da UFRGS.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo geral

Desenvolver e avaliar parâmetros de validação nos procedimentos analíticos para determinação de tetraciclina, sulfametoxazol e trimetoprima, em nível de traços, em meio aquoso, utilizando novos materiais à base de sílica e poliméricos como sistemas de pré-concentração.

1.1.2. Objetivos específicos

- a) Implementar as condições experimentais para determinação de tetraciclina (TC), sulfametoxazol (SMX) e trimetoprima (TM) por CLAE-UV, visando a determinação destes compostos;
- b) Avaliar a capacidade de adsorção/dessorção de novas fases sólidas à base de sílica modificada e polimérica, comparando-os com os adsorventes comerciais, frente à TC, SMX e TM, utilizando diferentes eluentes;
- c) Determinar o volume de quebra destes compostos, frente às fases sólidas selecionadas;
- d) Avaliar estatisticamente os parâmetros de desempenho das metodologias selecionadas na faixa de concentração usada;
- e) Avaliar parâmetros de validação nas metodologias para determinação de TC, SMX e TM em matrizes aquosas ambientais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. CONTEXTUALIZAÇÃO, OCORRÊNCIA, DESTINO E EFEITOS DE FÁRMACOS NO MEIO AMBIENTE

O impacto da poluição química, durante as últimas décadas, tem focado quase que exclusivamente nos poluentes convencionais, especialmente nos agrotóxicos/carcinogênicos e intermediários industriais que mostram persistência no meio ambiente ⁽¹⁷⁾. Este espectro de produtos, entretanto, é somente uma parte do potencial poluente. Os fármacos pertencem a um grupo de substâncias que, até recentemente, tem sido expostos ao meio ambiente com muito pouca atenção. A razão pela qual eles podem ser micropoluentes é porque os fármacos são desenvolvidos com a intenção de desempenhar um efeito biológico, ou seja, são lipofílicos, capazes de passar pelas membranas, e são persistentes, pois não são inativados antes de ter o efeito de cura. Assim, os fármacos têm muitas propriedades necessárias para bioacumular e provocar efeitos no ecossistema aquático e terrestre ⁽¹⁸⁾.

Algumas toneladas de medicamentos são produzidas por ano e aplicadas na medicina humana e veterinária. Geralmente, a produção exata não é publicada na literatura ⁽¹⁾. O Brasil junto com os Estados Unidos da América, França e Alemanha constituem os maiores consumidores de medicamentos do mundo ⁽²⁰⁾. Como os números de prescrições de antimicrobianos não estão disponíveis no Brasil, pois esses medicamentos podem ser adquiridos nas farmácias sem prescrição de um médico, pode-se supor que as quantidades de antimicrobianos adquiridos sejam proporcionais ao número de habitantes por região e o risco destas substâncias de entrar no meio ambiente está, portanto presente.

Hoje não se sabe exatamente o destino e os efeitos dos fármacos quando eles são expostos ao meio ambiente, embora exista uma previsão de rotas de fármacos de uso humano e veterinário no meio ambiente ⁽¹⁸⁾ e seus possíveis efeitos ^(1, 19, 26).

A Figura 1 mostra as rotas de exposição de fármacos ao meio ambiente, destino e efeitos.

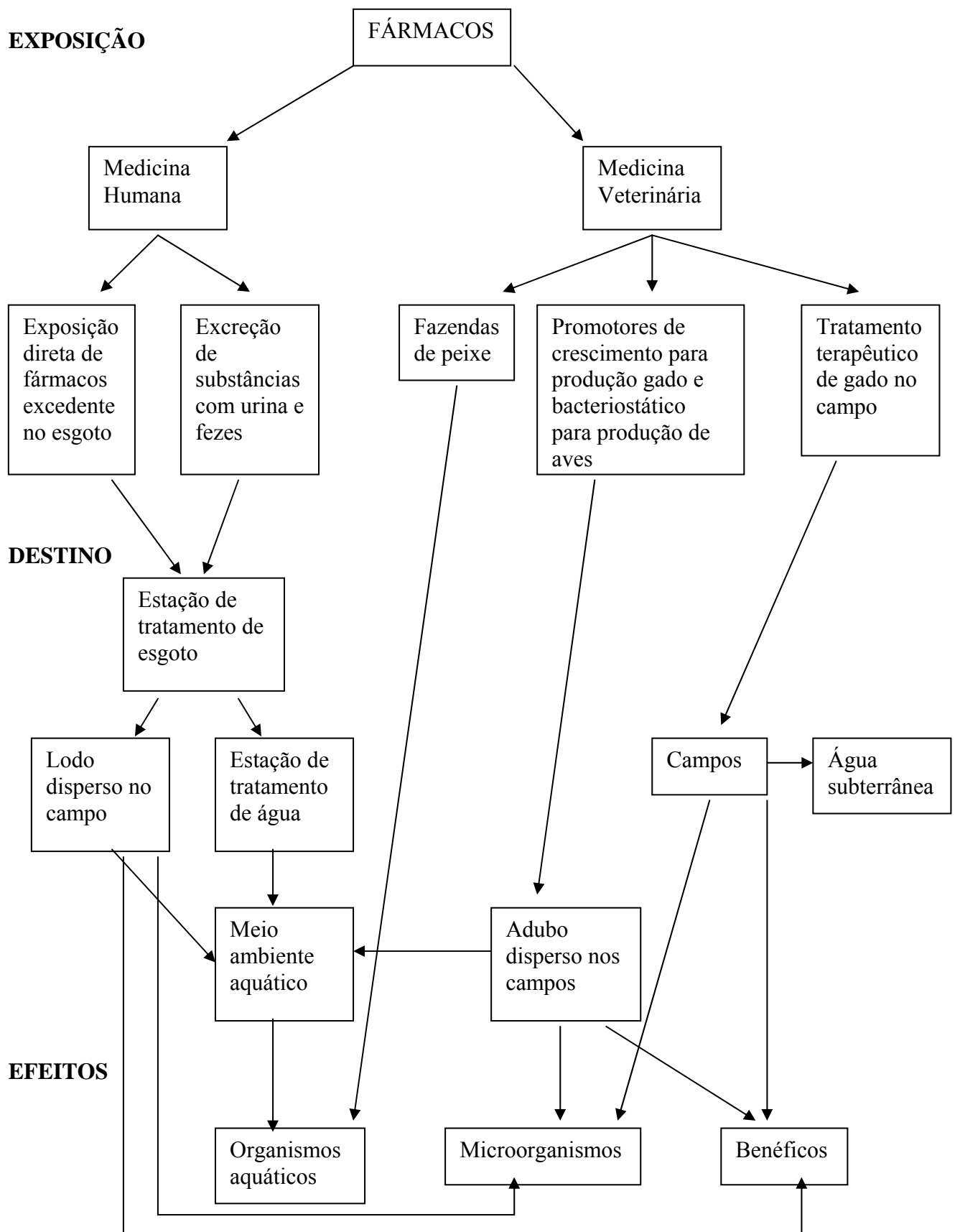


Figura 1: Rotas de exposição de fármacos usados na medicina humana e veterinária no meio ambiente ⁽¹⁸⁾.

Numerosos artigos têm registrado níveis de fármacos em meio aquoso e sólido ⁽⁵⁶⁾. Para os fármacos de uso humano, a principal rota de entrada destes compostos em águas de superfície ambiental, como compostos não alterados ou após transformação pelo metabolismo humano, é via as estações de tratamento de água municipal (ETAs) ⁽⁵⁷⁾. Após a administração e desenvolvimento do efeito terapêutico no corpo humano, os fármacos são excretados no esgoto doméstico como uma mistura de metabólitos, como substâncias inalteradas ou conjugadas com um substituinte inativador ligado à molécula, dependendo da farmacologia do mesmo ⁽¹⁸⁾. Observa-se também que a forma conjugada do fármaco pode converter-se prontamente ao composto inicial ⁽³⁾. A exposição direta dos fármacos excedentes de uma terapia ou mesmo por perda do tempo de validade no esgoto doméstico é uma outra forma de entrada dos fármacos no meio ambiente.

Estudos demonstram que várias dessas substâncias parecem ser persistentes no meio ambiente e não são completamente removidas nas estações de tratamento de esgotos e de água ^(2, 3, 60-64, 66, 67, 69 -73). No Brasil, no entanto, são poucas as cidades que possuem estações de tratamento de esgoto. Sendo assim, essas substâncias resistem também aos processos de tratamento convencional de água, ficando presentes em ambientes aquáticos. Investigações revelam que os fármacos estão presentes em diferentes ambientes aquáticos em faixas de concentrações de $\mu\text{g/l}$ e ng/l ^(1, 5, 13, 16, 19, 21, 61, 65, 68).

Fármacos de uso veterinário também podem entrar no meio ambiente diretamente pela dispersão de estrume usado como fertilizante ⁽⁵⁸⁾, ou pela própria excreção direta na terra na forma inalterada ou de metabólitos em fezes ou urina depois de ter o efeito de cura no animal. Como muitos antibióticos são hidrossolúveis estes compostos podem atingir águas subterrâneas e de superfície através da chuva ⁽⁵¹⁾.

Embora todos os fármacos aprovados pelos órgãos fiscalizadores de governo tenham sido submetidos a um estudo farmacocinético, existe ainda uma considerável falta de conhecimento sobre sua cinética no meio ambiente devido às diferentes variáveis do meio. O consenso científico é que fármacos em baixos níveis detectáveis no meio ambiente não causam um apreciável risco à saúde humana. Entretanto, os possíveis efeitos dessas substâncias na vida aquática não são bem entendidos. Até agora testes convencionais e determinações dos efeitos dos fármacos têm sido baseados pontualmente (curto tempo), com determinação de fatores aplicados aos dados pontuais para extrapolar nos efeitos crônicos (tempo prolongado). No entanto, como mais testes crônicos são registrados, outros mecanismos, tal como farmacologias comparativas estão sendo examinadas ⁽⁵⁹⁾.

2.2. POLUENTES EMERGENTES, IMPACTO AMBIENTAL E ANÁLISE

O desenvolvimento de métodos novos e mais sensíveis para detectar substâncias químicas e determinar seus efeitos biológicos transferiu a atenção da comunidade científica para os contaminantes novos e não regulamentados que não eram, anteriormente, detectados ou não tinham sido considerados como um risco ao meio ambiente. Esse é o caso dos assim chamados “contaminantes emergentes”.

“Contaminantes emergentes” podem ser definidos como poluentes recém identificados ou que anteriormente não eram reconhecidos, mas a principal característica deste grupo é que não necessita persistir no meio ambiente para causar efeitos negativos, visto que suas altas taxas de transformação e remoção são compensadas pelas suas contínuas introduções no meio ambiente ^(21, 34), podendo levar à altas concentrações em longo prazo. Dentre estes estão os fármacos. De todos os poluentes emergentes, os antimicrobianos, devido ao potencial de seleção genética de bactérias resistentes, juntamente com os hormônios, por causa do potencial de indução de efeitos estrogênicos, tais como a feminilização e hermafroditismo, em organismos aquáticos e ultimamente no homem, são provavelmente os de maior preocupação ⁽²¹⁾.

Enquanto existir tecnologias de tratamento produzindo água que satisfaça os padrões regulatórios correntes, tem sido demonstrado que a remoção de muitos contaminantes emergentes, incluindo antibióticos e hormônios, é incompleta ⁽⁷⁴⁾. A incompleta remoção destes compostos de estações de tratamento de água é referida como a principal fonte de liberação no meio ambiente, devendo-se principalmente, às propriedades físico-químicas (baixa degradabilidade). Isto permite a penetração através dos filtros dessas instalações e, portanto colocando o sistema de suprimento de água purificada em risco ⁽⁴⁹⁾.

Os potenciais impactos à vida aquática são caracterizados pela exposição potencial, ou seja, a extensão a qual a vida aquática pode ser exposta aos fármacos, e os potenciais efeitos, isto é, se os compostos estão presentes e a que nível eles podem afetar a vida aquática. Na prática, isto envolve dois conceitos: Concentração Ambiental Estimada (CAE) e a Concentração Sem Efeito Estimada (CSEE). CAE é baseada nas propriedades físicas, químicas e destino biológico da molécula, bem como informação hidrológica nos fluxos dos efluentes das estações de tratamento de esgoto (ETE) e fluxos de água de superfície. O CSEE estima concentrações a qual os efeitos potenciais nos organismos

aquáticos e ecossistemas podem ocorrer. Em geral, se CAE é menor do que CSEE (CAE/CSEE < 1), o risco ambiental é aceito ⁽⁵⁹⁾.

Devido às características físicas e químicas dos antimicrobianos (alta a moderada polaridade e hidrofiliçidade), a técnica de escolha para suas análises é a cromatografia líquida com seus detectores e possibilidades de acoplamentos. A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas é uma técnica sensível e seletiva para determinação de sulfonamidas, mas a derivatização de fármacos instáveis termicamente e não voláteis é necessária antes da análise. A derivatização supera o problema para alguns casos, mas o tempo de preparação aumenta no processo, especialmente com grande quantidade de amostra ⁽⁵³⁾. CLAE é o método mais utilizado e sensível que pode separar uma grande variedade de fármacos, alguns dos quais não são próprios para CG. Outra técnica utilizada para baixos limites de detecção é CLAE com detecção de fluorescência, mas esta técnica requer a derivatização para melhorar as propriedades fluorescentes na detecção. Sempre que possível, a cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas, simples ou no modo *tandem* (MS/MS), é preferida. No entanto, a CLAE acoplada a EM requer cuidados adicionais no que se refere a supressão iônica, especialmente em análises de amostras altamente contaminadas, tais como águas de refugo. Uma solução para esse problema é melhorar o *clean-up* da amostra e quantificar por padrões internos marcados, padronização externa ou adição de padrão ⁽⁴⁹⁾. CLAE-UV é uma técnica cuja sensibilidade do método é menor quando comparada aos métodos CLAE-EM e CLAE-EM/EM, mas torna-se uma ferramenta útil, associada às melhorias de *clean-up*, pois utiliza avaliações mais rápidas nas identificações (quando comparado nos tempos de retenção de padrões) e determinações dos compostos, além de ser uma técnica mais barata comparada com CLAE-EM para análise de rotina de fármacos em amostras ambientais.

2.3. LEGISLAÇÃO, AVALIAÇÃO AMBIENTAL DE FÁRMACOS DE USO HUMANO

Em geral, a legislação é a principal força na química analítica ambiental. Ambientalistas têm focado a atenção no estudo de substâncias químicas cuja presença no meio ambiente têm sido regulamentadas através de várias listas de poluentes prioritários incluídos em diferentes legislações ⁽²¹⁾. No caso dos poluentes emergentes, os quais

incluem os fármacos, eles ainda não estão numa lista regulatória de poluentes ambientais, pois dados sobre suas ocorrências, riscos ambientais e dados ecotoxicológicos estão sendo avaliados⁽⁴⁹⁾.

Em 1969, o NEPA (do inglês: *National Environmental Policy Act*) solicitou às agências federais avaliar os impactos ambientais de suas ações visando assegurar que o público afetado e interessado fosse informado das análises ambientais. O FDA (do inglês: *Food and Drug Administration*) vem solicitando, de acordo com o NEPA, considerações com relação aos impactos ambientais de drogas aprovadas e aplicações biológicas como uma parte dos seus processos regulatórios^(51, 75).

Em 1995, o FDA revisou seus regulamentos para reduzir o número de avaliações ambientais requeridas para as indústrias. Em 1997, o FDA publicou a exclusão das ações que foram identificadas como normalmente não tendo efeito significativo na qualidade do ambiente humano. Em 1998, o FDA publicou um guia – *Guidance for Industry: Environmental Assessment of Human Drug and Biologics Applications*⁽⁷⁵⁾ que fornece informações de quando uma avaliação ambiental deveria ser submetida e como preparar estas avaliações. De acordo com esse guia, a estimativa da concentração de uma substância, no ponto de entrada do meio ambiente aquático, poderia ser calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\text{CIE-aquático } (\mu\text{g/l}) = A \times B \times C \times D,$$

onde:

CIE = concentração de introdução esperada da porção ativa que pode entrar no meio ambiente,

A = kg/ano produzido da porção ativa (molécula ou íon responsável pela ação fisiológica ou farmacológica da substância),

B = l/litros por dia de entrada nas POTWs (*Publicly Owned Treatment Works* – Obras de Tratamento de Propriedade Pública). $1,214 \times 10^{11}$ litros por dia (dado atualizado periodicamente através da Internet: <http://www.epa.gov/owm>.),

C = ano/365 dias,

D = 10^9 $\mu\text{g/kg}$ (fator de conversão).

Esse cálculo assume que toda forma farmacêutica produzida num ano seja consumida e entra no sistema de Obras de Tratamento de Propriedade Pública (ETA), que o uso de medicamentos nos Estados Unidos ocorra em proporção à população e quantidade de água de refugo gerada, e que não exista metabolismo.

De acordo com este guia, drogas e produtos biológicos derivados de fontes naturais ou de sistemas biológicos podem ser considerados naturais mesmo se eles forem sintetizados quimicamente. A caracterização física e química deve ser conduzida para determinar se o composto é mais comum de acumular nos meios aquáticos, terrestres e/ou atmosférico. Solubilidade em água, constante de dissociação, coeficiente de partição octanol /água e constante de pressão de vapor são parâmetros ou testes conduzidos para essa determinação. O coeficiente de partição octanol/água (K_{ow}) é um indicador de um potencial composto não ionizado para adsorver as frações orgânicas do solo, sedimentos ou biosólidos (lodos), um indicador de lipofilicidade. É a razão da solubilidade química em n-octanol e água no equilíbrio; uma medida da lipofilicidade de uma droga é um indicador de sua habilidade de atravessar membranas de células; o logaritmo de K_{ow} é usado como uma estimativa da tendência do produto químico bioacumular ou adsorver aos solos ou sedimentos. Além disso, estudos das propriedades de sorção e dessorção (K_{oc}) de uma substância aos biosólidos deveriam ser considerados se $\log K_{ow}$ é maior do que 3 ou outra propriedade indicar que sorção e dessorção podem ocorrer. Para compostos que se associam ou dissociam em água (dependendo da constante de dissociação), solubilidade em água e coeficiente de partição octanol/água talvez tenham que ser determinados a pH 5 e 9 bem como a pH 7. A concentração esperada na atmosfera não precisa ser calculada para produtos farmacêuticos administrados através da inalação porque, para a maioria destes, a porção ativa não está relacionada ao ar. Em geral, substâncias farmacêuticas são esperadas entrar predominantemente no meio ambiente aquático e, portanto, o foco de qualquer estudo seria nos organismos aquáticos. Se a substância de interesse rapidamente degrada ou adsorve completamente e irreversivelmente aos biosólidos, então o destino e os efeitos no meio ambiente aquático não seriam normalmente considerados. Bioacumulação (processo pelo qual os rejeitos industriais gradualmente acumulam no tecido vivo) ou bioconcentração (processo pelo qual os rejeitos industriais acumulados na água passam diretamente para organismos aquáticos) é um processo complexo e dinâmico que depende da disponibilidade, persistência e propriedades físicas e/ou químicas de um composto no meio ambiente. Em geral, fármacos tendem a não ser muito lipofílicos e são produzidos e/ou usados em quantidades relativamente baixas quando comparados aos produtos químicos industriais. No homem, a maioria dos fármacos é metabolizada a substâncias relacionadas estruturalmente que são mais polares, menos tóxicas e menos farmacologicamente ativas do que os compostos de origem. Isto sugere que existe um

potencial baixo para bioacumulação ou bioconcentração dos fármacos; entretanto devido à extensão do tempo isto conduz a estudos de toxicidade crônica. Um indicador primário do potencial para bioacumulação é o coeficiente de partição octanol/água (K_{ow}) dos compostos. Um alto coeficiente de partição octanol/água indica que o composto tenderá a ser lipofílico. Testes de toxicidade crônica deveriam ser considerados se $\log K_{ow}$ de um composto é maior ou igual a 3,5 sob condições ambientais relevantes (ex., pH 7). Características estruturais (ex. massa molecular, polaridade), que limitam a passagem através das membranas biológicas, ou a falta de biodisponibilidade nos organismos do meio ambiente (ex. adsorção forte no solo) são fatores atenuantes que poderiam ser considerados quando determinar se bioacumulação seria uma preocupação para compostos com $\log K_{ow}$ maior ou igual a 3,5.

A concentração ambiental esperada (CAE) é a concentração da porção ativa ou substância relacionada estruturalmente ou outro composto de interesse na qual os organismos seriam expostos no meio ambiente (ex., água superficial) depois de considerações de, por exemplo, concentração temporal ou fatores tais como diluição, degradação, sorção e/ou bioacumulação. Ajustes na concentração esperada podem ser feitos para fornecer uma CAE. Na maioria dos casos, a concentração ambiental esperada para o meio ambiente aquático seria significativamente menos do que concentração de introdução esperada (CIE) para o meio ambiente aquático devido à diluição. Baseado nos fatores de diluição das POTWs avaliados pelo EPA (*Environmental Protect Agency*), a aplicação de um fator de diluição de 10 ao CIE-aquático para estimar a CAE-aquática é normalmente apropriada ⁽⁷⁵⁾.

Na *European Medicines Agency* (EMA) ⁽⁷⁶⁾, em junho de 2006, foi elaborado pelo *Committee for Medicinal Products for Human Use* (CHMP), um guia: *Guideline on the Environmental Risk Assessment of Medical Products for Human Use*, o qual descreve uma avaliação do potencial dos riscos ambientais de produtos medicinais de uso humano, especificando a abrangência e as bases legais para a avaliação. O escopo e as bases legais desse guia estão de acordo com Artigo 8(3) da Diretiva 2001/83/EC (*European Commission*). De acordo com o anexo II da *Commission Regulation* (EC) n° 1085/2003 avaliação de risco ambiental é também requerida se existe um potencial aumento na exposição ao meio ambiente. Vitaminas, eletrólitos, aminoácidos, peptídeos, proteínas, carboidratos e lipídios são exceções, improváveis de causar um risco significativo ao meio ambiente. A Diretiva 2001/83/EC, como emenda, relata que os riscos ambientais crescem a

partir do uso, estocagem e disposição de medicamentos e os riscos não crescem a partir da síntese ou fabricação de medicamentos. Este guia não se aplica para medicamentos consistindo de organismos geneticamente modificados.

Conforme o guia, a avaliação dos riscos potenciais ao meio ambiente constitui de duas fases: a primeira fase (fase I) estima a exposição da droga no meio ambiente. Baseada em ações limites, a avaliação pode ser determinada. Na segunda fase (fase II) informação sobre o destino e efeitos no meio ambiente é obtida e avaliada. A fase II é dividida em duas: nível A e nível B. Certas substâncias, tais como compostos altamente lipofílicos e com potencial endócrino, podem necessitar ser dirigida independente da quantidade liberada no meio ambiente.

Na fase I, a estimativa é baseada somente na droga, independente de sua rota de administração, forma farmacêutica, metabolismo e excreção. De acordo com a Convenção OSPAR (1992 Convenção para a Proteção do Meio Ambiente Marinho do Nordeste Atlântico), drogas com um $\log K_{ow} > 4,5$ deveriam ser examinadas, num procedimento, de persistência, bioacumulação e toxicidade de acordo com o Documento de Guia Técnico. Na fase I, o cálculo de Concentração Ambiental Estimada (CAE) é restrito ao ambiente aquático. O cálculo inicial do CAE na água de superfície assume: uma fração do total da penetração indicada (fator de penetração indicada - Fpen) no meio ambiente, baseado, por ex., nos dados epidemiológicos publicados; a quantidade prevista usada por ano é eventualmente distribuída no ano e através da área geográfica; o sistema de esgoto é a principal rota de entrada das drogas na água de superfície; não existe biodegradação ou retenção da droga na Estação de Tratamento de Esgoto (ETE); metabolismo no paciente não é levado em conta. A seguinte fórmula deveria ser usada para estimar a PCA na água superficial:

$$CAE_{\text{água de superfície}} = DOSE_{\text{diária}} \times F_{pen} / REFUGO_{\text{habitante}} \times DILUIÇÃO,$$

onde:

$DOSE_{\text{diária}}$ é a dose diária máxima consumida por habitante. A unidade é $mg \times habitante^{-1} \times dose^{-1}$.

F_{pen} = é a percentagem de penetração indicada. O valor é 0,01.

$REFUGO_{\text{habitante}}$ = é a quantidade de refugio por habitante por dia. O valor é $200 \text{ l} \times habitante^{-1} \times dose^{-1}$.

$DILUIÇÃO$ = é o fator de diluição. O valor é 10.

$CAE_{\text{água de superfície}}$ = é a concentração de água de superfície. A unidade é $mg \times l^{-1}$

No Brasil, a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 306, de 7 de dezembro de 2004, do Ministério da Saúde, dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde a ser observado em todo o território nacional, na área pública e privada. Este regulamento constitui-se em um conjunto de procedimentos de gestão, planejados e implementados a partir de bases científicas com objetivo de minimizar a produção de resíduos e proporcionar aos resíduos gerados, um encaminhamento seguro visando à proteção dos trabalhadores, à preservação da saúde pública, dos recursos naturais e do meio ambiente ⁽⁹⁶⁾. A Resolução nº 358, de 29 de abril de 2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA, do Ministério do Meio Ambiente, semelhante à RDC nº 306, também dispõe sobre o tratamento e a disposição final dos resíduos dos serviços de saúde, sendo obrigatória a segregação dos resíduos na fonte e no momento da geração, de acordo com suas características, garantindo a proteção da saúde e do meio ambiente ⁽⁹⁷⁾.

A Resolução nº 129/2006 do Conselho Estadual do Meio Ambiente – CONSEMA, da Secretaria do Meio Ambiente do Estado do Rio grande do Sul, dispõe sobre a definição de critérios e padrões de emissão para toxicidade de efluentes líquidos lançados em águas superficiais no Estado do Rio Grande do Sul. Esta resolução aplica-se quando a vazão máxima de lançamento do efluente da fonte geradora individualizada for igual ou superior a 10.000 m³/d, não sendo permitido o lançamento de efluentes líquidos de novas fontes poluidoras e fontes poluidoras em ampliação com acréscimo de vazão em corpos d'água intermitentes ou com interrupção de vazão. Os padrões de emissão de toxicidade para efluentes líquidos de fontes poluidoras já existentes, de novas fontes poluidoras e de fontes poluidoras em ampliação, deverão atender prazos para cumprimento de itens de toxicidade aguda e crônica quando submetidos a ensaios de toxicidade para organismos-teste. O padrão de emissão para toxicidade, definido em fator de toxicidade (FT), está relacionado à vazão mínima do corpo hídrico receptor que recebe o lançamento dos efluentes líquidos. Os laboratórios que realizam ensaios de toxicidade para verificação do cumprimento desta resolução devem atender ao disposto na resolução nº 008/94 do Conselho Administrativo da FEPAM, no que se refere a obtenção de Certificado de Cadastro de Laboratório Ambiental, além de participar de Programas de Avaliação de Qualidade Interlaboratorial reconhecido pela FEPAM ⁽⁹⁸⁾.

2.4. TETRACICLINA, SULFAMETOXAZOL E TRIMETOPRIMA

2.4.1 Tetraciclina

A tetraciclina (TC) é um antibiótico da família das tetraciclinas (TCs). Esta família é amplamente usada tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária por causa do seu amplo espectro de ação e de suas vantagens econômicas ⁽⁶⁾. Em adição ao uso terapêutico, estes fármacos são usados como um suplemento alimentar em animais confinados ⁽⁸⁾.

A estrutura da TC é mostrada na Figura 2.

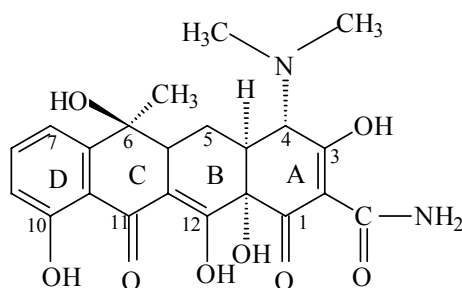


Figura 2: Fórmula estrutural da tetraciclina ⁽²²⁾.

Este composto possui grupos funcionais múltiplos com propriedades ácido-base, sendo que a primeira constante de dissociação ácida da tetraciclina, com um valor de pKa de aproximadamente 3,3 é atribuída ao grupo hidroxil do sistema tricarbonil no anel A. A segunda constante de dissociação ácida, com um valor de pKa de aproximadamente 7,6 está associada com o grupo hidroxil do sistema dicarbonil entre os anéis B e C. A terceira, com um valor de pKa de aproximadamente 9,7, está associada ao grupo amino da porção dimetilamino no anel A. A quarta e última com um valor de pKa na faixa de 10,7-12,0, está associada com o grupo hidroxil fenólico no anel D. De acordo com o exposto, a TC exibe um caráter anfótero com um ponto isoelétrico entre 4 e 6. Assim, a TC existe na forma catiônica a valores de pH mais ácidos, na forma aniônica a valores de pH mais alcalinos, e na forma dipolar a um pH próximo ao ponto isoelétrico, e dependendo do pH do tampão, pode ser separado como cátions a pH baixo, como bipolar a pH próximo ao neutro ou como ânion a pH alcalino ⁽⁸⁾.

O sistema ressonante da TC pode ser desenhado em um número de maneiras essencialmente equivalentes com as duplas ligações em posições alternadas. A fórmula normalmente dada é aquela colocada acima por uma convenção ⁽²²⁾.

Devido à presença de grupos (funções ácidas da TC) capazes de formar diversas ligações de hidrogênio intramoleculares, a TC tem propriedades quelantes, formando complexos (sais) insolúveis com íons metálicos de ferro, cálcio, magnésio e alumínio em pH neutro ⁽²²⁾.

As TCs na forma de cloridratos são solúveis em água ⁽²²⁾. O pH da TC cloridrato, numa solução aquosa, é de 1,8 a 2,8 na concentração de 10 mg/ml ⁽³⁰⁾. Certas TCs, precisamente, clortetraciclina (com Cl no C7), absorvem luz na região visível levando a geração de radical livre e potencialmente, causam eritema severo em pacientes sensíveis à exposição a luz solar forte ⁽²²⁾.

TC degrada a anidrotetraciclina (ATC) em meio ácido em pH menor que 2. TC e ATC epimerizam para a forma 4-epitetraciclina (ETC) e 4-epianidrotetraciclina (EATC), respectivamente, a pH 2-6, no átomo de carbono C4. Desde que avaliados comercialmente, TCs podem conter alguma quantidade significativa de produtos de degradação. EATC é tóxico aos rins e o monitoramento das TCs e suas impurezas tem atraído muita atenção ⁽⁸⁾.

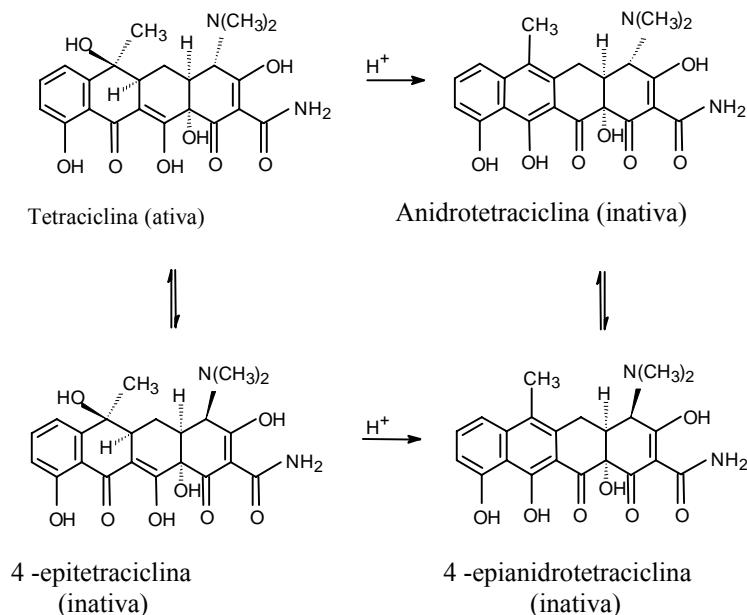


Figura 3: Instabilidade catalítica ácida da tetraciclina ⁽²²⁾.

2.4.2. Sulfametozazol/trimetoprima

O sulfametozazol (SMX) é da família das sulfonamidas. As sulfonamidas são bacteriostáticas, competem com o ácido p-aminobenzóico para prevenir a síntese de ácido fólico nas bactérias ⁽²⁾. A introdução de trimetoprima (TM) em combinação com SMX constitui um avanço no desenvolvimento de agentes antimicrobianos de eficiência clínica. São duas substâncias que agem em etapas sequenciais em uma reação enzimática indispensável à bactéria, o resultado de sua combinação é um sinergismo de efeito ⁽²³⁾.

Os valores de pKa do SMX são 1,83 e 5,57 e os valores de pKa da TM são 3,23 e 6,76 ⁽⁶³⁾.

As estruturas de SM e TM são mostradas na Figura 4.

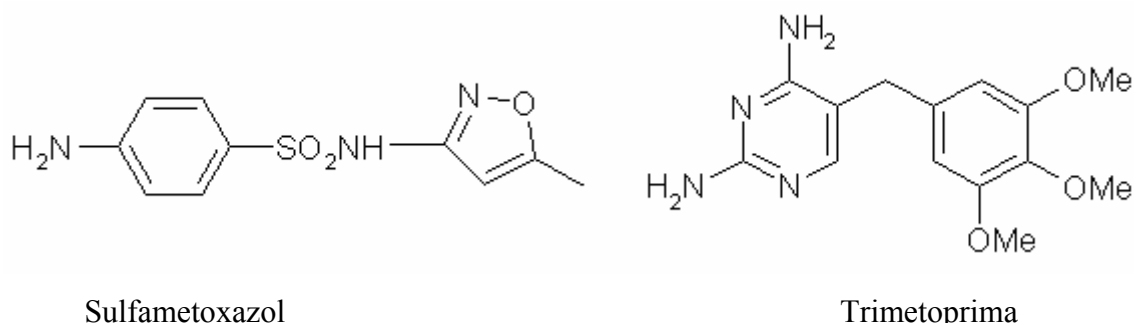


Figura 4: Fórmulas estruturais de sulfametozazol e de trimetoprima ⁽²²⁾.

A Tabela I resume as propriedades físico-químicas dos compostos alvos.

Tabela I: Propriedades físico-químicas de TC, SMX e TM ⁽⁶³⁾.

| Composto | Fórmula molecular | Massa Molecular (g/mol) | CASRN | Log Kow | pKa |
|----------------|---|-------------------------|----------|---------|----------------------|
| Sulfametozazol | C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S | 253,3 | 723-46-6 | ne | 1,85 5,60 |
| Trimetoprima | C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃ | 290,3 | 738-70-5 | 0,91 | 3,23 6,76 |
| Tetraciclina | C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈ | 444,4 | 60-54-8 | 0,09 | 3,32 7,78 9,58 |

CASRN: *Chemical Abstracts Service Registry Number*; ne: não encontrado.

Atualmente, tetraciclina e sulfonamidas são antimicrobianos largamente usados na medicina humana e veterinária ^(60, 62). Cloridrato de tetraciclina, sulfametoxazol e trimetoprima são medicamentos que estão presentes na RENAME (Relação Nacional de Medicamentos Essenciais). A adoção da RENAME é estabelecida pela Política Nacional de Medicamentos que se baseia nas prioridades nacionais de saúde; é o resultado dos trabalhos desenvolvidos pela Comissão Técnica e Multidisciplinar de Atualização da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais – COMARE – após ampla consulta a todos os segmentos da área de medicamentos do país para atender às necessidades da maioria dos problemas de saúde da população brasileira ⁽⁵⁵⁾.

2.5. PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS AQUOSAS AMBIENTAIS

A análise de micropoluentes no meio ambiente constitui uma tarefa difícil, devido à complexidade das matrizes e as baixas concentrações dos compostos alvos. Em todos os casos de interesse, é necessário isolar o composto alvo da matriz e obter os limites de detecção (LD) necessários. Um procedimento analítico típico inclui, portanto, várias etapas de preparação da amostra, tais como filtração, extração, purificação e evaporação ⁽²¹⁾.

Previamente à extração, amostras aquosas são filtradas e o pH ajustado a valores na faixa ácida a alcalina (2, 3, 5, 7 e 9) dependendo da natureza ácida ou alcalina do fármaco em estudo. Para evitar fotodegradação do TC, as amostras são estocadas a baixas temperaturas (4°C) em frasco de vidro âmbar até a extração. Uma precaução que conduz a uma notável melhora na eficiência da extração, é a silanização, por exemplo, com dimetildiclorosilano, de todos os objetos que entram em contato com a amostra aquosa ou o extrato, ou o uso de outros materiais, tais como politetrafluoroetileno (PTFE). Essas medidas preventivas são importantes na análise de compostos polares, tais como as TCs, com capacidade quelante já comprovada. Adicional abordagem para prevenir quelação de metais, que possam estar presentes advindos do processo de fabricação desses materiais, é a lavagem dos cartuchos usando soluções diluídas de ácido clorídrico para retirada destes metais, e adição de um forte quelador na amostra, por exemplo, Na₂EDTA. Em adição, cartuchos usados para análise de TCs não devem conter grupos silanóis, visto que eles se ligam irreversivelmente a essa classe de antimicrobiano ⁽²¹⁾.

2.5.1. Extração em fase sólida

A extração em fase sólida (EFS) consiste na percolação da amostra através do sólido adsorvente, que normalmente está colocado em seringa de plástico ou de vidro com membranas filtrantes em ambos os lados. Este conjunto, geralmente, é denominado de coluna de extração ou cartucho. O volume, a dimensão do cartucho, a quantidade dos adsorventes e o volume dos solventes empregados no processo dependem da quantidade da amostra, da sua natureza, da natureza e da capacidade do adsorvente e dos compostos a serem analisados. A eluição dos analitos do adsorvente é feita mediante a passagem de um solvente orgânico adequado. Usualmente, o volume de solvente necessário para a completa eluição dos analitos é muito menor do que o volume original de amostra. Desta maneira os analitos são concentrados. O solvente utilizado nesta etapa deve também possuir compatibilidade com a técnica analítica final pela qual a amostra será analisada.

A Figura 5 mostra as etapas do procedimento da pré-concentração/extração em sólidos adsorventes.

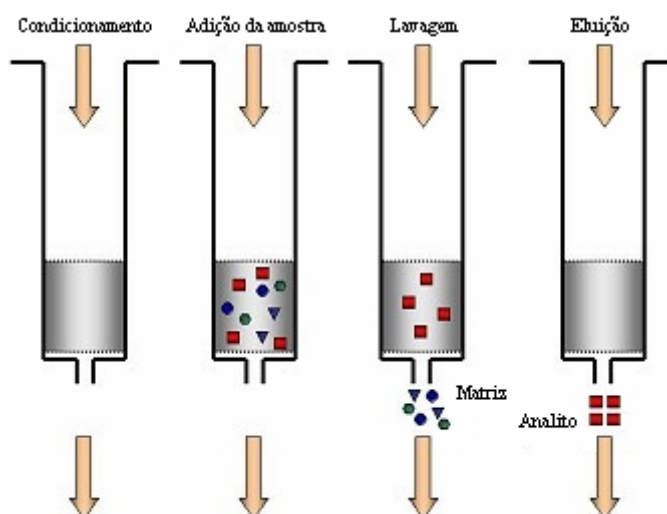


Figura 5: Etapas do procedimento da pré-concentração/extração em sólidos adsorventes.

- 1 - Preparação e condicionamento do cartucho;
- 2 - Pré-concentração/extração dos analitos (percolação da amostra);
- 3 - Lavagem do cartucho e do adsorvente, eliminação das interferências (opcional);
- 4 - Eluição dos analitos do adsorvente (obtenção do extrato final).

O condicionamento do cartucho visa preparar o adsorvente para interagir com os analitos. É recomendado de forma especial nos adsorventes à base de sílica organofuncionalizada, onde as cadeias orgânicas possam estar entrelaçadas. O solvente de condicionamento serve, portanto, para ordenar a cadeia hidrocarbonada, aumentando a superfície disponível para a interação com o analito. Além disso, o condicionamento deve manter o adsorvente úmido durante e após esta etapa, evitando assim a formação de canais preferenciais que conduzam ao insucesso da extração. Segundo Araujo [92], “A ativação do adsorvente com metanol permite que as cadeias alquílicas, da sílica C18, quimicamente ligadas à sílica, sejam solvatadas e assim se estendam formando uma cerda. Isto aumenta a área superficial da sílica e assegura um bom contato entre os analitos. Como nas fases poliméricas mais de 99% da área superficial da fase está na área interna dos poros, é imprescindível que a fase líquida penetre nos poros. A permeação completa da água através dos poros só é assegurada pela molhabilidade do polímero, primeiro com um solvente orgânico, miscível com água. Portanto é importante que a fase sólida permaneça úmida. A adição da água, em maior quantidade, desloca o solvente orgânico da ativação e vai ocupando o espaço entre as moléculas orgânicas da fase sólida solvatada, o que permite o contato dos analitos com a fase sólida na etapa de percolação da amostra. Sem o processo de ativação, ou quando ocorre a secagem da fase antes que seja iniciada a etapa da adição da amostra, ocorre o colapso das moléculas orgânicas e a água passa por caminhos preferenciais, mais hidrofílicos, não acontecendo o contato dos analitos com a fase sólida, portanto não há retenção dos mesmos”.

A EFS utiliza baixo volume de solventes orgânicos se comparada à extração líquido-líquido e pode ser utilizada tanto em linha (*on line*) como não (*off line*)⁽²⁷⁾.

2.5.2. Volume de Quebra

O Volume de quebra (*breakthrough volume*) é o parâmetro característico mais importante para determinar adequadamente o delineamento da amostragem para isolar os analitos em extração em fase sólida. Para se determinar o volume de quebra, os analitos são quantitativamente retidos até o ponto em que o próprio solvente da amostra começa a remover o analito retido no adsorvente. Uma forma de determinar volume de quebra é através do aumento do volume da amostra contendo a mesma quantidade de analito. Teoricamente, se aumentar o volume de amostra, aumenta também a concentração do analito no eluato, ou seja, ocorre lixiviação do analito do adsorvente. A própria passagem

da amostra prejudica a retenção do analito. Enquanto o volume de quebra não é atingido, a relação entre a pré-concentração e a lixiviação é inversamente proporcional, ou seja, se a quantidade pré-concentrada (retida no adsorvente) aumenta, a quantidade detectada no eluato diminui ⁽¹⁶⁾.

2.6. ADSORVENTES UTILIZADOS EM EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

Os adsorventes são os responsáveis pela adsorção da EFS. Muitos destes materiais (por ex. materiais modificados à base de sílica, à base de carbono ou poliméricos) são correntemente avaliados. Eles cobrem uma larga faixa de seletividade e, portanto, um largo campo de aplicação. Entretanto, a maioria dos analitos polares, tem vários problemas porque eles apresentam baixo volume de quebra nos materiais acima citados. Para superar essas limitações, polímeros com elevado índice de ligações cruzadas (*crosslinked*) tem sido desenvolvido com áreas de superfície maiores (800 – 1200m²/g) do que aquelas de adsorventes poliméricos convencionais (350 – 500m²/g). Entretanto, eles ainda têm um caráter hidrofóbico porque eles são baseados em estireno-divinilbenzeno. A maior retenção de analitos polares aromáticos nos adsorventes de maior área é devido ao esqueleto polimérico (mecanismo de fase reversa e interações π - π), mas a presença de grupos funcionais no esqueleto do polímero pode melhorar essa retenção ⁽²⁸⁾.

A sílica tem sido o material preferido para funcionalização com grupos orgânicos imobilizados sobre sua superfície, tendo em vista suas características de área superficial relativamente elevada, estabilidade térmica, além da presença de sítios de fixação (grupos silanóis) bem definidos em sua superfície. Assim, o material organofuncionalizado apresenta as características físicas da sílica (suporte), enquanto os reagentes (compostos orgânicos, compostos de coordenação, organometálicos, entre outros) imobilizados sobre sua superfície são responsáveis pelas propriedades químicas. Nessa reação de organofuncionalização da sílica, sabe-se que somente uma parte dos grupos silanóis reage, podendo sobrar uma determinada quantidade de grupos silanóis residuais. Esses grupos geralmente apresentam propriedades diferentes do grupo imobilizado, alterando assim as propriedades da sílica organofuncionalizada, podendo, sobretudo, atuar na retenção de analitos. Os grupos silanóis residuais podem ser eliminados pelo processo de proteção,

através da reação com moléculas pequenas, capazes de ter acesso à superfície, dentre eles o trimetilclorosilano ⁽¹⁶⁾.

O Laboratório Ziegler-Natta e o Laboratório de Polímeros da UFRGS têm produzido materiais a base de sílica e poliméricos apolares e polares, respectivamente, com objetivo de melhorar a retenção de analitos de alta a moderada polaridade e hidrofiliçidade. Para o preparo das sílicas quimicamente modificadas, sílicas obtidas comercialmente, são desidratadas termicamente em temperaturas entre 110 e 450°C, sob vácuo a fim de retirar a água fisicamente adsorvida e remover grupos silanóis da superfície. De acordo com a literatura, sílicas tratadas a 110°C apresentam cerca de 4,5 OH/nm². Esse valor é reduzido a 1,5 OH/nm², quando tratadas termicamente a 450°C ⁽⁷⁷⁾. As sílicas ativadas termicamente são então funcionalizadas com soluções de Cp₂ZrCl₂ (diclorobis(ciclopentadienil)zircônio (IV)) e de octadeciltriclorosilano em tolueno pelo método *grafting*. Por este método, o composto organometálico Cp₂ZrCl₂ é imobilizado através da reação entre o hidrogênio (ácido de Brønsted) dos grupos silanóis (Si-OH) da sílica, com ligantes lábeis do reagente de interesse (cloretos). O número de moléculas imobilizadas depende do número e tipo de grupos silanóis (isolados, geminais e vicinais) sobre a superfície e da acessibilidade, que depende do efeito estérico dado pelas próprias moléculas já imobilizadas. No processo de *grafting*, existem etapas de lavagem em seu protocolo de preparação, garantindo que as moléculas, imobilizadas sobre a superfície do suporte, encontrem-se efetivamente ligadas quimicamente à superfície e não simplesmente depositadas. Os sólidos obtidos por *grafting* diferem essencialmente na natureza da esfera de coordenação em torno do centro metálico, conferindo efeitos eletrônicos e estéricos diferenciados. Os possíveis ligantes do grupo Cp (metil, iso-butil e n-butil) não desempenham um efeito estérico importante durante a fixação dos zirconoceno, uma vez que os teores imobilizados ficaram compreendidos entre 0,2% a 0,3% de Zr/SiO₂. O teor do metal, inicialmente, é proporcional ao número de grupos Si-OH presentes na superfície da sílica, e posteriormente, ao longo da reação de fixação, pelos sítios OH acessíveis às moléculas que podem ser impedidas pelo efeito estérico desempenhado por moléculas já imobilizadas sobre a superfície ⁽¹⁶⁾.

A estrutura para o adsorvente Zr/SiO₂ é mostrado na Figura 6.

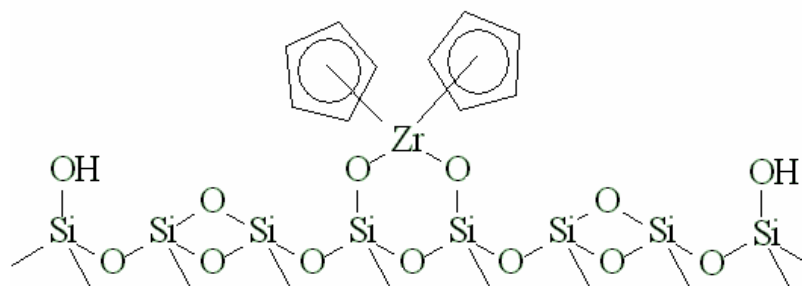


Figura 6: Estrutura proposta para o adsorvente Zr/SiO₂⁽¹⁶⁾.

Os polímeros são obtidos por polimerização radicalar em suspensão em presença de uma mistura de heptano e tolueno na proporção 70:30 em volume. Como iniciador foi utilizado o 2,2'-azobisbutironitrila (AIBN). A fase orgânica foi dispersa na fase aquosa, uma solução de hidroximetilcelulose e cloreto de sódio (NaCl). O dispersor foi substituído por um agitador mecânico e a temperatura foi elevada a 75°C, mantendo-se o sistema nesta temperatura e sob atmosfera inerte por 10 horas. Em todas as reações foram utilizados 50% em mol de divenílbenzeno (DVB). As quantidades de estireno (S) e metacrilato de glicidila (GMA) foram variadas entre 0 e 50% em mol. As microsferas obtidas foram lavadas com água, acetona e metanol e foram secas a 60°C. Os diâmetros médios das microsferas variaram entre $14,1 \pm 1,9 \mu\text{m}$ e $18,1 \pm 2,5 \mu\text{m}$. A área superficial específica das microsferas variou entre 429,3 e 114,2 m²/g e diminuiu com o aumento da quantidade de GMA no copolímero, devido à diminuição da diferença entre o parâmetro de solubilidade dos copolímeros e o parâmetro de solubilidade da mistura de diluentes. Os resultados obtidos mostraram que é possível obter copolímeros de S-DVB, S-DVB-GMA em diferentes percentuais de GMA e DVB-GMA 50% na forma de microsferas com grande área específica e, portanto, com potencial para utilização em EFS⁽²⁹⁾.

As estruturas do estireno, divinilbenzeno e do metacrilato de glicidila são mostradas na Figura 7.

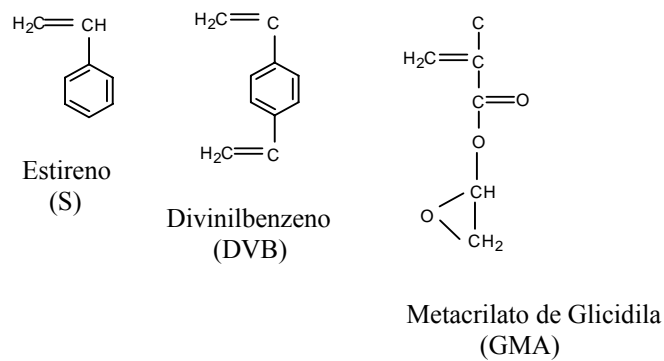


Figura 7: Fórmulas estruturais do estireno, divinilbenzeno e do metacrilato de glicidila.

2.7. DETERMINAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS (TETRACICLINA, SULFAMETOXAZOL E TRIMETOPRIMA) POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM DIFERENTES MATRIZES

As extrações e *cleanup* de fármacos a partir de diferentes matrizes e suas subseqüentes determinações em análises instrumentais é um desafio devido à complexidade de composição das matrizes. Muitos artigos têm descrito metodologias para determinação de resíduos de antimicrobianos em amostras ambientais, fluidos biológicos ou de alimentos. Neste trabalho, as tabelas 2 e 3 relacionam 22 artigos com pesquisas de metodologias usadas para determinação quantitativa de antimicrobianos nestas matrizes, buscando paralelos de informações em relação a esta dissertação. Os métodos de análise, com conhecimento químico de extração e controle de estabilidade das soluções são avaliados.

Inicialmente, em alimentos já existe a preocupação de que resíduos de antimicrobianos podem ser retidos em carnes^(35, 39, 40, 48, 50), leite^(35, 36, 38, 40, 42, 48), queijo⁽³⁵⁾, ovos^(37, 50), mel^(43, 47, 52), decorrentes de tratamentos para controle de infecções bacterianas e/ou como aditivo alimentar para promover o crescimento dos animais⁽⁴³⁾. Para prevenir qualquer problema de saúde com os consumidores, WHO (*World Health Organization*), US-FDA (*United States Food and Drug Administration*), EU (*European Union*) e *Japanese Food sanitation Laws* estabeleceram o Limite de Resíduo Máximo (LRM) recomendado nestes produtos⁽³⁶⁾. Assim, o LRM, pela EU para TCs em carne e leite é 100 ng/g^(35, 38) ou 0,1 µg/ml^(36, 39), para SAs é 100 µg/kg em tecido animal comestível e 10 µg/l no leite^(24, 50). Em galinhas poedeiras não existe aprovação para o uso de sulfonamidas. Somente sulfametazina e sulfadimetoxina são aprovadas para uso em galinhas. Esta aprovação

estende somente a galinha jovem, não galinhas poedeiras. *US Food and Drug Administration Center for Veterinary Medicine* definiu tolerâncias para essas duas SAs a 100 ng/g em músculo de galinha jovem. Encontrar resíduos em ovos poderia resultar do medicamento dado através da alimentação em galinhas poedeiras ⁽³⁷⁾. Não existe uma especificação de LRM em produtos de abelha. TCs são ilegais para uso em abelhas ^(43, 47). SAs são empregadas para prevenir ou tratar doenças bacterianas de abelha. LRM para SAs é estabelecido pela EU: Bélgica e Reino Unido: 20 e 50 µg/kg respectivamente e Suíça: 50 µg/kg ⁽⁵²⁾.

No controle de água potável os níveis de concentração de fármacos não é uma questão de regulamento governamental.

De uma forma geral, verifica-se que as soluções padrão estoque de analitos individuais de TCs ou de SAs são preparadas a 1 mg/ml em metanol (MeOH) ^(35, 24, 37, 39, 40, 42, 43, 61, 46, 47, 50, 52, 53), em água ⁽³⁸⁾, a 100 g/ml em água ⁽⁵⁾ ou a 20 mg/l em água ⁽⁶⁵⁾ e as soluções padrão de trabalho são preparadas diariamente pela diluição sucessiva da mistura das soluções estoque em água deionizada ^(5, 35, 37, 38, 65, 50), diretamente na fase móvel (FM) ^(35, 39, 47), MeOH ^(5, 61), tampão acetato pH 4,5 ⁽⁴²⁾ ou solução de ácido oxálico ⁽⁴³⁾ e estocadas a 4°C ^(35, 42), -20°C ^(37, 40) ou na geladeira protegida da luz ^(5, 38). As soluções padrão estoque a 1 mg/ml em MeOH e estocadas a -20°C são estáveis por pelo menos 4 semanas ^(40, 47, 52), e as estocadas a 0°C são estáveis por pelo menos 3 meses ⁽⁴³⁾; a 20 mg/l em água e estocadas a 4°C são estáveis por pelo menos 1 mês ⁽⁶⁵⁾. Padrões preparados em água são em alguns casos usados para estudar a pré-concentração dos analitos por EFS ⁽⁵⁾.

Esta literatura selecionada discute a extração de tetraciclina, sulfonamidas e trimetoprima baseadas nas características químicas destes grupos. À parte, a pesquisa da pequena porcentagem de impurezas derivada da biosíntese desses fármacos ou degradações formadas sob certas condições de análise/isolamento é outra fonte de contaminação e não é o foco desta pesquisa. No entanto, impurezas comuns de TCs (epiTCs e anidroTCs) podem ocorrer. EpiTCs, cuja epimerização ocorre no C-4, podem ser formadas em condições aquosas num pH intermediário de 2 – 6. Alguns registros informam que este isômero não é formado em níveis significantes em pH 4 durante o mesmo dia de extração com tampão McIlvaine (ácido cítrico e hidrogenofosfato dissódico) ^(35, 40, 41, 61), nem quando deixado em solução por 3 dias a -20°C na ausência de luz ⁽⁵⁴⁾. EpiTCs podem reverter às suas formas ativas sob condições alcalinas na presença de um metal complexante; estes complexos quelados aumentam a capacidade fluorescente das TCs ^(47, 54, 65). A intensidade de

fluorescência da TC, em solução aquosa, aumenta com adição de acetonitrila (ACN) ^(54, 47, 65) e estudos feitos com TCs mostram que a quelação aumenta com a diminuição do raio iônico dos íons. Portanto, Mg^{2+} tem a formação do complexo mais forte, enquanto Ca^{2+} tem o mais fraco quando comparado com Mg^{2+} , Ca^{2+} e Zn^{2+} ⁽⁵⁴⁾.

Sistemas aquosos fornecem maior solubilidade para as TCs (na forma cloridrato) e são miscíveis em matrizes biológicas de interesse ⁽⁴⁴⁾. Solubilidade molar em pH 4, as TCs estão em equilíbrio favorecendo a forma *zwitterionic* (espécies que possuem simultaneamente um sítio carregado positivamente e um carregado negativamente) sobre as espécies protonadas ⁽⁵⁴⁾. Soluções de ácido succínico (pH 4) ⁽⁵⁴⁾ têm sido aplicados em extrações em alimentos ⁽⁴⁸⁾.

Enquanto que as extrações não são limitadas ao pH 4, sistemas aquosos foram feitos sob condições ácidas ^(24, 41, 45, 61), mas não para TC devido sua estabilidade que é mais suscetível à degradação ácida, ainda que outros registros usem HCl 1 mol/l sem a incidência durante a extração de TC ^(5, 54).

Extrações com solventes orgânicos são feitas com Ácido Tricloroacético (TCA) ^(36, 40), ACN ⁽³⁷⁾, acetato de etila ⁽⁴²⁾. Em amostras de leite, desproteíntização/extração por ácido (TCA) é algumas vezes o *cleanup* feito anterior a análise ⁽³⁶⁾. Desproteíntização com TCA é comumente empregado junto com as extrações McIlvaine/EDTA ^(40, 54). ACN, ferricianeto de potássio e sulfato de zinco podem ser usados para extração e desproteíntização ^(37, 50, 54).

No desenvolvimento de métodos de extração e análise de TCs é importante considerar suas propensões de formar complexos quelantes. Interromper essas interações é comumente feito através da adição de EDTA ao solvente de extração. EDTA tem uma maior afinidade pelos cátions do que TCs, causando aumento nas recuperações de TCs quando ele é incorporado às soluções de extração ^(39, 41, 43, 47, 54, 61).

Extração em fase sólida é comumente empregada para alcançar simultaneamente *cleanup* e concentrações de analitos. Devido a suas cadeias de carbono, região aromática e variedade de grupos funcionais, TCs, SAs e TM poderiam teoricamente ser aplicados numa ampla faixa de EFSs. As regiões não polares dos sistemas de anéis permitiriam *cleanup* usando sorventes de fase reversa (RP) C18 ou poliméricos, enquanto EFS fenil levaria vantagens na região do anel aromático D das TCs ^(43, 54). Embora EFSs com fortes trocadores de íon não são usados para adsorver TCs devido aos extremos valores de pH necessários para dessorção, cartuchos fortes trocadores de ânions (SAX) têm sido usados para remover interferência de matriz anterior a carga na EFS com fase reversa ^(9, 12). Para

EFS com fase reversa, muitos autores têm citado o polímero Oasis HLB como sendo superior a C18 ^(40, 44 – 49, 54, 65). Ao mesmo tempo em que é possível obter sucesso com cartuchos C18, muitos autores têm encontrado dificuldade para trabalhar com o sorvente octadecilsilano devido a afinidade das TCs adsorverem nos grupos silanóis e de formarem complexos com resíduos de metal. Pré-tratamento dos sorventes C18 com EDTA, carregando o analito em um tampão contendo EDTA ou silanização podem melhorar os resultados ^(35, 37, 38, 39).

Uma característica chave para obter boas recuperações na etapa de EFS é o pH da amostra. Valores de pK_1 das TCs estão entre 3,3 e 3,4; abaixo desses valores de pH as espécies carregadas positivamente predominam, ao passo que acima desses valores a predominância é das espécies *zwitterionicas*. Assim, dados de pK_a sugerem que seria conveniente ajustar o pH da amostra acima de 3,4 a fim de favorecer a interação dos analitos com a fase sólida poliméricas. Entretanto, alguns autores (Lindsey, Meyer e Thurman) afirmam que acima de pH 3 a retenção das TCs não é muito eficiente. Além do mais deveria ser considerado que a habilidade de complexação das TCs aumenta quando o pH aumenta, e esse processo compromete a EFS de TCs de água natural. Assim, experimentos iniciais foram feitos com soluções padrão com pH ajustado em 2,6 ou 3,4. Nos cartuchos Oasis HLB (copolímero poli (divinilbenzeno-co-N-vinilpirrolidona), a retenção do conjunto total dos analitos foi, para ambos os valores de pH, maior do que 80%. A eluição dos analitos, avaliada com 1 ml de MeOH contendo Ácido Trifluoroacético (TFA)1%, foi efetiva fornecendo recuperações maiores do que 80% para todos os analitos. Devido ao alto conteúdo de solventes orgânicos, os extratos dos cartuchos de Oasis HLB não puderam ser injetados diretamente no sistema cromatográfico, pois eles levariam a cromatogramas distorcidos, em particular no início do cromatograma. Evaporar até a *secura* sob um banho de nitrogênio e reconstituindo com a FM não forneceu resultados reproduzíveis, provavelmente devido ao processo de degradação das TCs em meio ácido. Assim, os extratos metanólicos de 1 ml dos cartuchos Oasis HLB foram uma vez diluído com água antes da injeção. A adição de EDTA antes de proceder a etapa de EFS, forneceu fatores de recuperações equivalentes àqueles obtidos de soluções padrão e assim, a adição do sal EDTA dissódico a concentração final de 0,02 mol/l foi adotado para análises de águas naturais. Devido a detecção seletiva usada, cromatogramas ficaram limpos, com nenhum pico de matriz prejudicando a quantificação de TCs ⁽⁶⁵⁾

Os valores de pKa das sulfonamidas examinadas variam entre 5,5 e 10,4. Para conseguir altas recuperações no material de extração polimérico, as amostras foram acidificadas a pH 2,5 para evitar precipitação e obter as formas não dissociadas⁽³⁶⁾.

Kay e sua equipe realizaram experimentos de forma que a extração foi simplificada fazendo-se passar as amostras pelo cartucho SAX em seqüência com um cartucho HLB^(41, 61). O SAX é um cartucho trocador aniônico forte e o Oasis HLB é um cartucho polimérico com balaço hidrofílico-lipofílico. O pH da amostra final foi ajustado a aproximadamente a 2,9 pela adição de solução de H₃PO₄, garantindo que os antimicrobianos tivessem carga positiva ou neutra, assim não seriam retidos no cartucho SAX e seriam retidos no HLB. No entanto, os grupos funcionais carboxila dos ácidos húmicos (materiais orgânicos naturais presentes nos efluentes) permaneceriam carregados negativamente e seriam retidos pelo SAX que poderia então ser descartado. Esse pH de 2,9, selecionado devido aos valores dos pKa dos compostos, ajudou na retenção de TCs e SAs no cartucho HLB (estudo prévio citado pelos autores). Nestes estudos, os cartuchos HLB comprovaram ser eficiente retendo também os materiais orgânicos naturais (MON) dissolvidos nas amostras em pH neutro, mas em pH < 3,0 reduziu o grau de retenção, que pode ser verificado pela eluição com MeOH. O extrato metanólico produzido nas amostras naturais, sem correção de pH a 2,9 ficou muito colorido. A determinação de um tampão extrator adaptado para usar nas amostras reais reduziu a quantidade de MON retido no cartucho HLB. Embora essa abordagem requeira o uso de 2 cartuchos de EFS, isso foi útil na remoção da maioria do material húmico sem redução significativa nas recuperações dos analitos. Experimentos adicionais foram feitos também para tentar promover a limpeza dos extratos. A adição de MeOH 10% nas amostras ajudou na extração de compostos não-polares prevenindo a adsorção, embora outros trabalhos têm indicado que as recuperações dos analitos podem ser afetadas pela adição de MeOH nas amostras. Foi descoberto, entretanto, que a adição de MeOH 2% nas amostras não afeta as recuperações e portanto, essa etapa foi incluída no procedimento de EFS^(41, 61). Adicional estágio de lavagem foi também testado para tentar remover interferências a partir do HLB que não tinha sido removido no cartucho SAX. Depois de uma série de experimentos de lavagem seqüencial com tampão de extração McIlvaine-EDTA diluído, acetato de sódio 0,1mol/l, água destilada e MeOH 20% foram encontradas para remover adicionais interferentes (efluentes tratados nos cartuchos ficaram coloridos) sem afetar a recuperação dos analitos^(41, 61).

Um número de diferentes métodos tem sido usado recentemente para reduzir a quantidade de MON, que é predominante composto de ácidos húmico e fúlvico em extratos de águas naturais. Isso inclui: ultrafiltração; o uso de acetona como eluente de EFS quando ácidos húmicos têm solubilidade muito mais baixa nesse solvente comparado ao MeOH ou ACN; amostras ajustadas a pH 7 ao invés de acidificação a pH 2 ou 3, para reduzir o grau de retenção dos ácidos húmico e fúlvico nos cartuchos de polímero (o modelo estrutural do ácido húmico indica que os grupos funcionais predominantes são carboxil e fenol. A ionização dos grupos carboxila, para dar uma carga negativa em solução aquosa, depende do pH; métodos químicos tal como oxidação usando peróxido de hidrogênio ou redução usando sulfito de sódio; e adsorção e troca iônica ⁽⁶¹⁾.

É importante considerar os prováveis graus de ligação dos compostos nos solos e materiais orgânicos. Dados de coeficiente de partição dos sistemas solo/água indicam que as TCs são muito fortemente sorbidas e SAs são fracamente sorbidas nos solos ⁽⁴¹⁾.

TCs, SAs e TM são tipicamente separados usando uma coluna analítica C18 ou C8 ^(35, 24, 36 -42, 44 - 48, 50, 52, 53, 61). Interações de TCs com grupos silanóis e traços de metais presentes nos materiais de empacotamento pode contribuir para o aparecimento de caudas nos picos cromatográficos. As numerosas ligações duplas e substituintes de oxigênio ou nitrogênio das TCs fornecem muitos sítios de interação. O *end-capping* em colunas de fase reversa minimiza estas interações. As colunas poliméricas são escolhidas por não possuírem nem silanóis, nem traços de metais ⁽⁶⁵⁾. Próprio de sua cadeia não-silícica, a coluna amida não teria silanóis para interagir com as TCs ⁽²⁴⁾.

Com relação a análise cromatográfica, observa-se a utilização tanto de fases móveis isocráticas como gradientes. A tendência apresentadas pelas TCs de ligarem-se irreversivelmente aos grupos silanóis da fase estacionária requer atenção especial. Fases móveis contendo ácido oxálico podem melhorar consideravelmente o formato dos picos ^(35, 39, 40, 43, 46 - 49, 65) e a presença de ácido acético pode evitar picos com cauda ^(36, 38, 52, 53). Durante o desenvolvimento do método a escolha de um solvente orgânico ou ácido, a porcentagem do solvente versus o componente aquoso, a molaridade, a temperatura da coluna e presença/ausência efeito de matriz foram avaliados. Fatores de retenção das TCs diminuem quando a proporção de solvente orgânico é aumentada, e a valores de pH maiores, porcentagem maiores de ACN não podem ser usadas porque os picos aparecem com fenda ⁽⁴³⁾; a concentração do ácido oxálico a 10 mmol/l diminui fortemente nos fatores

de cauda ^(35, 39, 40, 43, 46 – 49, 65). A possibilidade de descartar as primeiras frações do extrato foi avaliada na tentativa de eliminar interferências da matriz ⁽⁴³⁾.

Com o objetivo de conhecer as reais modificações dos antimicrobianos, prevendo a estabilidade e ocorrência de efeitos potencialmente adversos ao ambiente e/ ou resistência desenvolvida entre as bactérias expostas aos produtos, Sanderson e sua equipe construíram microcosmos. Também com a intenção de avaliar o tempo de meia-vida das TCs sob condições aquáticas semi-naturais e assim reduzir a brecha de extrapolação entre dados de laboratórios e medidas reais de campo, estes microcosmos foram construídos. Microcosmos são tanques aquáticos seminaturais enterrados na terra com um volume aproximado de 12.000 l de água adjacente a um pequeno lago feito pelo homem. As águas foram circuladas entre o microcosmo e o pequeno lago por três semanas. Através da circulação, os microcosmos foram germinados com população de bactérias naturais. Peixes não foram introduzidos. Pássaros e anfíbios tiveram acesso aos microcosmos. Aproximadamente 50% do fundo foram cobertos com 5 cm de sedimento de solo natural contendo comunidades de bactérias naturais. Como conclusão deste estudo, fotólise e múltiplos fatores bióticos e abióticos sob condições realísticas são mais relevantes para a dissipação do que o pH sozinho, visto que a formação de 4-epi-anidro-TCs ocorre sob condições neutras e fraca alcalinidade ⁽⁴⁵⁾.

Finalizando esta avaliação, observa-se que as características de desempenho dos métodos de EFS-CLAE foram estabelecidas pelo procedimento de validação com amostras fortificada e os métodos descritos e validados foram aplicados às amostras reais.

A Tabela II mostra algumas determinações de antimicrobianos por CLAE em diferentes matrizes. A Tabela III mostra a avaliação dos parâmetros de quantificação e/ou validação da Tabela II.

Tabela II: Determinação de antimicrobianos por CLAE em diferentes matrizes.

| Antimicrobiano | Amostra | Pré-tratamento da amostra | Extração em Fase Sólida | | | | Cromatografia Líquida | | | Análise Instrumental | LD | Recuperação | Refê-reência |
|--|---|--|---|---------------------------------------|---------------|---|---|---|--|---|--|--|--------------|
| | | | Adsorvente | Condição-namento | cleanup | Eluição | Prepara-ção da amostra | Coluna | FM | | | | |
| Oxitetraciclina Tetraciclina Clortetraciclina | Carne, leite (5 g) e queijo | Leite: tampão McIlvaine pH 4. Centrifugação.+ tampão + MeOH e EFS | Sep-Pak C-18 <i>endcapped</i> | Não informado | Água | AcOxa 0,01 mol/l em MeOH. Fortificação no LRM | Evaporação e dissolução na FM (5 x concentrado) | Lichrosorb RP-18 | MeOH/ACN/AcOxa 0,01mol/l (17,5:17,5:65) Fluxo: 1,4ml/ min | DAD | 15 – 22 ng/ g | 50,7 a 53,4%. DP = 6,2 - 7,6 (n=4) | 35 |
| Sulfonamidas (inclui SMX) | ET 1 ^o e 2 ^o de ETAs, água de superfície e água ultrapura | Filtração (0,45 µm). pH a 2,5 (HCl). Volumes 200 – 1000 ml fortificados e percolados a 200 ml/h. | Lichrolute EN (200 mg) (PS-DVB) | MeOH, MeOH/água (1:1) e água a pH 2,5 | Água (pH 2,5) | MeOH/água (1:1) e MeOH | Extratos concentrados a 1,5 ml (fator de concentração: 130 - 670). + TFA (1:10) + MeOH e PI | CLAE-DAD: Supelcosil ABZ+ (RP alquil-amida) e CLAE-EM/EM: Supersphere RP18 <i>endcapped</i> | CLAE-DAD A: ACN/ água (3: 97) com 0,05% de TFA B: ACN/ água (80:20) com 0,05% de TFA. Fluxo: 0,3 ml/min CLAE-EM/EM A: ACN/ água (3: 97) com AcFor. 1% B: ACN/ água (75: 25) com AcFor. 1% Fluxo: 0,3 ml /min. | CLAE-DAD a 260 nm e CLAE-EM-EM IES (+). EM no modo MRS Obs. Para simultânea detecção por DAD e EM, a saída do detector UV foi conectada na interface | Detecção UV: 0,2 – 0,6 mg/l: água ultra-pura Detecção EM: 0,2 a 3,7 µg/l (MRS): água ultrapura (determinação e confirmação) | 50 a 90% : nas matrizes fortificadas. 30 – 2000 ng/l para SMX em água de superfície e ET secundário não fortificadas por CLAE-EM IES | 24 |
| Oxitetraciclina | Leite (20 amostras comerciais) | 1 ml amostra agitado com sol. TCA 20% | Não aplicável. | | | | Filtração: 0,45 µm | LiChrospher 100 RP-8 <i>endcapped</i> | ACN/AcAce/ água (28:4:68). Fluxo: 1,0 ml/min | DAD a 354 nm | 0,05 µg/l (sinal: ruído >5) Abaixo do LRM | Sem detecção | 36 |
| Sulfonamidas (inclui SMX) | Ovos (5g) | Mistura. Fortificação com 0,5 ml (padrão de trabalho 1 µg/ml) + ACN. Mistura em banho de gelo. Centrifugação a 0-4°C. Sobrenadante + ACN. Mistura. Centrifugação. + água. Redução a 1 ml para remover ACN. EFS | Sep-Pak C-18 (1 g) <i>endcapped</i> Extrato percolado a 1 -2 gotas/s | ACN e água | Não informado | ACN e água. Redução a 0,5 mL. Adição de água ao extrato até 1,0 ml (fator de concentração: 5) | Filtração: 0,2 µm | CLAE-UV: Symmetry C8 CLAE-EM/EM: ODS-AQ (C18 hidrofílica modificada) | CLAE-UV: A: AcFor 0,1% / MeOH (90:10), B: MeOH, C: ACN Fluxo: 1,5 ml/min. CLAE-EM/EM: A: AcFor 0,1% B: MeOH Fluxo: não informado | CLAE-UV: quantificação. UV a 287 nm CLAE-EM-EM IES (+): confirmar a presença de SAs | Não informado | Resíduos das drogas originais (14 das 16) e/ ou metabólitos encontrados nos ovos por CLAE-EM/EM | 37 |
| Oxitetraciclina Tetraciclina Clortetraciclina Doxiciclina | Leite de vaca | Diluição do leite em água (1:5). 1 ml dessa solução percolada no cartucho de EFS. | Isolute ® C8 <i>endcapped</i> (500 mg) | Água | Não informado | Água | Extrato seco + FM. Filtração: 0,5 µm | LiChrospher ® 100 RP-8 <i>endcapped</i> | ACN 7% /AcAce em água (35:65). Fluxo: 1,0 ml/min | DAD (200 - 450 nm) | Não informado | Recuperações > 80% | 38 |

| Antimicrobiano | Amostra | Pré-tratamento da amostra | Extração em Fase Sólida | | | | Cromatografia Líquida | | | Análise Instrumental | LD | Recuperação | Refê-reência |
|---|---|--|--|---|--|--------------------------|--|--|--|---|--|--|--------------|
| | | | Adsorvente | Condição-namento | cleanup | Eluição | Prepara-ção da amostra | Coluna | FM | | | | |
| Oxitetraciclina Tetraciclina Clortetraciclina Doxiciclina | Músculo de cordeiro (5g) | Adição sol. tampão Mcllvaine-EDTA. Centrifugação. Sobrenadante completado a 50 ml com sol. tampão Mcllvaine-EDTA. 30 ml do extrato para EFS. | SepPak Plus C18 <i>endcapped</i> | MeOH e água deionizada | Água deionizada e seco ao ar. | Ácido oxálico metanólico | Extrato evaporado sob N ₂ e dissolvido na FM. Filtração 0,45 µm. | Chromolith Performance RP-18e. | AcOxa. 2 H ₂ O 0,01mol/l / MeOH / ACN (75:12,5: 12,5) Fluxo: 2 ml/min. | DAD: faixa de λ 240 – 450 nm | Não informado | Recuperação: 57,1 – 77,6%. | 39 |
| Oxitetraciclina Tetraciclina Clortetraciclina Doxiciclina | Leite de vaca e músculo (5g) | Centrifugação com TCA 20%. Mistura com tampão Macllvaine. Centrifugação. Sobrenadante aplicado na EFS. | Oasis HLB (200 mg) | MeOH e água | MeOH 5% em água | MeOH | Extrato evaporado sob N ₂ e dissolvido em MeOH. Filtração: 0,45 µm | Hypersil C8 a 40°C | AcOxa. 0,01mol/l / ACN/MeOH (60: 25: 15) Fluxo: 1 ml/min | DAD a 365 nm | Tabela 3 | > 81,1% em leite e 83,2% em músculo e RSD = 5,8% | 40 |
| Tetraciclina Oxitetraciclina Doxiciclina | Água de superfície de 20 lugares diferentes | Amostras e padrões aquosos (20 ml) bombeados a 1 ml/ min. através da minicoluna. MeOH bombeado através da minicoluna. | Strata-X (20 mg - Polímero) <i>on line CE</i> | Não mencionado | Água e ar para remover a água. | MeOH | Sistema Capilar Eletroforese Capilar sílica-fundida a 25°C e aplicado 10 KV Sistema contínuo de fluxo (SCF), extratos contendo os analitos, inserido num mini frasco do auto-amostrador do CE. Solução eletroforética: HCl 1 mol/l à HCl 50 mmol/L (pH< 2,5) – tampão ácido | | DAD a 260 nm | 2 g/l | Amostras <u>for-tificadas</u> : 92% <u>Água de super-fície</u> : ausência de resíduo | 5 | |
| Oxitetraciclina (OTC) Sulfacoropiridazina (SCP) Tilosil (TYL) | Solo (4 g) e dejetos líquidos de suíno (2 ml) | <u>Solo</u> : adição tampão MeOH/ EDTA 0,1mol/l / Mcllvaine (50: 25: 25). <u>Ultra-som</u> . Sobrenadante diluídos com água para reduzir MeOH a 2%. pH 2,9 (H ₃ PO ₄). <u>Dejeto líquido</u> : adição tampão EDTA 0,1mol/l / Mcllvaine pH 7 (50: 50). <u>Ultra-som</u> . 5 ml do sobrenadante + H ₃ PO ₄ + ACN | SAX – HLB em série (Technology SAX - Oasis HLB) Extratos de solo e dejetos percolados a 10 ml/min | MeOH e MeOH/ EDTA 0,1mol/l / Mcllvaine, (50:25:25) diluído em água destilada (15: 400) e acidificado a pH 2,9 (H ₃ PO ₄) com H ₃ PO ₄ Após percolação SAX removido | MeOH/ EDTA 0,1mol/l / Mcllvaine, 50:25:25 diluído em água destilada (15: 400) e acidificado a pH 2,9 (H ₃ PO ₄) com H ₃ PO ₄ Após percolação SAX removido | MeOH | Não informado | Gênese C18 A: THF B: ACN C: TFA 0,05% Fluxo: 1 ml/min. Para análise de SCP no solo: derivatização (FMs iguais, mas com programa gradiente diferente. Fluxo: semelhante) | Simultânea detecção a 285 nm para SCP e TYL e 355 nm para OTC. SCP no solo: detecção por fluorescência e derivatização com fluorescamine: λ de 400 e 495 nm | Solo: 18, 18 e 40 µg/ Kg para OTC, SCP e TYL respectivamente (análise dos brancos). Dejeto líquido: 70 e 140 µg/ Kg para OTC e SCP respectivamente | <u>Solo</u> : 27 – 105% (n = 6). DP: 1 – 12% para os 3 analitos. <u>Dejeto líquido</u> : 58 – 102% (n = 3) . DP: 1 -5% para OTC e SCP. Não foi possível quantificar TYL | 41 | |

| Antimicrobiano | Amostra | Pré-tratamento da amostra | Extração em Fase Sólida | | | | Cromatografia Líquida | | | Análise Instrumental | LD | Recuperação | Refê-reência |
|--|-----------------------------------|--|--|---|---|------------------------------------|--|---|---|--|--|--|--------------|
| | | | Adsorvente | Condicio namento | cleanup | Eluição | Prepara-ção da amostra | Coluna | FM | | | | |
| Sulfonamidas (inclui SMX) | Músculo (10 g) | Adição de acetato de etila + Na ₂ SO ₄ anidro. Centrifugação. Extratos evaporados. Resíduo dissolvido em acetato de etila. Percolação EFS | Speedisk Aromatic sulfonic acid (200 mg) | n-hexano e acetato de etila | Água e MeOH | MeOH-amônia (97,5: 2,5) | Extrato evaporado. e dissolvido em tampão acetato (pH 4,5) com 0,1 % MeOH Filtração: 0,45µm | C8 | Tampão acetato 0,05M (pH 4,5) Fluxo: 0,4 ml/min. | DAD a 270 nm | Tabela 3 | Tabela 3 | 42 |
| Tetraciclina Oxitetraclina Clortetraciclina Doxiciclina Minociclina Metaciclina | Mel de diferentes flores (3 g) | Fortificação com as TCs + tampão EDTA 0,1mol/l -McIlvaine (pH 4). Mistura. Percolação EFS | Discovery DSC-fenil (500 mg) | ACN, sol. ácido oxálico 10 mmol/l (pH 3) e sol. saturada EDTA | sol. ácido oxálico 10 mmol/l (pH 3) | 5 mL MeOH 10% em acetato de etila. | Extrato concentrado e dissolvido em sol. AcOxa Filtração: 0,45 µm | Discovery RP-Amida C16 <i>endcapped</i> | A: Acido oxálico 10 mmol/L (pH 3) B: ACN Fluxo: 1ml/ min | DAD: 270 e 355 nm | 15 – 30 ng/g dependendo do analito | Mel fortificado: 92,1 a 96,1 % e RSD = 4,0 - 5,4% (n = 6). Amostras de mel: nenhuma das TCs identificada | 43 |
| Oxytetraciclina (OTC) Sulfaclopropiridazina (SCP) Tilosina (TYL) | Águas de superfície e subterrânea | Águas de superfície: filtração (2,0 µm). Água subterrânea: centrifugação e filtração (0,8 µm). Adição tampão extração (EDTA-McIlvaine) e MeOH 2% . 500 mL amostra percolada a 10 ml/min. na EFS. Amostra final ajustada a pH ~ 2,9 com H ₃ PO ₄ ao tampão de extração. | SAX e Oasis HLB em série. SAX removido e HLB lavado. | MeOH e tampão de condicionamento/lavagem (diluição do tampão de extração) | tampão de condicionamento/lavagem, AceSódio 0,1 mol/l, água destilada e MeOH 20% e seco por 10 min. | MeOH. | Não informado | Gênesis C18 | A: tetrahydrofurano B: ACN, C: TFA 0,05% em água Fluxo: 1ml/min | UV -Visível: 4 λ simultaneamente monitorados: 285 SCP e TYL e a 355 nm OTC com adicional monitoramento a 260 nm SCP e TYL e 370 nm OTC | MeOH : 30 a 70µg/l | >70% a 1 µg/l e ~ 95% a 10 µg/L em água do rio. Sem detecção em águas de superfície Em águas subterrâneas foi detectados SCP e OTC a 613,2 e 36,1 µg/l respectivamente | 61 |
| Oxytetraciclina Tetraciclina Clortetraciclina (CTC) Doxiciclina (DC) | Água do mar e de rio | Filtração (2 µm). pH 3,4 com ácido fórmico e adição de Na ₂ EDTA 0,0 2 mol/l. 250 ml percolados a 5 ml/min | Oasis HLB (30 mg) | MeOH, água e tampão Hfor pH 3,4 Fluxo: 5 ml/min. | Água com 5% MeOH a 5 ml/min. e seco ao ar 5 min. | MeOH com 1% TFA a 0,5 ml/ min. | Diluição 1 vez com água. Filtração. Fator de concentração de 125 | Polimérico a PLRP-S 100 Å | A: AcOxa 0,01 mol/ l B: ACN Fluxo: 1,2 ml/min. Sol. de derivatização pós-coluna: sol. Mg(II) 0,1 mol/l a pH 9 no f luxo: 0,6 ml/ min | Detector de fluorescência λ _{ex} = 374 nm λ _{em} = 499 nm | Sol.Padrão: 0,3 a 1,2 µg/l Água de rio: 0,03 a 0,150 µg/l | Matrizes fortificadas: > 80% para todos os analitos e RSD% ≤20% Matrizes não fortificadas: DC e CTC presentes | 65 |
| COL – 3, TC quimicamente modificada. | Plasma humano | PI (Chrysin à 250 ng/ µl) adicionado 500 µl amostra de plasma em gelo. + AcFor 50%. Mistura. 500 µl para EFS | Oasis HLB (30 mg) | MeOH e água | MeOH/ água (5: 95) | MeOH | Extrato evaporado + AcAce (1:99) em ACN/ AceSódio 0,01mol/l pH 3,5 (30:70) | Symmetry Shield C8 | A: EDTA 0,001mol/l em AceSódio (0,01mol/l (pH 3,5) B: ACN Fluxo: 1 ml/min | UV- Vis: 350 nm | Não informado | Plasma fortificado: 61,2 a 65,3% . Amostra de paciente: 100 a 40000 ng/ml | 44 |

| Antimicrobiano | Amostra | Pré-tratamento da amostra | EFS | | | | CL | | | Análise Instrumental | LD | Recuperação | Refê-reência |
|---|---|---|--|---|---|--|--|-----------------------------------|---|---|---|---|--------------|
| | | | Adsorvente | Ativação / condicionamento | cleanup | Solvente de Eluição | Preparação da amostra | Coluna | FM | | | | |
| Oxytetraciclina Tetraciclina Clortetraciclina Doxiciclina (DC) e produtos de degradação | Água de 15 microcosmo aquático externos de 12000 l (4 l de cada microcosmo) | 100 ml para controle e para os níveis de fortificação de 300 e 100 µg/l; 300 ml para os níveis de 10 e 30 µg/l. A cada 100 ml de cada amostra: H ₂ SO ₄ 40% e EDTA. Mistura. Filtração (1,6 µm) Percolação a 10 ml/min. em EFS. | Oasis HLB (200 mg) | MeOH, HCl 0,5mol/l e água deionizada. | Água deionizada | MeOH | Extrato evaporado e reconstituído com 1 ml MeOH | Hypersil BDS C18 | A: MeOH/ ACN/ água com 0,1% TFA (2: 7: 91) B: ACN | UV-Vis: 260 nm (CL-EM/EM): Análise quantitativa dos metabólitos: espectro full scan | LD médio = 2,5 µg/l | 96 – 109% Sem diferença estatisticamente significativa nas variáveis de background entre os microcosmos. Tempo de meia vida: 1 a 4 dias para as 4 TCs | 45 |
| Oxytetraciclina (OTC) Tetraciclina Clortetraciclina Doxiciclina | Água de tanque de criação de peixe, rios e lago | Filtração (0,8 µm) + Na ₂ EDTA. 250 ml percolada a 10 ml/min em EFS | Oasis HLB (500 mg) | MeOH e água contendo Na ₂ EDTA | Água para remover o excesso de Na ₂ EDT e seco sob vácuo | MeOH com AcOxa 10 mmol/l | Extrato seco sob N ₂ e dissolvido em 1 ml água. Fator de pré-concentração: 250 | Agilent Zorbax Eclipse XDB -C8 | A: MeOH B: água com AcOxa 10 mmol/l Fluxo: 1 ml/min. | DAD a 360 nm | 60 µg/l para todas as TCs (sinal/ruído = 3) | 0,5 a 4,25 µg/l | 46 |
| Oxytetraciclina (OTC) Tetraciclina | Mel (57 amostras de diferentes origens botânicas) (3 g) | Tampão Na ₂ EDTA 0,1mol/l -McIlvaine (pH 4,0). Mistura. Filtração e percolação em EFS | 1º EFS: Oasis HLB (200 mg) 2º EFS: Bond Elut LRC-PRS (500mg) (trocaador de cátion) | MeOH e água | Água e MeOH | MeOH. O extrato foi aplicado na 2º EFS HOxa 1mol/l ACN (80:20) (FM) | Extrato final filtrado (0,45 µm) | Nucleosil C18 | Tampão ACN /AcOxa 10 mmol/l (20: 80: pH 2,0) Fluxo: 0,8 ml/min Sol. de derivatização pós-coluna: tampão H ₃ BO ₃ pH 9 em acetato de Mg no fluxo de 0,5 ml/min | Detector de fluorescência λ _{ex} = 385 nm e λ _{em} = 500 nm | Tabela 3 | Amostras fortificadas: OTC: 86% eTC: 95% 57 amostras de mel: nenhuma continha resíduo de OTC e TC nos níveis detectáveis. | 47 |
| etraciclina Oxytetraciclina Clortetraciclina | Camarão (2 g) e leite (10 ml) | Leite: ácido succínico. Agitação. Camarão: NaCl e ácido succínico. Mistura. Leite e camarão centrifugados a 4°C. Filtração para tubo com alumina e AcOxa 0,01 mol/l (camarão). Extrato camarão centrifugado | Oasis HLB (200 mg) 15 min. antes da extração 20 ml amostras fortificadas percolara mmo cartucho a 45 gotas/min | MeOH, água e ácido succínico | Água e coluna seca por 5 min a vácuo | MeOH. eluido por gravidade | Leite: extrato diluído a 10 ml AcOxa 0,01mol/l Camarão: extratos evaporados sob N ₂ + 1 ml ACN. Evaporação. Resíduo dissolvido em 2 ml AcFor 0,1%. Mistura | Hydro-bond PS C8 <i>endcapped</i> | 75% A + 18% ACN + 7% MeOH, onde: A = AcOxa 0,01 mol/l para amostras de leite ou A = AcFor 0,1% para amostras de camarão Fluxo: 1 ml/min | Quantificação: UV-Vis: 370 nm Confirmação dos analitos: CLAE-EM/EM | Não informado | Amostras fortificadas: > 76% com RSD < 10% Amostras de camarão: 25 – 400 ng/ g Amostras de leite: 50 – 300 ng/g por CLAE-EM/EM | 48 |

| Antimicrobiano | Amostra | Pré-tratamento da amostra | EFS | | | | CL | | | Análise Instrumental | LD | Recuperação | Refê-rencia |
|--|---|---|--|---|-------------------------------------|--|---|---------------------|---|----------------------|--|---|-------------|
| | | | Adsorvente | Ativação / condicionamento | cleanup | Solvente de Eluição | Preparação da amostra | Coluna | FM | | | | |
| Sulfonamidas Trimetoprima Tetraciclina Fluoroquinolone β-lactame | Água de nascente e de refúgio de indústria farmacêutica | Filtração: papel Whatman e membrana 0,45 µm. Água de nascente pré-filtrada fortificada com 1 ml sol. padrão de trabalho. 100 ml de água fortificada (pH 4) e de refúgio (pH 4) percolada a 4 ml/min em EFS | Oasis HLB (60 mg) | MeOH e água (ajustada a pH 4 com HCl) | MeOH 2% e seco por 5 min sob vácuo | MeOH | Extratos evaporados 40°C e redissolvidos com 1 ml de MeOH (pré-concentração de 100 vezes) | LiChrosphere 100 CN | A: AcOxa 0,0 mol/l B: ACN Fluxo: 1 ml/min. | DAD a 280 nm | 0,1 – 40 µg/l | Amostras fortificadas (n=3): 89,3% a 97,9% exceto 2 analitos Amostras de refúgio de indústria (n=2): Tr e espectro UV confirmaram a presença dos analitos alvo | 49 |
| Sulfonamidas | Ovos (5 mL) e carne de porco (5 g) | Adição Ferricianeto de potássio + Sulfato de zinco Mistura. Aquecimento. Filtração + ACN. Ultra-som. Filtração (0,2 µm) + ACN e diluição a 200 ml com água. pH 4,0 a 4,5. Percolação a 4,5 ml/min por 23 min. | Carbono nanotubos multi walled (80 mg) EFS-CLAE online | Não informado | Não informado | MeOH/ água (pH 3,2 - 3,3 AcFor 30%) (22:78) no fluxo de 1 ml/min Fator de concentração: 37,7 a 160,9 | Não informado | Alltech-C18 | MeOH / água (pH 3,2 - 3,3 AcFor 30%) (22:78) Fluxo: 1 ml/min | UV a 270 nm | 4,1 – 10,0 ng/ L | Amostras fortificadas: 69,5 – 81,47% (ovos) 66,35 – 85,59% (porco) RSD: 0,86 – 14,56% ovos e 1,02 – 7,56% porco | 50 |
| Sulfonamidas (inclui SMX) | Mel multifloral (5 g - branco) | Adição tampão acetato 0,05 mol/l (pH 3,6) até 25,0 ml com fortificação. Filtração (0,2 µm). 1 ml do filtrado aplicado em EFS | Absolut Nexus (30 mg) Polímero | MeOH e tam-pão acetato 0,05mol/l (pH 3,6) | Água – MeOH (95:5) e seco sob vácuo | ACN | Extrato seco sob N ₂ e dissolvido com 1 ml da FM, contendo 3 mg/l de PI | Inertsil ODS-3 | MeOH e tampão acetato 0,05M (pH 3,6) (20:80), com HAc 1% Fluxo: 1 ml/min | UV a 263 nm | 20 – 25 µg/ Kg no extrato da amostra fortificada | Amostras fortificadas: 80 a 117% RDS = 0,5 – 5% (n=5) | 52 |
| Sulfonamidas | Água de refúgio de instalações de suínos | 150 mL de água de refúgio e percolada em EFS | Oasis HLB (60 mg) | MeOH, HCl 0,5 mol/l e água | Água | Amônia: MeOH (1:19) | Extrato seco sob N ₂ e reconstituído em 500µl FM | Supelcosi 1 C18 | A: AcAce 0,5% em água B: ACN Fluxo: 1 ml/min | UV a 272 nm | Não informado | Baixa concentração: 30,8 a 105,1%; média: 33,8 a 106,8% e alta: 35,9 a 108,3% em água deionizada. Água de refúgio: positivo para SAs em 103 amostras | 53 |

Tabela III: Avaliação dos parâmetros de quantificação e/ou validação da Tabela II

| Curva de calibração | Níveis de fortificação | LD | LQ | Exatidão/ precisão | Obs | Referência |
|--|---|--|--|--|---|------------|
| Não informado | 100 ng/g | 15 – 22 ng/ g | Não informado | Não informado | | 35 |
| Detecção UV: 0,1, 0,5, 1, 5, 10 e 50 mg/l em água ultrapura (calibração externa). $r^2 = 0,9998$ MRS: 1, 5, 10, 50, 100, 500 e 1000 µg/l em água ultrapura (calibração externa). Curva de 2º ordem, $r^2 = 0,996$. | 37,5 µg/l em água ultrapura e ET secundário (n=5) 1 µg/l em água ultrapura e ET secundário e 5 µg/l em ET secundário | De acordo com <i>German norm DIN 32645</i> Detecção UV: 0,2 – 0,6 mg/l em água ultrapura; em ET 2ário fortificado: aumento de 5 - 10 vezes Detecção EM: 0,2 a 3,7 µg/l em água ultrapura | De acordo com <i>German norm DIN 32645</i> Detecção UV: 0,6 – 1,7 mg/l em água ultrapura; em ET 2ário fortificado: aumento de 5 - 10 x vezes Detecção EM: 0,6 a 10,2 µg/l em água ultrapura | Detecção UV: 18 a 101% e DPR = 2 a 16% para todos os analitos (fortificada: 37,5 µg/l) Detecção EM: 29 a 100% e DPR = 1 a 13% para todos os analitos (fortificada a 1 e 5 µg/l) | Para detecção UV não permitiu a quantificação na região de µg. Sulfafenazole foi usado como PI porque não é usado na Alemanha e assim não é esperado nas amostras | 24 |
| Faixa: 0,2 – 20 ng $r^2 = 0,9997$ com $P < 0,01$ | 0,1, 0,5 e 1,0 µg/ml em 1 ml leite (estáveis por 12 h a 4°C) | 0,2 ng | Não informado | Precisão inter-dia e intra-dia nos níveis de fortificação (n=5). Recuperação > 89,8% com CV entre 0,6-4,1% Resultado livre de interferentes | Sol. padrão estoque: 10 mg/ 100 ml em HAC 1%. Sol. de trabalho: diluição da sol estoque em água destilada (estável 1 mês na geladeira) | 36 |
| Soluções de 1,0, 0,5, 0,25 e 0,1 µg/ml: diluição da mistura de padrões em água. Baseado na concentração (5 x), as soluções de trabalho equivalentem: 200, 100, 50 e 20 ng/g | Amostras controle fortificadas: 50, 100 e 200 µg/l (n = 5); Amostra controle: (n = 4) | Não informado | Não informado | Detecção UV: DPR%: 3 – 33 Recuperações: 51 – 103% para todos os analitos nos 3 níveis de fortificação | Avaliação CLAE-EM-EM em ovos de galinhas poedeiras (n=5) tratadas com SAs e ovos controle obtidos antes do tratamento. | 37 |
| Curvas de TCs isoladas em amostras de leite fortificadas na faixa : 0,1 – 1,0 µg/ ml foram lineares. $r^2 > 0,995$ com $P < 0,01$ $r^2 = 0,9999$ para todas TCs | 0,1, 0,2, 0,3, 0,5 e 1,0 µg/ml em 2 ml leite (estáveis por 12 h a 4°C) | Não informado | Limite prático de quantificação: média <i>background</i> + 10 x DP. 5 amostras de leite branco analisados em duplicata. Limite: 0,1 µg/ml. | Recuperações > 80% e DP: 1,3 – 4,8. | Extratos livres de nterferentes. Espectros obtidos das amostras iguais aos dos padrões. | 38 |
| | 50, 100, 500 µg/ Kg, | Não informado | Sinal / ruído = 10 (mais baixo que a considerada pela AOAC: 50 e 100 µg/ KG) e comparável ou melhor com UV-DAD LQ: 12 – 65 µg/ kg | Recuperação média: 57,1 – 77,6%. DPR < 10% Precisão análise cromatográficas: 5 x injeções no mesmo dia de uma sol. padrão e um extrato fortificado: DPR para Tr: 0,1 – 0,5%, RSD para áreas de pico: 0,4 – 2,4%. Nenhuma diferença entre sol. padrão e extrato. | Tr reduziram 40-60% comparados as convencionais colunas RP-C8/ C18, carbono grafite ou polimérico mo fluxo de 1,0 – 1,5 ml/min. Pratos teóricos: 338 – 780 N/ cm. Tr: 6 min. com boa simetria e aceitável fator de separação 1,27 | 39 |
| Faixa: 0,1 – 5 mg/l. (5 padrões dissolvidos em MeOH). Curvas preparadas diariamente (padronização externa) $r^2 > 0,998$ para todas TCs | 50, 100 e 150 µg/kg Amostras analisadas 6 x em 3 diferentes dias (n=18) | LD = Limite de decisão = $CC\alpha$. Amostras de 20 brancos de leite e 20 brancos de músculo fortificados a 100 µg/Kg (LRM). $CC\alpha$: 107,7 – 129,9 µg/kg $CC\alpha$: Concentração determinada com certeza estatística que o analito identificado está acima LRM | Capacidade de detecção = $CC\beta$: análise de 20 brancos fortificados no nível correspondente a $CC\alpha$ para cada analito em ambas as matrizes = 114,9 – 133,1 µg/kg. $CC\beta$: concentração a qual o método está apto a detectar concentrações LRM com certeza estatística. | Precisão interdia: 5,04 – 1,70 ng/ml para leite e 7,01 – 1,65 ng/ml para músculo. Exatidão: - 19,68 a -6,7 ng/ml para leite e -18,16 a -7,96 ng/ml para músculo. Ou exatidão: 80 – 110% e precisão: DPR < 15% | De acordo com SANCO/ 1805/ 2000. Especificidade: 20 amostras de leite e carne branco, de diferentes origens foram analisadas. Nenhum interferente foi observado na região de interesse onde o analito elui. | 40 |
| Calibração externa obtida de soluções padrão em MeOH nas condições ótimas do SCF para ser as mesmas das amostras de águas de superfície. | 10, 20, 30 e 40 g/l (n=12 amostras) | 1,6 a 2 g/l | 4 a 7 g/l | Nenhuma diferença entre a concentração adicionada e a encontrada pelo t-test. Concentrações foram estatisticamente significante que atesta a exatidão do método. DPR: 6,3 a 7,5% | O sistema de fluxo permite a pré-concentração e <i>clean-up</i> automática de drogas da água de superfície e fornece LD baixo suficiente para uso no monitoramento ambiental de drogas. | 5 |

| Curva de calibração | Níveis de fortificação | LD | LQ | Exatidão/ precisão | Obs | Referência |
|--|---|---|--|--|--|------------|
| Não informado | Solo: 0,2, 1,0 e 5,0 mg/kg. (n=3 e cada analisados 2x) Dejeito: 1, 5, 10 e 20 mg/l (n=3) | Tabela 2 | Não informado | Tabela 2 | 400 e 495 nm: para obter detecção seletiva e sensível a baixas concentrações | 41 |
| Faixa: 0,1 – 10 µg/ml $r^2 > 0,9999$ | 0,5, 1 e 1,5 x LRM = 50, 100 e 150 µg/kg (n=54) respectivamente | Instrumental: $y = a + 3 \times$ erro padrão. Y calculado usado na equação de regressão. Foi $< 0,1 \mu\text{g/ml}$ Limite de decisão: $CC\alpha$ ($\alpha = 0,05$), a partir do LRM + $1,64 \times$ DP das amostras fortificadas no LRM. Na prática $CC\alpha$ obtido de 18 curvas nos 3 níveis de fortificação. Faixa: 105,2 – 116,2 µg/kg | Capacidade de detecção: $CC\beta = CC\alpha + 1,64 \times$ DP. Na prática $CC\beta$ obtido de 18 curvas nos 3 níveis de fortificação. Faixa: 110,9 – 134,9 µg/kg | Em 3 dias diferentes (n=18 x 3): 50µg/ kg: (n=6 x 3): 56 – 99% DPR: 2 – 15% 100µg/ kg: (n=6 x 3): 61 – 107% DPR: 2 – 14% 150µg/ kg: (n=6 x 3): 54 – 83% DPR: 3 – 15% | European Union 002/657/EC. Estabilidade das SAs: em MeOH (sol estoque): 1 ano a 4°C; na matriz (músculo fortificado a 50 µg/ kg: 4 semanas a –20°C e extrato purificado estocado antes da análise fortificado a 50 µg/kg: depois de 2 e 7 dias: máx. 2 dias. Especificidade: 20 brancos de espécies diferentes. Nenhum interferente ao redor do Tr dos analitos foi detectado. | 42 |
| Padronização externa. Para cada analito curvas distintas. Linearidade variou de 50 - 650 ng/ml e 100 - 850 ng/ml a 355 nm $r^2 = 0,9994 - 0,9999$. Análise estatística da regressão linear: não existe diferença estatística entre o intercepto e zero. | 15 – 30 ng/g em diferentes tipos de mel anterior a extração (n =5) | LD = 3 x DP residual do intercepto LD = 4 - 10 ng/ ml para todos os analitos. | Não informado | Repetibilidade do método: 10 injeções replicadas da mesma amostra a 300 ng/ml = DPR = 1,2 – 3,2% . Reprodutibilidade: 10 injeções da mesma amostra a 300 ng/ml em dias diferentes = DPR = 2,1 – 4,8% | Descarte dos 1º mls do extrato da EFS foi avaliado: 0, 0,25, 0,5, 0,75 e 1,0 ml. A melhor recuperação foi com 0,5 mL de descarte (elimina efeito de matriz) Pureza dos picos: razão entre 2 λ: nenhuma impureza coeluiu. | 43 |
| 0,0, 0,1, 0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 25,0 e 50,0 µg/ml em MeOH a partir da mistura das sol. estoque (n= 27). Valor de r^2 aceitável, mas <i>plotando</i> os resíduos, regressão tendenciosa para padrões mais concentrados e não passou perto da origem ou das concentrações mais baixas. Indicou curva de 2º ordem para OTC, faixa de 0,1 – 10µg/ml e inclusão da origem na regressão. | 0,0, 1,0 e 10 µg/l em 500 ml de água do rio (n= 18) em dias diferentes: cada dia com 2 brancos, 2 alta conc. e 2 baixa conc. | Baseado na variabilidade dos padrões em MeOH a 0,10 µg/ ml LD = 30 a 70µg/l para todos os analitos | Não informado | Recuperação: >70% a 1 µg/l e ~ 95% a 10 µg/l em água do rio para todos os analitos DPR = 2,5 – 11,5% nos 2 níveis e para todos os analitos | Seletividade: razão das áreas dos picos entre 260 e 285 nm para SCP e TYL e 355 e 370 nm para OTC calculado para os padrões dissolvidos em MeOH (livre de matriz) e os extratos das amostras para garantir que o método não sofre interferência nos λ selecionados e Tr: não houve diferença nas razões, o método é seletivo na escolha dos λ | 61 |
| 1 – 25 µg/l para OTC e TC 3 – 50 µg/l para CTC e DC. $r^2 > 0,99$ | 2 – 10 µg/l | Sinal/ ruído = 3:1 Sol.Padrão: 0,3 a 1,2 µg/l Água de rio: 0,03 a 0,150 µg/l | Não informado | Precisão: 7 x sol. padrão 8 µg/l de OTC e TC, 16 µg/l de CTC e DC no mesmo dia. DPR < 10% | Quantificação de cromatogramas adquiridos da $\lambda_{\text{ex}}/ \lambda_{\text{em}}$ <i>Volume de breakthrough</i> : 250 ml. | 65 |
| Linearidade: 75 – 10000 ng/ml padrões de trabalho de COL-3 em plasma humano (n=3) $r^2 \geq 0,99$ Curva: razão da área do pico de COL-3 e PI. Usou-se 1/[COL-3] PI = Chrysin | 150, 2000, 8000 e 30000 ng/ml em plasma humano (n=3) Doses de 25, 50, 75 e 100 mg/ m ² / dia de amostras de pacientes: (n=3-6). Período: 8 semanas | Não informado | Sinal/ ruído = 10:1 de COL-3 LQ: 75 ng/ml de COL-3 (sinal/ ruído = 12:1). (O sinal/ ruído para o PI = 180:1) | Precisão intra e inter dia: máx. 17,0 e 2,0% respectivamente. Exatidão: dentro de 13,9% em todos os níveis | COL-3 é um não-antimicrobiano, com efeito, antitumor. Especificidade: inspeção visual dos cromatogramas: nenhum interferente nos plasmas branco (n=12) | 44 |

| Curva de calibração | Níveis de fortificação | LD | LQ | Exatidão/ precisão | Obs | Referência |
|---|---|---|--|---|---|------------|
| Método de padrão externo usando uma mistura de TCs preparadas em MeOH | 0, 10, 30, 100 e 300 µg/l da mistura dos analitos (n=3 para cada nível). | Método: $t(n-1, 1-\alpha) \times DP$ de 100mL de amostra fortificada a 30 µg/l (n = 8) Student's t-value a 99% nível de confiança = 2,998 LD médio = 2,5 µg/l | Não informado | 96 – 109% DP = ± 4% | A cada 2 dias microcosmos tratados para manter concentração de cada analito. Foram mantidos dentro de ± 15% da concentração nominal por 35 dias. Depois do 35º dia a degradação e destino dos compostos de origem foram monitorados. | 45 |
| Não informado | 0,5 – 4,2 µg/l em OTC (água do tanque de peixe) (n=5) 0,5 – 2,5 µg/l sem OTC (rios e lago) | 60 µg/l para todas as TCs (sinal/ ruído = 3) correspondente a 0,24µg/l depois de 250 vezes pré-concentrada em EFS | Não informado | DPR = 5,8% | | 46 |
| Padronização externa Faixa: 0,025 – 1,0 µg/ml na sol. padrão de trabalho (FM) $r^2 > 0,9990$ para 10 curvas em 3 dias diferentes | 50, 100 e 200 µg/Kg (n=6) em 3 dias diferentes (n=18) | LD = Limite de decisão = $CC\alpha$: fortificação de 3 series de brancos de mel a 4 níveis: 50, 100, 150 e 200 µg/Kg e a resposta <i>plotada</i> x concentração adicionada. $r^2 > 0,991$ para todas as curvas. A concentração no intercepto $Y + 2,33 \times DP$ da reprodutibilidade intra-lab do intercepto = limite de decisão $CC\alpha = 20$ a 21 µg/kg | Capacidade de detecção: $CC\beta = CC\alpha + 1,64 \times DP$ da reprodutibilidade intra-lab da medida média contendo o limite de decisão $CC\beta = 49$ e 50 µg/kg | Recuperação: 86 a 95% com baixos DPR Precisão inter e intra dia: DPR ≤ 8. | Guia <i>European Union</i> 002/657/EC Interferentes (especificidade): 15 amostras de mel coloridos analisados: nenhum interferente perto dos Tr de OCT e TC. | 47 |
| 20, 50, 100, 200 e 400 ng/ml em solução de trabalho em HFOxa para análise do leite e em HFor para análise do camarão. $r^2 > 0,9975$ para curvas de calibração diária | 50, 100, 200, 300 e 400 ng/g em solução de trabalho. 50 ng/g em camarão (n=9) | Não informado | 50 ng/ g para cada TC em camarão e leite, baseado no nível de validação mais baixo | Recuperação: > 76% com DPR < 10%. DPR para cada nível de validação: 0,7 a 10,6% DPR em cada conjunto de 50 ng/g: 2,4 a 7,5% | | 48 |
| 5 concentrações na faixa: 1,5 – 1000 µg/l dependendo do fármaco. Curva para cada composto de água fortificada. Método da regressão linear, $r^2 > 0,9989$ | 10 mg/l solução estoque da mistura de fármacos em 100 ml água de nascente | Injeção de sol. padrão diluída em série até a razão sinal: ruído = 3 para qualquer analito LD = 0,1 - 40 µg/l | Injeção de sol. padrão diluída em série até a razão sinal: ruído = 10 para qualquer analito LQ = 1,5 – 100 µg/l | Precisão intra-dia (n=3) em 1 dia: DPR < 8,4% = alta repetibilidade do método EFS-CLAE. Precisão inter-dia (n=3) em 3 dias diferentes: DPR 3,3 a 10,1% | Precisão no Tr: DPR < 1,5% e seletividade: ausência de falso positivo nos brancos, e boa separação. | 49 |
| Linearidade: 0,2 e 100 µg/l | Branco fortificados a 4, 6 e 8 ng/g em 5 g / 5 mL de amostras (n=3) | 4,1 – 10,0 ng/l | Não informado | Precisão da fortificação: 1 µg/l (n=9) no método desenvolvido: DPR = 2,56 – 7,62% | Carbono nanotubos <i>multi walled</i> : diâmetro médio de 60 – 100 nm, comprimento de 5 – 15 µm e área superficial de 40 – 300 m ² /g | 50 |
| Regressão dos mínimos quadrados $Y =$ razão da área do pico da SA e do PI $r^2 = 0,9993$ a 0,9998 | 0,3, 1,0 e 5,0 mg/l (n=8) no mesmo dia e 3 x dia no período de 7 dias | Razão sinal: ruído de 3:1 LD = 20 – 25 µg/kg no extrato da amostra fortificada | Não informado | Precisão intra-dia: DPR = 0,4-2%; precisão inter-dia: DPR = 0,5 – 4% para todas as SAs. Exatidão são os valores de recuperação | PI = cafeína (solução: 150 mg/l em MeOH mantida sob refrigeração) | 52 |
| Calibração externa (n=6). para cada SA. Fortificação de padrões em água deionizada Faixa: 5,0 – 100,0 ng/l $r^2 = 0,9901$ – 0,9998, RDS < 5,5% | 10,0, 25,0 e 100,0 ng/l: baixa, média e alta concentração do CQ em água deionizada (n=6 nos 3 níveis) | Não informado | Mistura padrão de SAs fortificada em água deionizada, extraída e analisada até concentração mais baixa com precisão e exatidão LQ = 5,0 - 7,5 ng/l | Exatidão intradia: 3,5 a 107% e precisão intradia: DPR = 0,4 a 5,0% para os 3 níveis. Exatidão entre-dias: 3,2 a 106% e precisão entre-dias: DPR = 0,3 a 5,4% para os 3 níveis | Seletividade: comparação de cromatogramas de água deionizada fortificada x água deionizada não fortificada: método seletivo Estabilidade: extratos de SAs de 6 semanas mantidos a -80°C, fortificados a 10,0 e 100,0 ng/l (n=2): 3,6 a 99,1% , RSD= 1,5 a 6,9% | 53 |

2.8. AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DA METODOLOGIA DE QUANTIFICAÇÃO DE TETRACICLINA, SULFAMETOXAZOL E TRIMETOPRIMA EMPREGANDO EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

De acordo com a norma NBR ISO/IEC 17025 de 28 de fevereiro de 2001: *Requisitos Gerais para Competência de Laboratórios de Ensaio e Calibração* “Validação é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos para um determinado uso pretendido são atendidos”.

Vários artigos têm sido publicados a respeito de validação de métodos analíticos os quais descrevem definições, procedimentos, parâmetros e estratégias de validação^(31, 33, 78, 79, 80). Órgãos como ICH (*International Conference on Harmonization*), IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), ISO, ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia), USP (United States Pharmacopeia), AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*), US FDA (*United States Food and Drug Administration*), e outros exigem o item validação de métodos analíticos como um requisito fundamental no credenciamento para qualidade assegurada e demonstração de competência técnica. A exigência da validação é obedecida através de guias elaborados pelos comitês e agências regulatórias nacionais e internacionais^(30, 32, 81 - 86). Estes guias são documentos que sugerem uma linha a ser seguida e são, portanto, abertos para interpretações. Os guias são recomendações e são intencionalmente vagos para deixar a flexibilidade de adaptá-los de acordo com o método a ser usado⁽³¹⁾.

Dentro do âmbito geral de validação, este trabalho avaliará parâmetros de validação no laboratório (*in house validation*), que consiste na avaliação dentro de um único laboratório. A validação no laboratório é utilizada para o desenvolvimento de uma metodologia e na publicação de artigos para revistas científicas, porém sem verificar a reprodutibilidade. A validação no laboratório pode ser considerada como preliminar à validação completa (*full validation*). A validação completa envolve todas as características de desempenho e um estudo interlaboratorial que é utilizado para verificar como a metodologia se comporta com uma determinada matriz em vários laboratórios, estabelecendo a reprodutibilidade da metodologia e a incerteza expandida associada à metodologia como um todo. Só assim, a metodologia pode ser aceita como uma metodologia oficial⁽³¹⁾.

De acordo com a Resolução da ANVISA, RE nº 899, de 29 de maio de 2003, lê-se: “No caso de metodologia analítica descrita em farmacopéias ou formulários oficiais, devidamente reconhecidos pela ANVISA, a metodologia será considerada validada”. As metodologias utilizadas neste trabalho são farmacopêicas, no entanto, elas estão fora do seu escopo de análise de compostos majoritários e de matriz e, portanto, a validação deve ser considerada ^(32, 84). Para análise em nível de traços, os parâmetros de desempenho deverão ser avaliados, tanto para amostras padrão quanto para amostras reais, devido à mudança de matriz.

Os parâmetros de desempenho analíticos para validação de métodos que são descritos em farmacopéias ou formulários oficiais são: seletividade/especificidade, linearidade e faixa de aplicação ou intervalo, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez. As variações analíticas dos parâmetros deverão ser mantidas dentro de limites preestabelecidos por critérios baseados na finalidade da análise, sistemas analíticos e estudos estatísticos ⁽⁷⁸⁾.

“Seletividade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz” ⁽³²⁾. O mesmo significado tem sido frequentemente utilizado para o termo especificidade. Esta situação gera confusão e pode ser evitada utilizando somente o termo seletividade como sugerido pela IUPAC.

A seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental de separação e deve ser reavaliada continuamente durante a validação e subsequente uso do método. Algumas amostras podem sofrer degradação, gerando compostos que não foram observados inicialmente, que podem coeluir com substâncias de interesse. A seletividade pode ser obtida de várias formas. A primeira forma consiste em comparar a matriz isenta da substância de interesse e a matriz adicionada do padrão, sendo que, nesse caso, nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção da substância de interesse. Com isso demonstra-se que a matriz não afeta o resultado do teste. Uma segunda maneira é através da avaliação com detectores modernos (arranjo de diodos, espectrômetro de massas), que comparam o espectro do pico obtido na separação com o de um padrão e utiliza-se isto como indicação da presença do composto puro ⁽³²⁾.

Para análise de impureza, a especificidade pode ser determinada pela comparação dos resultados obtidos de amostras contaminadas com quantidades apropriadas de impurezas e amostras não contaminadas, para demonstrar que o resultados do teste não são afetados por

esses materiais. Estas comparações podem incluir a amostra armazenada sob condições de estresse (por ex. luz, calor, umidade, hidrólise ácida /básica, oxidação) ⁽³²⁾.

“Linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado” ⁽³²⁾.

Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, cinco concentrações diferentes que não incluam o ponto zero na curva, devido aos possíveis erros associados ^(31, 32). A relação matemática entre o sinal e a concentração de interesse pode ser expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica. Matematicamente, a estimativa dos coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser efetuada usando o método matemático conhecido como regressão linear. O coeficiente de correlação também pode ser calculado a partir de medições experimentais. Para resíduos, o GARP (Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas) também sugere cinco concentrações que devem ser injetadas em ordem crescente de concentração, no mínimo três vezes cada, com estimativa de desvio padrão relativo (DPR) entre as injeções inferiores a 5% ⁽³¹⁾. A quantificação do composto de interesse pode ser obtida através da padronização externa, padronização interna, superposição da matriz e adição padrão. A padronização externa compara a área da substância a ser quantificada na amostra com as áreas obtidas com soluções de concentrações conhecidas preparadas a partir de um padrão. Através do gráfico que relaciona as áreas obtidas com as concentrações conhecidas do padrão, ou através da equação da curva resultante, pode-se calcular a concentração desta substância na amostra a partir da área da substância obtida de uma injeção em separado. Este método é sensível a erros de preparo e de injeções das soluções amostras e dos padrões e por isso deve ser feito a cada análise. O método de padronização interna consiste na preparação das soluções padrão de concentrações conhecidas da substância de interesse, às quais se adiciona a mesma quantidade de um composto chamado padrão interno. A amostra também é analisada após adição da mesma quantidade conhecida do padrão interno. Neste caso, o gráfico relaciona a razão de áreas (área da substância/área do padrão interno que tem concentração constante) com as concentrações variadas das soluções padrão. A concentração da substância na amostra é obtida através da razão de áreas obtidas. O método de superposição de matriz consiste na adição do padrão da substância em diversas concentrações em uma matriz similar à da amostra, isenta da substância, e construção do

gráfico de calibração relacionando as áreas obtidas com as concentrações dos padrões. O método de superposição de matriz pode ser utilizado tanto com a padronização interna como a padronização externa. Este método é usado para compensar o efeito da matriz ou de possíveis interferentes e é importante em determinações quando a matriz pode interferir na pré-concentração, extração, separação ou detecção da substância de interesse. Apesar de fornecer uma melhor correspondência com a composição da amostra, o método de superposição de matriz não elimina, por exemplo, a intensidade de um efeito, e a concentração de interferentes na matriz podem diferir de uma matriz ou amostra para outra. Em amostras nas quais pode ocorrer o efeito da matriz e não se tem disponível uma matriz isenta da substância de interesse para utilizar o método de superposição de matriz, deve-se utilizar o método de adição padrão. O método de adição padrão consiste na adição de quantidades conhecidas da substância de interesse a quantidades conhecidas da amostra, antes do seu preparo. Constrói-se a curva analítica relacionando as quantidades da substância adicionada à amostra com as respectivas áreas obtidas. O ponto onde a reta corta o eixo das ordenadas corresponde à área do pico da substância que está sendo determinada, sem qualquer adição do padrão. A extrapolação da reta define, no eixo das abcissas, a concentração da substância na amostra analisada. Os métodos de adição padrão, superposição da matriz e padronização externa mostram um comportamento paralelo entre as linhas de regressão, indicando que o método adição padrão tem seletividade. O método de padronização externa é realizado quando nenhum erro sistemático proveniente da matriz é suspeito, enquanto o método de superposição de matriz compensa o efeito da matriz e o método adição padrão corrige o efeito da matriz e as mudanças da resposta do instrumento (31).

“Intervalo é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Normalmente é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método. É estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequadas quando aplicados às amostras contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo especificado” (32).

Em qualquer técnica instrumental, a relação linear simples, descrita pela equação $y = a + b \cdot x$, só é válida em um determinado intervalo de massas ou concentração da espécie medida. Este intervalo, no qual se pode construir uma curva analítica linear, é a faixa linear dinâmica. Ainda que as causas para a perda da linearidade sejam características de cada técnica, este é um fenômeno que pode ocorrer com qualquer conjunto de dados. Assim, o

cálculo dos coeficientes de regressão de uma curva analítica deve ser cuidadoso para verificar se todos os pontos a serem usados estão dentro da faixa linear dinâmica correspondente. Augusto e colaboradores descreveram uma forma de calcular se os pontos de uma curva estão inseridos na faixa linear, baseando-se em relações geométricas do gráfico de regressão ⁽³¹⁾. Para resíduos, o GARP recomenda uma faixa de concentração com valores variando entre a metade e o quádruplo da concentração do limite de quantificação ⁽³¹⁾.

“Precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões sob condições definidas” ^(31,32).

É considerada em três níveis:

Repetibilidade (precisão intra-corrída): concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e a mesma instrumentação. É verificada por, no mínimo, em 9 determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 concentrações baixa, média e alta, com 3 réplicas cada. Ou no mínimo em 6 determinações a 100% da concentração do teste.

Precisão intermediária (precisão inter-corrída): concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e /ou equipamentos diferentes. Recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes.

Reprodutibilidade (precisão inter-labortorial): concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos. Não aplicável a este estudo.

A precisão de um método pode ser expressa como desvio padrão ou desvio padrão relativo (DPR), também conhecido como coeficiente de variação (CV) ⁽³²⁾. Normalmente, métodos que quantificam compostos em macro quantidades requerem um DPR de 1 a 2%. Em métodos de análise de traços ou impurezas, são aceitos DPR de até 30%, dependendo da complexidade da amostra ⁽⁸⁵⁾. Uma maneira simples de melhorar a precisão é aumentar o número de replicatas ⁽³¹⁾. Segundo Wood, o coeficiente de variação (ou DPR) está relacionado com o nível de concentração do analito na amostra, definido pela equação:

$$CV(\%) = 2^{(1 - 0,5 \log C)}$$

na qual C é a concentração do analito. Desse modo, substituindo-se os níveis de concentração nessa equação obtém-se os valores CV ⁽⁷⁸⁾.

“Exatidão de um método é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro”⁽³²⁾. É importante observar que um valor exato ou verdadeiro é o valor obtido por uma medição perfeita e este valor é indeterminado por natureza⁽³¹⁾.

O processo mais utilizado para avaliar a exatidão são os ensaios de recuperação. A recuperação é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada. A recuperação pode ser estimada de materiais de referência certificados, quando disponíveis, ou de um composto substituto que pode ser o padrão da substância adicionado à matriz isenta da substância ou à amostra (fortificação, *spiking*). Os padrões de referência compendiais (obtidos de fontes a Farmacopéia Brasileira e a USP) são substâncias com elevado teor de pureza e que foram cuidadosamente caracterizados para garantir sua identidade, potência e pureza. Os padrões de referência não compendiais são substâncias com elevado teor de pureza. É recomendável que fatores de correção de pureza sejam incluídos em qualquer cálculo existente no método. A limitação do procedimento de recuperação é a de que a substância adicionada não está, necessariamente, na mesma forma que a presente na amostra. Isto pode implicar, por exemplo, na presença de substâncias adicionadas em uma forma que proporcione melhor detecção, ocasionando avaliações otimistas de recuperação. Pelo fato de outros componentes da matriz poderem interferir na separação e detecção da substância, efeitos dos componentes da matriz devem ser investigados. A recuperação está relacionada com a exatidão, pois reflete a quantidade de determinado analito recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra. É expressa como erro sistêmico percentual, inerente ao processo. O erro sistêmico ocorre pela perda da substância devido à baixa recuperação da extração, medidas volumétricas imprecisas ou substâncias interferentes na amostra. Calcula-se a quantidade percentual recuperada pelo processo usando a fórmula:

$$\text{Rec \%} = \frac{(\text{valor obtido} - \text{valor real}) \times 100}{\text{Valor real}}$$

A recuperação deve ser avaliada na faixa de concentração para o composto de interesse. Isto pode ser feito adicionando a substância em pelo menos 3 diferentes concentrações, por exemplo, próximo ao limite de quantificação, próximo à concentração máxima permitida pelo método em teste e em uma concentração próxima à média da faixa de uso do método. Para análises em nível de resíduos, o GARP recomenda que se trabalhe

nos níveis de 1, 2 e 10 vezes o valor de limite de quantificação. As medições de recuperação são expressas em termos de porcentagem da quantidade medida da substância em relação à quantidade adicionada na matriz (branco). Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$. Porém dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até $\pm 15\%$ ⁽³¹⁾.

“A exatidão pode ser inferida uma vez que a precisão, linearidade e especificidade são estabelecidas” ⁽⁸¹⁾.

“Limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, sob condições experimentais estabelecidas” ⁽³²⁾.

O limite de detecção é estabelecido por meio da análise de soluções (ou da matriz) de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável (Método visual) ^(31,32).

No caso de métodos cromatográficos, a estimativa do LD pode ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base ⁽⁸⁴⁾.

“Limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitável sob as condições experimentais estabelecidas” ⁽³²⁾.

O limite de quantificação pode ser determinado por meio do ruído. Neste caso, determina-se o ruído da linha de base e considera a concentração que produzir sinal-ruído superior a 10:1 ⁽³²⁾.

“Robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal” Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez. Constatando-se a suscetibilidade do método a variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento ⁽³²⁾.

Em CLAE, a robustez pode ser avaliada, por exemplo, variando o conteúdo de um solvente na fase móvel em $\pm 2\%$, o pH da fase móvel em 0,1 unidades de pH ou a temperatura da coluna e $\pm 5^\circ\text{C}$. Se estas mudanças estiverem dentro dos limites de exatidão, precisão e seletividade aceitável, então o método possui robustez ⁽³²⁾. Um outro aspecto que pode ser incluído neste trabalho é a variação de lotes de fabricação das fases sólidas em estudo ao longo do desenvolvimento e validação da metodologia. Se não houver

alteração significativa nos resultados, pode-se dizer que o método possui robustez intrínseca, pois manteve sua resposta em meio à mudança de ambiente de análise.

Antes de realizar a validação, deve-se avaliar se o sistema utilizado para análise é capaz de fornecer os dados de qualidade aceitável. Esta avaliação é alcançada com experimentos de conformidade do sistema que poderá ser definida como um conjunto de testes para garantir que o equipamento utilizado está apto a gerar resultados de exatidão e precisão aceitável. Assim, a conformidade do sistema é verificada antes que o desenvolvimento do método e a validação tenham sido completados. Os critérios selecionados são baseados no desempenho do método determinado durante a validação. Por exemplo, se o tempo de retenção da amostra fizer parte do critério de conformidade do sistema, a sua variação (estimativa do desvio padrão) pode ser determinada durante a validação, que pode ter uma variação de 3%, por exemplo, (baseado nos resultados de validação) durante o uso rotineiro. Os parâmetros do perfil cromatográfico do método a serem medidos e seus limites recomendados, de acordo com a US-FDA, são:

- Fator de retenção (k): o pico deve estar bem separado de outros picos e do pico correspondente ao tempo de retenção de um composto não retido t_M , $k > 2$;
- Repetibilidade (DPR): $DPR < 1\%$ para $n > 5$; (USP ⁽³⁰⁾: $DPR \leq 2\%$, $n=5$)
- Resolução (Rs): $R_s > 2$ entre dois picos ou o de interesse e o interferente potencial mais próximo (impureza, produto de degradação);
- Fator de alargamento (TF): $TF \leq 2$;
- Número de pratos da coluna (N): em geral deve ser > 2000 para CLAE.

Tipicamente, no mínimo dois destes critérios são requeridos para garantir a conformidade do sistema ^(31, 91).

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Solventes

Solventes utilizados nos procedimentos de limpeza dos materiais: acetona comercial (Eflutec e/ou Nuclear) e hexano (Merck) com grau de pureza para análise. Solventes utilizados no estudo dos antimicrobianos: água ultrapura (Milli-Q) com resistividade controlada em 18,2 MΩcm, metanol e acetonitrila (Omnisolv e/ ou Mallinckodt) com grau de pureza para análise de resíduo.

3.1.2. Reagentes

Reagentes utilizados no estudo dos antimicrobianos: N,N-dimetilformamida (Merck) com grau de pureza para análise, trietilamina (Vetec) com grau de pureza para análise, ácido acético glacial (Vetec) com grau de pureza para análise, ácido oxálico (Merck) com grau de pureza para análise, oxalato de amônio (Merck) com grau de pureza para análise e fosfato de amônio dibásico (Synth) com grau de pureza para análise. Para a calibração do pHmetro foram utilizadas soluções tampão de pH 4,0 e pH 7,0 (Synth) grau reagente e/ou pH 6,86 e pH 4,01 preparados em laboratório.

3.1.3. Padrões

Padrões de tetraciclina: cloridrato de tetraciclina com teor em base anidra de 98,6%; procedência: China; lote nº: 260204; fabricação: 01/04/02; validade: 01/04/06, adquirido da Importadora Química Delawere Ltda, por intermédio da Faculdade de Farmácia da UFRGS e cloridrato de tetraciclina com teor em base anidra de 98,8%; procedência: China; lote nº: 20040828; fabricação: 08/04; validade: 08/08, adquirido da Pharma Nostra;

Padrão de trimetoprima com teor de 99,36%; lote 4CGS001; validade fev/09; matéria-prima obtida do Laboratório Farmacêutico do RGS;

Padrões de sulfametoxazol com teor de 100,5%; procedência: Índia; lote nº: SMX04010189; fabricação: 01/04; validade: 12/08, adquirido da Deg Importação de Produtos Químicos e sulfametoxazol com teor de 99,94%; lote Sulf 001; obtido do Laboratório de Produção de Padrões secundários – LAPPS.

Todos os padrões foram conservados em recipiente fechado, ao abrigo da luz, calor e umidade (dessecador).

3.1.4. Fases sólidas à base de sílicas

As fases sólidas a base de sílica quimicamente modificada, foram preparadas no Laboratório Ziegler-Natta do IQ/UFRGS. As principais características destes materiais, bem como da sílica comercial, estão relacionadas nas Tabela IV.

Tabela IV: Características físico-químicas das sílicas utilizadas no estudo de retenção dos antimicrobianos ⁽⁹⁹⁾.

| Sílica | Porcentagem de carbono | Diâmetro médio de partícula (μm) | Área superficial específica (m^2/g) | % Zr/SiO ₂ |
|-----------------------------------|------------------------|---|---|-----------------------|
| Sílica 110°C (SA) | 27,4 | 50 | 296 | 0,48 |
| Sílica 200°C (SB) | 20,4 | 50 | 292 | 0,37 |
| Sílica 450° C (SC) | 18,9 | 50 | 290 | 0,33 |
| C18 Waters Sep-Pak ® (SD) | 12 | 55 - 105 | ne | - |
| LC -18 TM Supelco (SD) | ~11,5 | 45 | 475 | - |

ne: não encontrado

3.1.5. Fases sólidas poliméricas

As fases sólidas poliméricas foram sintetizadas no Laboratório de Polímeros do IQ/UFRGS. As principais características destas fases, bem como da fase sólida comercial, são apresentadas na Tabela V.

Tabela V: Características físico-químicas dos polímeros utilizados no estudo de retenção dos antimicrobianos ⁽²⁹⁾.

| Polímero | Diâmetro médio de partícula (μm) | Área superficial específica (m^2/g) |
|---------------------------------------|---|---|
| EnviChrom ^{PTM} Supelco (PA) | 62 ± 8 | 900 |
| S-DVB (PB) | 17 ± 4,2 | 429,3 |
| DVB-GMA 50% (PC) | 12 ± 2 | - |
| S-DVB-GMA 25% (PD) | 14 ± 1,9 | 114,2 |

3.1.6. Outras fases sólidas

Durante o desenvolvimento do planejamento experimental, novas fases sólidas foram incorporados a este trabalho. As características destes novos materiais estão listadas na Tabela VI.

Tabela VI: Características físico-químicas das novas sílicas utilizadas no estudo de retenção dos antimicrobianos.

| Sílica | Porcentagem de carbono | Diâmetro médio de partícula | Área superficial específica (m ² /g) |
|---------------|------------------------|-----------------------------|---|
| Si + Ag (50%) | - | 10,3 nm | 54 |
| Si + Cu (50%) | - | 10,4 nm | 406 |
| SGO | 68% | 21 µm | - |
| SG10A | 19% | 30 µm | - |

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Preparação das soluções padrão estoque e de trabalho

As soluções padrão estoque de cloridrato de tetraciclina foram preparadas nas concentrações de 100 mg/l no solvente de diluição (Tabela VIII) e mantidas ao abrigo da luz.

As soluções padrão de trabalho de cloridrato de tetraciclina foram preparadas diariamente pela diluição sucessiva da solução padrão estoque no solvente de diluição e mantidas ao abrigo da luz.

As soluções padrão de cloridrato de tetraciclina usadas no estudo de adsorção/dessorção foram preparadas diariamente nas concentrações de 10 µg/l em água ultrapura Milli-Q e mantidas ao abrigo da luz.

As soluções padrão estoque de sulfametoxazol e trimetoprima foram preparadas nas concentrações de 100 mg/l em metanol e mantidas ao abrigo da luz.

As soluções padrão de trabalho de sulfametoxazol e trimetoprima foram preparadas diariamente pela diluição sucessiva da solução padrão estoque na fase móvel (Tabela IX) e mantidas ao abrigo da luz.

As soluções padrão de sulfametoxazol e trimetoprima usadas no estudo de adsorção/dessorção foram preparadas diariamente nas concentrações de 10 µg/l em água ultrapura Milli-Q, com uma solubilização inicial em metanol (máximo 1 ml) e mantidas ao abrigo da luz.

3.2.2. Fases móveis para as análises dos antimicrobianos por cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV (CLAE/UV)

A Tabela VII apresenta a composição das fases móveis avaliadas para a quantificação dos antimicrobianos por CLAE-UV. Antes das análises cromatográficas, as fases móveis foram filtradas com membrana de nylon 0,45 µm (Millipore) e degaseificada com gás Hélio (99,995%).

Tabela VII: Composição das fases móveis na quantificação por CLAE de TC, SMX e TM.

| | Composição da Fase Móvel | Analitos |
|---------|---|---------------------------|
| FM nº 1 | 550 ml de ácido oxálico 0,01 mol/l, 300 ml de acetonitrila e 150 ml de metanol ⁽²⁷⁾ | Tetraciclina |
| FM nº 2 | 680 ml de oxalato de amônio 0,1 mol/l, 270 mL de N,N-dimetilformamida e 50 ml de fosfato de amônio dibásico 0,2 mol/l (pH: entre 7,6 a 7,7) ⁽³⁰⁾ | Tetraciclina |
| FM nº 3 | 799 ml água, 200 ml de acetonitrila e 1 ml de trietilamina (pH: 5,9 ± 0,1 corrigido com ácido acético) ⁽³⁰⁾ | TC, SMX e TM; SMX e TM |

FM – Fase Móvel

3.2.3. Determinação simultânea da tetraciclina, sulfametoxazol e trimetoprima por CLAE/UV

A avaliação foi realizada a partir de três estudos em diferentes preparações de soluções.

No primeiro estudo, foram preparadas soluções aquosas individuais, na concentração de 100 mg/l, para cada um dos padrões de TC, SMX e TM (para a solubilização inicial de SMX e TM utilizou-se cerca de 1 ml de metanol). A partir dessas soluções preparou-se uma solução aquosa única contendo esses três antimicrobianos a 100 µg/l.

No segundo estudo, SMX e TM foram preparados juntos, na concentração de 100 mg/l em metanol e depois diluídos a 10 mg/l na fase móvel.

E no terceiro estudo, foram preparadas soluções individuais em metanol, na concentração de 100 mg/l, para cada um dos padrões de TC, SMX e TM. A partir destas três soluções padrões individuais em metanol, fizeram-se três formas de diluição: a primeira foi a diluição respectiva de cada uma das soluções na fase móvel, obtendo-se três soluções individuais de 10 mg/l para cada um dos antimicrobianos, a segunda foi a diluição a uma única solução na fase móvel obtendo-se 10 mg/l contendo os três antimicrobianos e a terceira, uma solução única de SMX e TM a 10 mg/l na fase móvel.

3.2.4. Estabilidade das soluções aquosas de tetraciclina, sulfametoxazol e trimetoprima

Avaliou-se a estabilidade das soluções aquosas (água ultrapura) de TC, SMX e TM de um dia a uma semana após o preparo, verificando-se o pH e as áreas dos picos cromatográficos.

3.2.5. Avaliação do perfil cromatográfico dos métodos de quantificação dos antimicrobianos

De acordo com a literatura ⁽⁹¹⁾, pelo menos dois dos critérios de avaliação devem ser considerados para demonstrar que o sistema foi capaz de fornecer dados aceitáveis. Para o método de quantificação da TC avaliou-se precisão das áreas e fator cauda. Para o método de quantificação de SMX e TM avaliou-se precisão das áreas e resolução.

3.2.6. Avaliação do parâmetro de desempenho do método de quantificação dos antimicrobianos: seletividade, limite de detecção instrumental, limite de quantificação instrumental, curva analítica (linearidade) e intervalo

A seletividade foi avaliada pelas análises das soluções do branco dos eluentes (Tabelas VIII e IX) no estudo de adsorção/dessorção das fases sólidas.

Como critério de aceitação da seletividade determinou-se que os cromatogramas obtidos das soluções branco dos eluentes das fases poliméricas e sílicas (Tabelas IV, V e VI), não deveriam apresentar picos na região da TC, SMX e TM.

O limite de detecção instrumental (LDI) foi determinado pelo método visual através de análises cromatográficas de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes

preparadas a partir da solução padrão estoque de cloridrato de tetraciclina no solvente de diluição e da solução estoque de sulfametoxazol e trimetoprima na fase móvel, dos respectivos métodos, até o menor nível detectado. Durante o preparo e análise das soluções, teve-se o cuidado de manter as soluções ao abrigo da luz, em um período máximo de um dia.

O limite de quantificação instrumental (LQI) foi calculado multiplicando o LD por 3,33. (LQ = 10 vezes a relação sinal/ruído).

As curvas analíticas (linearidade) foram determinadas com um mínimo de cinco pontos, com coeficiente de variação inferior a 2% ⁽³⁰⁾ para injeções replicadas a cada nível de concentração, utilizando a padronização externa. A partir da solução padrão estoque de cloridrato de tetraciclina, foram preparadas soluções diluídas sucessivas no solvente de diluição. Procedimento semelhante foi seguido para preparar as soluções de sulfametoxazol e trimetoprima. As curvas foram determinadas a cada estudo de adsorção/dessorção e foram expressas pelas equações das retas e coeficientes de correlação (r). Para avaliar a qualidade dessas curvas verificou-se a estimativa da incerteza devido à função calibração, com os testes de linearidade, teste de validade de regressão e teste da eficiência da regressão ⁽⁸⁹⁾. Os resultados dos testes foram tratados por métodos estatísticos apropriados utilizando software Microsoft Excel[®].

Como critério de aceitação da curva analítica (linearidade), o valor mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser igual a 0,99 ⁽³²⁾. Para verificar se a equação de regressão é estatisticamente significativa, no teste para verificação de ajuste do modelo linear e na validade da regressão ⁽⁸⁹⁾ não devem ser evidenciadas diferenças estatisticamente significativas, quando avaliado por análise de variância (ANOVA), ou seja, F calculado deve ser menor que o F tabelado, num intervalo de 95% de confiança.

O intervalo da curva analítica foi derivado do estudo de linearidade. Foi estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequadas quando aplicados às amostras contendo quantidades de substância dentro do intervalo especificado.

3.2.7. Estudo de adsorção/dessorção das fases sólidas frente à tetraciclina, sulfametoxazol e trimetoprima

Para realizar os estudos de adsorção, as fases sólidas foram empacotadas em colunas tipo seringas de plástico, ficando retidas entre duas membranas filtrantes (*frit*) de

polietileno. A quantidade de adsorvente usado nestes cartuchos foi de aproximadamente 150 mg. Foram montadas colunas de extração para análise das amostras e dos brancos. As etapas seguintes após a preparação dos cartuchos, foram realizadas com auxílio de trompa de vácuo. Para isso, a coluna de extração foi montada num sistema de vácuo (Figura 8) que proporcionava a passagem e coleta dos solventes de condicionamento, da solução padrão e dos solventes de eluição. Na etapa de condicionamento, foram utilizados 5,0 ml de metanol seguidos de 25 ml de água. Nesta etapa teve-se o cuidado de manter molhada a fase sólida, deixando um mínimo de água acima do nível do sólido.

A retenção dos analitos foi realizada mediante a percolação de 100,0 mL das respectivas soluções padrões aquosas na concentração de 10 µg/l. A percolação da solução contendo os analitos foi realizada utilizando-se um adaptador de transferência (Figura 8), que através do vácuo, drenou toda a solução aquosa do fármaco contida no reservatório. Apesar da velocidade de aplicação da solução ser crítica nesta etapa, idealmente com um fluxo inferior a 2 ml/min.⁽⁸⁷⁾ ou cerca de 5 a 8 ml/min.⁽⁸⁸⁾, procurou-se usar um fluxo lento; alternativamente utilizou-se o auxílio da gravidade, quando a amostra foi dividida em pequenos volumes e introduzidos no reservatório com auxílio de uma pipeta. A velocidade de percolação da amostra tem que ser ajustada para haver um equilíbrio entre o tempo necessário para que toda a amostra passe através da fase sólida e o tempo necessário para que se estabeleça contato com o analito. Pela passagem da solução aquosa pelas fases sólidas, obtêm-se os eluatos. A fase sólida contendo o analito foi submetida ao vácuo para completa retirada da água. A etapa de lavagem do cartucho e da fase sólida não foi efetuada, pois a amostra, neste caso padrões dos antimicrobianos, estava livre de interferentes. Na etapa de eluição foi avaliada a capacidade de dessorção dos fármacos nas diferentes fases sólidas utilizando-se os solventes e/ou misturas de solventes (eluentes) relacionados nas Tabelas VIII e IX. Estes extratos são denominados de “eluídos”. Para cada fase sólida foi realizada a análise do branco utilizando somente a etapa do condicionamento e a etapa de adição dos solventes de eluição. As análises dos brancos foram realizadas antes da análise da amostra. As amostras denominadas de brancos, eluatos e eluídos foram analisadas por CLAE/UV.

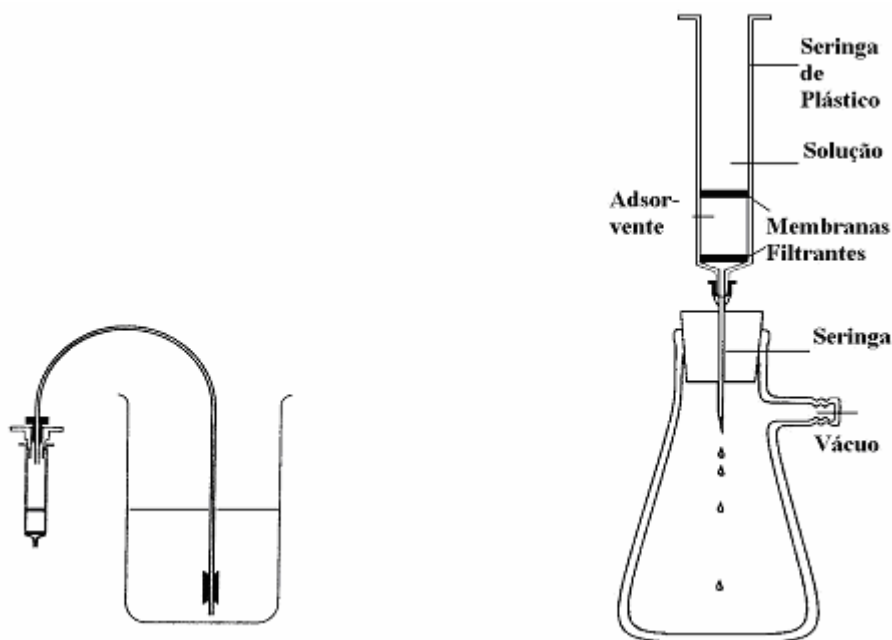
Várias composições de solventes e/ou mistura de solventes foram utilizados na etapa de eluição. Para determinar estes eluentes foram considerados dados da literatura. As Tabelas VIII e IX apresentam a composição destes eluentes, para TC, SMX e TM, respectivamente.

Tabela VIII: Composição dos eluentes utilizados nos estudos de adsorção/dessorção da TC.

| | |
|-----------|---|
| Eluente A | Metanol 100% |
| Eluente B | Acetonitrila 100% |
| Eluente C | Solvente de Diluição (680 ml de oxalato de amônio 0,1 mol/l e 270 ml de N,N-dimetilformamida) |
| Eluente D | Metanol: Solvente de Diluição 50:50 |
| Eluente E | Acetonitrila: Solvente de Diluição 50:50 |

Tabela IX: Composição dos eluentes utilizados para os estudos de adsorção/dessorção de SMX e TM.

| | |
|-----------|--|
| Eluente A | Metanol 100% |
| Eluente F | Metanol: Água (50:50) |
| Eluente B | Acetonitrila 100% |
| Eluente G | Acetonitrila: Água (50:50) |
| Eluente H | Fase móvel [Água: Acetonitrila: Trietilamina (79,9: 20,0: 0, 1)] |



(A) Adaptador de transferência.

(B) Coluna de extração.

Figura 8: Adaptador de transferência (A) e coluna de extração montada num sistema a vácuo (B).

3.2.8. Planejamento experimental

O planejamento experimental do estudo de adsorção/dessorção baseou-se na construção de uma planilha na qual foram cruzadas as variáveis de fármacos, eluentes e fases sólidas. A análise dos dados, em replicata, obtidos em percentagem de recuperação das diversas composições de fármaco/fase sólida/eluente foram tratados estatisticamente pelo coeficiente de variação. A medida de recuperação foi avaliada pela razão entre a quantidade extraída e a quantidade percolada expressa em percentagem.

A Tabela X mostra o planejamento experimental para o estudo de adsorção/dessorção das fases sólidas frente aos antimicrobianos utilizando diferentes eluentes.

Tabela X: Planejamento experimental para o estudo de adsorção/dessorção.

| Fármacos | | SÍLICAS | | | | POLÍMEROS | | | |
|------------------|---------|---------|--------|--------|--------|-----------|--------|--------|--------|
| | ELUENTE | SA | SB | SC | SD | PA | PB | PC | PD |
| TC | EA | TCEASA | TCEASB | TCEASC | TCEASD | TCEAPA | TCEAPB | TCEAPC | TCEAPD |
| | EB | TCEBSA | TCEBSB | TCEBSC | TCEBSD | TCEBPA | TCEBPB | TCEBPC | TCEBPD |
| | EC | TCECSA | TCECSB | TCECSC | TCECSD | TCECPA | TCECPB | TCECPC | TCECPD |
| | ED | TCEDSA | TCEDSB | TCEDSC | TCEDSD | TCEDPA | TCEDPB | TCEDPC | TCEDPD |
| | EE | TCEESA | TCEESB | TCEESC | TCEESD | TCEEPA | TCEEPB | TCEEPC | TCEEPD |
| SMX + TM = ST | EA | STEASA | STEASB | STEASC | STEASD | STEAPA | STEAPB | STEAPC | STEAPD |
| | EF | STEFSA | STEFBS | STEFSC | STEFSD | STEFPA | STEFPB | STEFPC | STEFPD |
| | EB | STEBSA | STEBBS | STEBSC | STEBSD | STEBPA | STEBPB | STEBPC | STEBPD |
| | EG | STEGSA | STEGBS | STEGSC | STEGSD | STEGPA | STEGPB | STEGPC | STEGPD |
| | EH | STEHSB | STEHSB | STEHSC | STEHSD | STEHPA | STEHPB | STEHPC | STEHPD |

E: eluente; A: MeOH 100%; B: ACN 100%; C: Solvente de diluição; D: MeOH:Solvente de diluição; E: ACN: Solvente de diluição; F: MeOH 50%; G: ACN 50%; H: FM (água: ACN: TEA); SA: sílica 110; SB: sílica 200; SC: sílica 450; SD: sílica comercial; PA: polímero comercial; PB: S-DVB; PC: DVB-GMA 50%; PD: S-DVB-GMA 25%

3.2.9. Determinação do volume de quebra

No desenvolvimento da metodologia de adsorção/dessorção é importante que se inicie o estudo com soluções aquosas de água ultrapura, pois estas têm baixa força iônica e estão livres de partículas coloidais. Uma amostra real contém várias substâncias que podem afetar em maior ou menor grau a recuperação obtida nas extrações. A presença de ácidos húmicos e fúlvicos na amostra diminui a recuperação dos analitos uma vez que estas substâncias se apresentam em estado coloidal e funcionam como concorrentes dos sítios ativos das fases estacionárias. Os analitos são adsorvidos por essas partículas e ligam-se por ligações covalentes, ligações de hidrogênio, ou por interações de Van der Waals. Como

estas partículas apresentam poros, com área superficial grande, pode aumentar ainda mais a competição com a fase sólida ⁽⁹²⁾.

Para adequar o delineamento da amostragem e isolar quantitativamente os analitos em estudo, o volume de quebra foi determinado para cada analito. Os adsorventes e os solventes de eluição utilizados neste estudo foram aqueles que apresentaram os melhores resultados na metodologia de análise da TC e na metodologia de análise da SMX e TM realizado no item 3.2.7. O volume de quebra foi determinado com soluções aquosas de água ultrapura, água potável e água do arroio Dilúvio fortificadas com os antimicrobianos de acordo com a Tabela XI.

Usando o mesmo procedimento de montagem da coluna e condicionamento (item 3.2.7) as soluções aquosas de concentração conhecida dos analitos foram percolados pelas colunas contendo as fases sólidas. As soluções utilizadas para este experimento estão listadas na Tabela XI. Para a determinação do volume de quebra, a massa do analito foi mantida constante (0,25 µg para TC e 0,2 µg para SMX e TM). Os analitos foram eluídos com 5,0 ml dos eluentes que tiveram maior percentagem de recuperação.

Tabela XI: Soluções utilizadas para a determinação do volume de quebra.

| Volume (ml) | TC – Concentração (µg/l) | SMX e TM – Concentração (µg/l) |
|-------------|--------------------------|--------------------------------|
| 25 | 10 | 8 |
| 50 | 5 | 4 |
| 100 | 2,5 | 2 |
| 200 | 1,25 | 1 |

3.3. EQUIPAMENTOS

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo a líquido Shimadzu LC-10A, equipado com detector de UV-Vis SPD-10A.

Para o estudo da TC utilizou-se uma coluna cromatográfica Shimadzu Shim-pack CLC-C8 (M), de partícula de 5 µm (150 mm x 4,6 mm DI) *endcapped* e pré-coluna Shimadzu GC8, de partícula 10 µm (3 cm x 4,6 mm DI) *endcapped*. O comprimento de onda para análise da TC foi de 280 nm. A taxa de fluxo foi de 1 ml/min, no modo

isocrático, e os volumes injetados foram de 20 µl. As análises sempre foram iniciadas após um tempo de estabilização do equipamento numa pressão que variou em torno de 200 kgf/cm².

Para o estudo da avaliação simultânea da TC, SM e TM, inicialmente, o trabalho foi executado com uma coluna cromatográfica Varian, de partícula de 5 µm (250 mm x 4,6 mm DI) não *endcapped* e pré-coluna Varian de partícula 10 µm (3 cm x 4,6 mm DI) não *endcapped*. Posteriormente, o trabalho foi realizado numa coluna cromatográfica Shimadzu Shim-pack CLCods (M), de partícula de 5 µm (150 mm x 4,6 mm DI) *endcapped* e pré-coluna Shimadzu GODS, de partícula 10 µm (3 cm x 4,6 mm DI) *endcapped*. O comprimento de onda para análise dos padrões foi de 254 nm. A taxa de fluxo foi de 1 ml/min, no modo isocrático, e os volumes injetados foram de 20 µl.

Para o estudo da SMX e TM utilizou-se a mesma coluna cromatográfica Shimadzu Shim-pack CLCods (M) e pré-coluna Shimadzu GODS, no mesmo comprimento de onda de 254 nm, no fluxo de 1 ml/min, no modo isocrático, com volume de injeção de 20 µl. As análises sempre foram iniciadas após um tempo de estabilização do equipamento numa pressão que variou em torno de 110 kgf/cm².

As medidas foram realizadas a temperatura ambiente.

As medidas de pH foram realizadas em um pHmetro Digimed, modelo DM-20 com termocompensador Digimed, modelo DMF-N1.

3.4. LIMPEZA DOS MATERIAIS DE LABORATÓRIO

Na análise em nível de traços a limpeza dos materiais é fundamental, pois como a quantidade de analitos é muito pequena, qualquer contaminação pode influenciar ou até mesmo mascarar a análise a ser realizada.

Toda a vidraria e materiais comuns de laboratório foram lavados com detergente neutro diluído e enxaguados com água em abundância. Posteriormente, foram enxaguadas com água deionizada e/ou destilada e por último foi feito um enxágüe com acetona comercial. A vidraria não volumétrica foi levada ao forno, a 300°C, por duas horas e após, embaladas com papel alumínio, para evitar possíveis contaminações. Para o material volumétrico, após o enxágüe com acetona comercial e evaporação da mesma à temperatura ambiente,

foi feito um enxágüe com hexano grau de pureza para análise. Depois da evaporação do hexano, o material foi embalado ⁽¹⁶⁾.

3.5. ÁREAS DE ESTUDO – ÁGUA POTÁVEL E ÁGUA DO ARROIO DILÚVIO

3.5.1. Água potável

A água potável foi coletada da torneira do Laboratório de Química Analítica e Ambiental (LQAA) do IQ/UFRGS.

Como procedimento de coleta, a torneira foi aberta e a água ficou correndo por meia hora para limpeza das tubulações e descarga de água parada. A amostra foi coletada em um copo Becker de 1 l, limpo conforme o procedimento de limpeza de vidraria utilizado no laboratório. A amostra de água não foi filtrada e foi analisada no mesmo dia da coleta.

3.5.2. Descrição do arroio Dilúvio da região de Porto Alegre (RGS) Brasil

De acordo com o Morandi [94], “O arroio Dilúvio percorre uma extensão de 17.605 m das nascentes até a foz, escoando suas águas no sentido leste-oeste. É o escoadouro natural das águas pluviais de uma sub-bacia de 83,74 Km² e receptor das águas servidas geradas por parte dos 446 mil habitantes que ocupam sua área de drenagem. Além disso, recebem anualmente cerca de 50.000 m³ de detritos, com conseqüente assoreamento de sua calha, diminuindo com isso as suas condições de vazão. A sub-bacia do dilúvio, a mais importante de Porto Alegre, possui o percentual mais significativo de redes coletoras de esgotamento sanitário em relação as demais sub-bacias da cidade”. “A implantação e/ou ampliação de sistema de esgotamento sanitário nesta região não conseguiu reverta o quadro da poluição em que se encontram as águas do arroio”. Dados obtidos de 1996, da revista ECOS mostram lançamento de esgotos hospitalares na micro-bacia de Dilúvio, calculado a partir de vinte hospitais, de 85.578.400 l/mês ⁽⁹⁵⁾.

O nome do arroio refere-se às freqüentes inundações que provocava, alagando as baixadas dos bairros Santana, Azenha e Cidade Baixa ⁽⁹⁴⁾.

De acordo com Morandi [94], “As nascentes se localizam onde hoje é o parque Saint Hilaire, na lomba do sabão. Deste ponto até a avenida Azenha o traçado do arroio não foi modificado, tendo sido feitos apenas trabalhos de canalização e regularização das margens. No final da década de 30 foram projetadas e iniciadas as obras de canalização do arroio

Dilúvio, ligando suas águas desde a avenida João Pessoa até o Guaíba. A extensão canalizada e retificada do arroio Dilúvio está estimada em 12 Km, dos quais 10 Km, compreendidos entre a avenida Antônio de Carvalho e o Guaíba, tem calha central localizada entre as duas pistas da avenida Ipiranga”.

3.5.3. Seleção dos pontos de amostragem

O programa de monitoramento das águas do arroio Dilúvio do DMAE, estabelecido em função das obras de esgotamento sanitário para esta sub-bacia, estabeleceu locais de amostragem que levou em conta a área de abrangência dos investimentos e os principais pontos de lançamentos de cargas. Assim, foram definidas oito estações de amostragem, localizadas ao longo do curso do arroio.

A localização das estações de amostragem está descrita e pode ser visualizada na Figura 9.

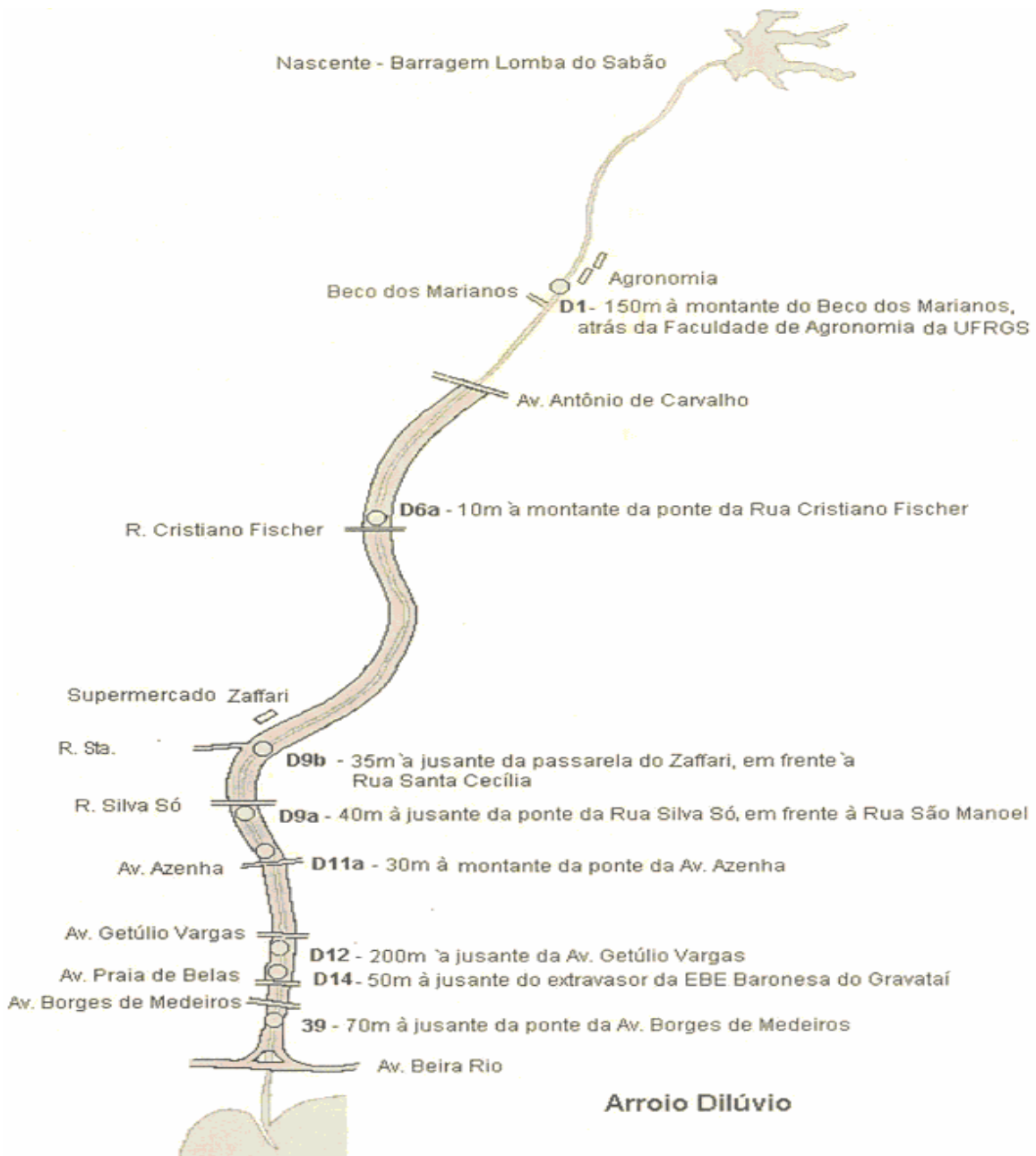


Figura 9: O arroio Dilúvio e suas oito estações de amostragem.

Foram coletadas amostras no dia 28 de agosto de 2007 nas estações D1, a montante do Beco dos Marianos e D11a, à jusante da ponte da avenida Azenha (diferente da figura). A estação D1 foi escolhida porque recebe menos lançamentos de efluentes, ao contrário da estação D11a. A temperatura da água estava em 12°C, medida no local.

3.5.4. Coleta, técnica de amostragem, preservação e preparação das amostras de água do arroio.

Seguindo as informações de artigos que registraram os cuidados especiais de coleta e transporte das amostras ambientais até análise, as amostras foram coletadas em frasco de vidro âmbar limpo ^(2, 3, 62, 64, 65, 67 - 69, 72) conforme procedimento de limpeza do laboratório. As amostras engarrafadas foram transportadas em gelo ao laboratório imediatamente após a coleta ^(64, 3). Para remover material suspenso, a amostra da estação D11a foi filtrada a vácuo através de filtro de papel cuja gramatura era de 80 g/m² seguido por filtro de membrana de 0,45 µm ⁽⁶⁷⁾. A amostra da estação D1 foi filtrada duas vezes com filtro de membrana de 0,45 µm. A filtração das amostras foi feita logo após a chegada no laboratório. Após a filtração, as amostras foram mantidas a 4°C ^(2, 3, 60, 62, 63, 65, 67, 68) em frasco de vidro âmbar totalmente preenchido, em posição vertical, até a extração que foi realizada num período máximo de 2 dias, que é o 3º dia depois da coleta, para minimizar degradação microbiana ^(3, 11, 60, 62, 63).

A amostra da estação D1 foi fortificada com os antimicrobianos para obter o nível de concentração final e então foi extraída de acordo com o método de EFS. A amostra D11a não foi fortificada, mas foi extraída de acordo com o método de EFS.

3.6. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE DESEMPENHO NA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA NA MATRIZ DE ÁGUA DO ARROIO DILÚVIO E NA ÁGUA POTÁVEL: CURVAS ANALÍTICAS (LINEARIDADE), INTERVALO, LIMITE DE DETECÇÃO DO MÉTODO, LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO DO MÉTODO, PRECISÃO E EXATIDÃO PARA DETERMINAÇÃO DE TC, SMX E TM

As curvas analíticas (linearidade) e intervalos foram determinados de acordo com o item 3.2.6. O limite de detecção do método (LDM) foi determinado através das análises das matrizes contendo os analitos. O procedimento de determinação foi aplicado na água ultrapura, na água potável e na água do arroio, pois o limite de detecção do método pode variar em função do tipo da amostra e da complexidade da matriz. A estimativa do limite de detecção do método foi feita com base na relação sinal-ruído (3 vezes o ruído da linha de base) ^(81, 84). O limite de quantificação do método (LQM) foi determinado como sendo a concentração que produziu uma relação sinal-ruído de 10 vezes ⁽⁸¹⁾.

A repetibilidade do método de extração em fase sólida foi verificada pela determinação de três amostras na concentração do volume de quebra das soluções aquosas de água potável e da água do arroio e percoladas em três cartuchos de acordo com as etapas do procedimento da pré-concentração/extração. O eluente selecionado foi o que obteve os melhores percentuais de recuperação na fase sólida utilizada nas respectivas metodologias de quantificação da TC e da metodologia de SMX e TM. Cada um dos três eluídos foi injetado três vezes ou o suficiente para obter um coeficiente de variação máximo de 30%⁽⁸⁵⁾, realizando-se a média aritmética desses valores.

A precisão intermediária e a reprodutibilidade neste estudo não foram avaliadas.

A exatidão do método foi inferida após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear, da precisão e da especificidade do mesmo.

3.7. QUANTIFICAÇÃO DOS ANTIMICROBIANOS NAS AMOSTRAS DE ÁGUA DO ARROIO DILÚVIO

A quantificação de TC, SMX e TM foi avaliada nas metodologias em estudo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE TETRACICLINA, SULFAMETOXAZOL E TRIMETOPRIMA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR DE UV (CLAE/UV)

De acordo com o primeiro estudo, as análises das soluções aquosas individuais a 100 mg/l de TC, SMX e TM, nas condições cromatográficas utilizadas (itens 3.2.2 e 3.3), apresentaram, respectivamente, tempo de retenção (Tr) de 9,2; 13,6 e 11,4 minutos. Exceto a TM que mostrou pouca cauda, os demais antimicrobianos mostraram cauda acentuada posterior nos picos cromatográficos, evidenciando interação com a coluna analítica, efeito de retenção, interações residuais ou coluna inadequada ⁽⁹⁰⁾. A análise da solução aquosa mista dos três antibióticos na concentração de 100 µg/l mostrou apenas dois picos: um em 11,6 minutos e outro em 13,6 minutos.

No segundo estudo, a análise cromatográfica da solução mista de SMX e TM a 10 mg/l na fase móvel mostrou um cromatograma com picos nos tempos de retenção de 11 e 13,9 minutos, sendo que o pico com Tr de 13,9 minutos não mostrou resolução e apresentou cauda posterior.

O primeiro e o segundo estudo foram realizados em uma coluna cromatográfica e pré-coluna Varian, C18 não *endcapped*.

No último trabalho, as análises cromatográficas mostraram que nas soluções da TC, tanto em metanol quanto na fase móvel, os picos estavam com cauda posterior e os tempos de retenção foram de 4,8 em metanol e 5,6 minutos, na fase móvel. Os picos das soluções em metanol e da fase móvel da TM foram mais resolvidos com Tr de 4,7 minutos. Para SMX, o pico da fase móvel foi mais resolvido, com Tr de 8,9 minutos, do que em metanol, no qual houve desdobramento com Trs 8,7 e 8,9 minutos evidenciando co-eluição de componentes ⁽⁹⁰⁾. A análise da solução a 10 mg/l contendo os três antibióticos diluídos na fase móvel apresentou apenas dois picos com tempos de retenção de 4,7 e 8,9 minutos. Por fim, a análise da solução mista de SMX e TM a 10 mg/l na fase móvel apresentou picos com Tr de 4,8 e 9,1 minutos respectivamente. Este trabalho foi executado em uma coluna cromatográfica e pré-coluna da Shimadzu C18 *endcapped*.

Conclui-se que a determinação simultânea da TC, SMX e TM em soluções tanto em metanol quanto na fase móvel utilizando a coluna analítica C18 *endcapped* não é possível, visto que a TC mostra pico com cauda posterior em ambas as soluções e seu tempo de retenção é semelhante ao da TM. No entanto, a determinação simultânea de SMX e TM é possível utilizando a coluna analítica C18 *endcapped* e como solvente de diluição a fase móvel, já que em metanol o pico da SMX se desdobra. A análise da SMX mostrou-se inadequada em coluna analítica não *endcapped*, tanto em soluções aquosas quanto em soluções diluídas na fase móvel.

4.2. SELEÇÃO DA FASE MÓVEL PARA A QUANTIFICAÇÃO DE TETRACICLINA

A composição da fase móvel considerada a mais adequada para o desempenho cromatográfico desejado foi a preparada pela mistura de 680 ml de oxalato de amônio 0,1 mol/l, 270 ml de N, N-dimetilformamida e 50 ml de fosfato de amônio dibásico 0,2 mol/l. O pH para fase móvel ficou em torno de 7,6 a 7,7.

A TC forma complexos com resíduos de íons metálicos que possam estar presentes, advindos do processo de síntese das fases estacionárias de colunas de fase reversa. As funções ácidas da TC (β -dicetonas dos C10 – C12 e carboxiamida do C2) são capazes de formar complexos insolúveis, em pH neutro, de sais através de pontes de hidrogênio intramolecular com os íons metálicos ^(6, 22, 42). Assim, o oxalato é adicionado à fase móvel para prevenir a formação de complexos quelantes da TC com os íons metálicos ⁽⁶⁾.

A Figura 10 mostra a formação de complexos quelantes da TC com resíduos de íons metálicos.

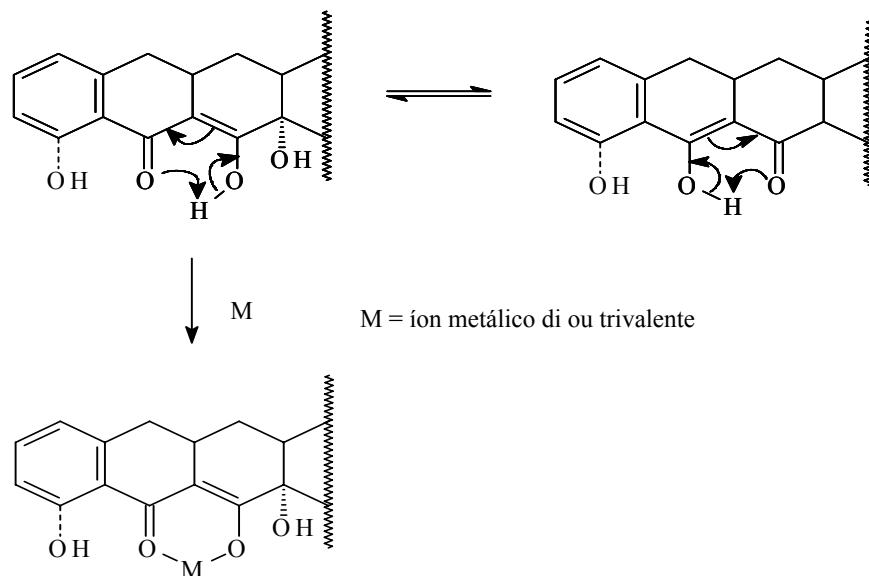


Figura 10: Quelação de metais com a TC ⁽²²⁾.

A TC liga-se a grupos silanóis residuais da fase estacionária de colunas analíticas de fase reversa a base de sílica. Assim, nos cromatogramas das TC estão sujeitos a aparecer picos com caudas. As adições de ácido fosfórico e ácido oxálico melhoram os resultados na separação da TC. Entretanto, a TC ainda mostra cauda em colunas de fase reversa mesmo utilizando esse ácido na fase móvel sem a adição de oxalato ⁽⁶⁾.

Determinações de TC por CLAE isocrática foram registradas usando composição de fase móvel contendo ácido oxálico em coluna de sílica gel modificada. A resolução e assimetria dos picos de TC dependem do pH da solução aquosa de ácido oxálico na fase móvel, sendo 2,0 o pH ótimo. Com o aumento da concentração de ácido oxálico, a resolução e assimetria foram melhores, resultados estes sendo obtidos com 0,01 e 0,2 mol/l para a TC e os produtos de degradação de TC, respectivamente. A coluna de sílica gel modificada C8 foi útil para análise da TC e a coluna de sílica gel modificada C18 para as impurezas da TC ⁽⁶⁾.

A composição da fase móvel mantida em pH 7,6 a 7,7, utilizando tampão de oxalato de amônio e fosfato de amônio dibásico, conserva a forma dipolar da TC além de não permitir epimerização do grupamento dimetilamino ligado ao carbono C4. Além disso, usando uma coluna cromatográfica e pré-coluna protegida não há interações de grupos silanóis com a TC.

Em termos de limite de detecção (LD) instrumental, o valor obtido foi de 2,5 µg/l para esta composição de fase móvel. O LD da primeira fase móvel, composta pela mistura de

550 ml de ácido oxálico 0,01 mol/l, 300 ml de acetonitrila e 150 ml de metanol foi maior do que 10 µg/l. Em estudo anterior o LD instrumental da primeira fase móvel foi 15 µg/l utilizando uma coluna C18 ⁽²⁷⁾.

4.3. ESTABILIDADE DA SOLUÇÃO AQUOSA DE TETRACICLINA

A estabilidade da solução aquosa de tetraciclina foi avaliada, inicialmente, em um período de ± 24 h, durante o estudo de adsorção/dessorção da TC nas fases sólidas a base de sílica. Utilizou-se 100 ml de solução aquosa a 1 mg/l e 5,0 ml de solvente de diluição. As soluções dos eluídos no solvente de diluição mostraram picos significativos de degradação, identificados pelo tempo de retenção distintos do tempo característico da TC. Em outro estudo, a mesma solução aquosa de TC, decorrida uma semana, durante o estudo de adsorção/dessorção da TC nas fases poliméricas, mostrou a degradação, mas menos pronunciada nos eluídos do solvente de diluição. Deste estudo infere-se apenas que os polímeros podem ser mais seletivos à TC do que aos seus produtos de degradação.

A Figura 11 mostra os cromatogramas dos produtos de degradação da TC nos eluídos.

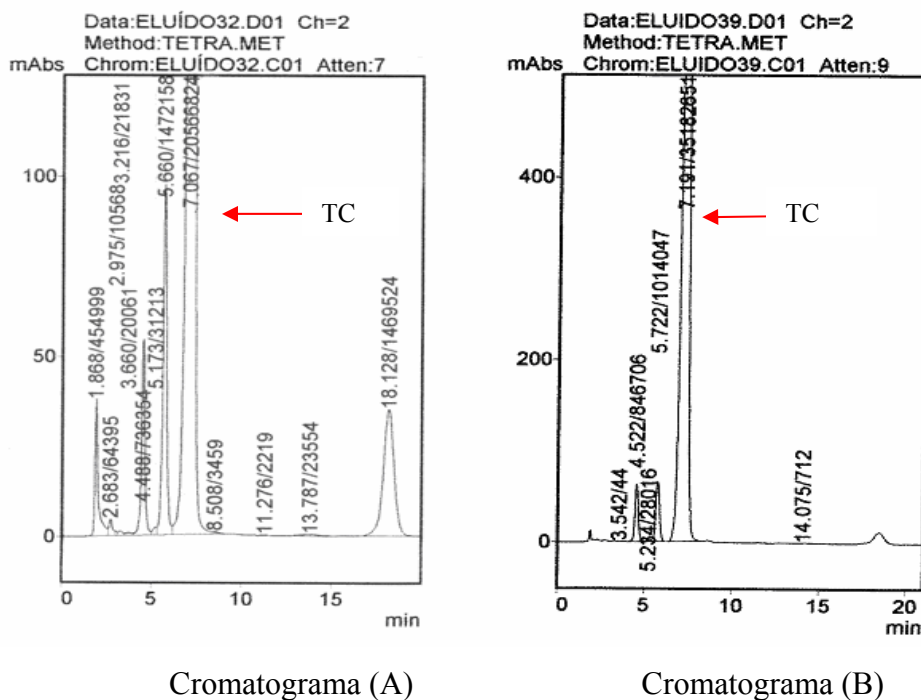


Figura 11: Cromatogramas de produto de degradação de TC nos eluídos do solvente de diluição na sílica 110°C (A) e no polímero SDVB (B).

Posteriormente, em um estudo realizado durante quatro dias avaliou-se o pH e as áreas cromatográficas das soluções aquosas de TC nas concentrações de 1 mg/l e 10 µg/l. Estas soluções foram preparadas diariamente de forma que as primeiras soluções de 1 mg/l e 10 µg/l representaram as soluções mais antigas. O pH também foi medido diariamente e no quarto dia avaliou-se o pH das soluções anteriormente preparadas. A análise cromatográfica foi feita no quarto dia. As soluções foram mantidas sob refrigeração em frasco plástico. Os resultados são mostrados na Tabela XII.

Tabela XII: Avaliação da estabilidade da solução aquosa de tetraciclina.

| | 1º dia | 2º dia | 3º dia | 4º dia |
|--------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Solução aquosa de TC a 10 µg/l | pH = 6,3 Área = 3442 | pH = 6,3 Área = 641 | pH = 6,4 Área = 505 | pH = 6,4 Área = 272 |
| Solução aquosa de TC a 1 mg/l | pH = 6,6 Área = 40021 | pH = 7,2 Área = 37651 | pH = 7,4 Área = 40745 | pH = 7,4 Área = 39530 |

De acordo com a Tabela XII, as soluções aquosas de TC a 10 µg/l são mais instáveis do que as soluções aquosa de TC a 1 mg/l. No entanto, pode-se considerar que o pH manteve-se constante para ambas as soluções e que as variações nas leituras de pH são inerentes ao equipamento e/ou as soluções tampão de calibração do mesmo. Da mesma forma pode-se considerar constantes as áreas das soluções aquosas de TC a 1 mg/l, pois as variações nas leituras apresentaram um coeficiente de variação de 3,3%. O pH da solução aquosa de TC a 100 mg/l também foi avaliado, variando de 3,90 a 3,87 do primeiro ao terceiro dia de estudo.

4.4. AVALIAÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE TETRACICLINA

O método foi avaliado levando-se em conta a precisão das áreas e do fator cauda de cinco injeções de uma solução padrão de 100 µg/l. A alta repetibilidade nas áreas foi obtida com um coeficiente de variação de 1,9%⁽³⁰⁾ e um fator cauda de 1,2⁽⁸⁶⁾.

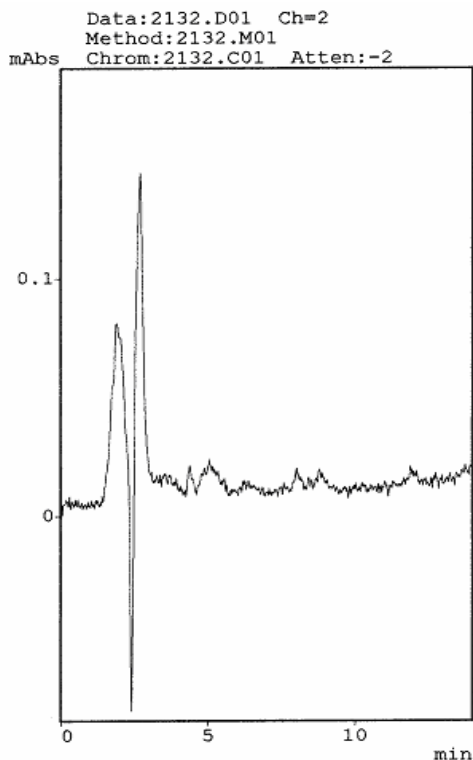
4.5. PARÂMETROS DE DESEMPENHO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE TETRACICLINA

4.5.1. Seletividade

A seletividade foi confirmada pelas análises dos cromatogramas das soluções branco de metanol 100%, branco de acetonitrila 100% e branco do solvente de diluição (Tabela VIII) nas fases poliméricas e nas sílicas (Tabelas IV, V e VI). Nas análises dos brancos utilizou-se somente a etapa do condicionamento e a etapa de adição dos solventes de eluição. Os brancos dos eluentes nas fases sólidas em estudo não apresentaram picos de interferentes próximos ao tempo de retenção da TC. Portanto, estes adsorventes foram considerados em condições de serem utilizados no sistema de adsorção/dessorção da TC.

As amostras denominadas brancos dos adsorventes foram também realizadas com o objetivo de verificar a presença ou não de interferentes que poderiam ter ficado nessas fases sólidas, devido ao processo de síntese. É importante que não haja interferentes nas condições de análise para que os resultados posteriores com as soluções padrões não sejam mascarados.

A Figura 12 apresenta o cromatograma da solução branco do solvente de diluição



A Figura 12: Cromatograma da solução branco do solvente de diluição da sílica 200°C.

4.5.2. Limite de detecção instrumental (LDI) e limite de quantificação instrumental (LQI)

O menor nível detectado foi de 2,5 µg/l da solução padrão de TC dissolvida no solvente de diluição.

O LQ foi 8,32 µg/l (10 S/R).

4.5.3. Curva analítica (linearidade) e intervalo

As curvas, determinadas a cada estudo de adsorção/dessorção, apresentaram baixa dispersão no conjunto de pontos experimentais e menor incerteza dos coeficientes de regressão estimados nos intervalos que variaram conforme Tabela XIII.

Tabela XIII: Avaliação da qualidade das curvas analíticas nos intervalos propostos na metodologia da TC.

| | Experimentos | | | | | |
|--------------------------|------------------|-------------------|--------------------------------|---------------------------|-------------------------------------|---|
| | Intervalo (µg/l) | Equações | Coefficiente de correlação (r) | Linearidade (Fcal ≤ Ftab) | Validade da Regressão (Fcal ≥ Ftab) | Eficiência da regressão (R ² > 0,95) |
| S-DVB | 5 - 500 | y=107,2x + 318,2 | 0,9995 | Aceita-se | Aceita-se | Aceita-se |
| S-DVB-GMA 25% | 5 - 500 | y=107,2x + 318,2 | 0,9995 | Aceita-se | Aceita-se | Aceita-se |
| DVB- GMA 50% | 5 - 500 | y=107,2x + 318,2 | 0,9995 | Aceita-se | Aceita-se | Aceita-se |
| EnviChrom ^{PTM} | 5 - 500 | y=107,2x + 318,2 | 0,9995 | Aceita-se | Aceita-se | Aceita-se |
| Sílica 450°C | 10 - 1000 | y = 39,9x - 189,9 | 0,9999 | Aceita-se | Aceita-se | Aceita-se |
| LC-18 TM | 10 - 1000 | y = 39,9x - 189,9 | 0,9999 | Aceita-se | Aceita-se | Aceita-se |
| Sílica 110°C | 10 - 200 | y = 27,2x + 261,7 | 0,9899 | Aceita-se | Aceita-se | Aceita-se |
| Sílica 200°C | 10 - 200 | y = 27,2x + 261,7 | 0,9899 | Aceita-se | Aceita-se | Aceita-se |

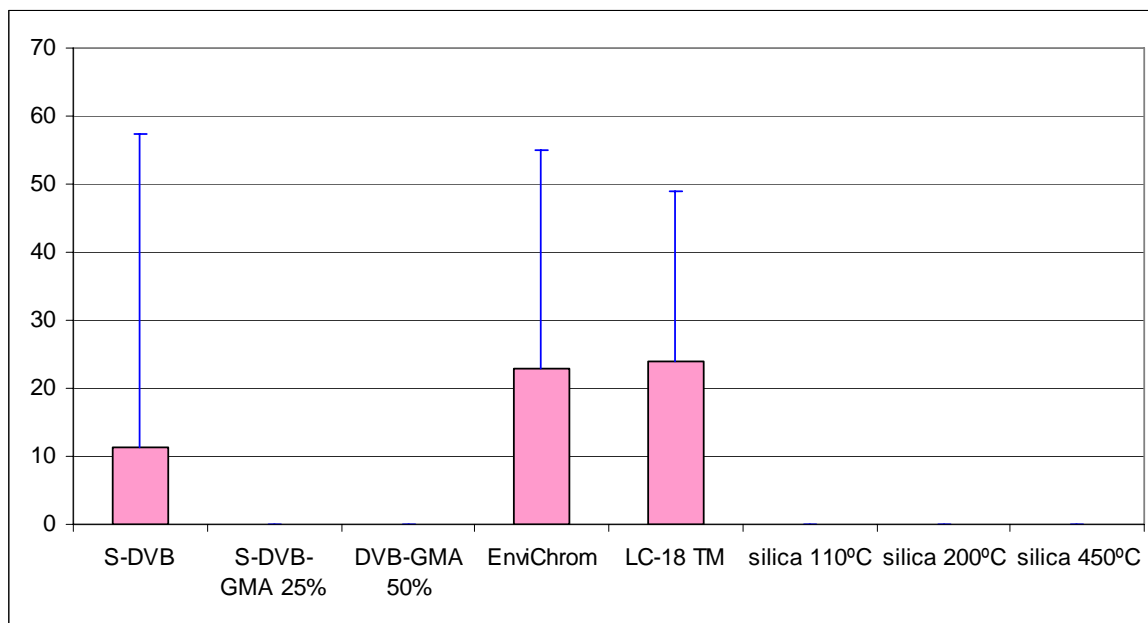
4.6. ESTUDO DE ADSORÇÃO/DESSORÇÃO DAS FASES SÓLIDAS FRENTE À TETRACICLINA

Inicialmente, ficou estabelecido que o estudo de adsorção/dessorção da TC, nas fases sólidas, seria realizado com cinco eluentes (Tabela VIII). No entanto, no decorrer dos testes preliminares observou-se que as misturas de metanol com o solvente de diluição e acetonitrila com o solvente de diluição precipitavam. Portanto, o estudo ficou restrito aos eluentes metanol 100%, acetonitrila 100% e solvente de diluição.

Quando a detecção foi possível, os percentuais de recuperação de TC nos eluídos e eluatos foram quantificados através das curvas analíticas. As análises das amostras

denominadas eluato e eluído tiveram como objetivo avaliar a capacidade de retenção e de dessorção da TC nestas fases sólidas.

A Figura 13 mostra a recuperação da TC nos eluatos.



CV (%) = coeficiente de variação

Figura 13: Recuperação da TC nos eluatos.

As soluções aquosas de TC a 10 µg/l, após percolação nas diferentes fases sólidas, apresentaram traços de TC nos polímeros S-DVB, no polímero comercial e na sílica comercial da Supelco, indicando que a etapa de adsorção não foi completa.

Os percentuais de recuperação da TC no eluído utilizando metanol 100% e acetonitrila 100% na etapa de eluição, nas diferentes fases sólidas, ficaram abaixo do limite de detecção, pois não foi detectado o pico no tempo de retenção característico da TC. Este comportamento indica que estes eluentes não foram eficientes em dessorver a TC adsorvida nestas FS. Por esta razão não foi realizado teste de replicata com estes solventes.

Quando os valores de recuperação dos eluídos são baixos e dos eluatos também, pode-se sugerir uma forte interação da TC com as fases sólidas, tendo-se retenção irreversível por parte da TC ⁽²⁷⁾.

As Figuras 14 e 15 mostram as recuperações da TC nas fases sólidas poliméricos e à base de sílica, respectivamente, utilizando solvente de diluição.

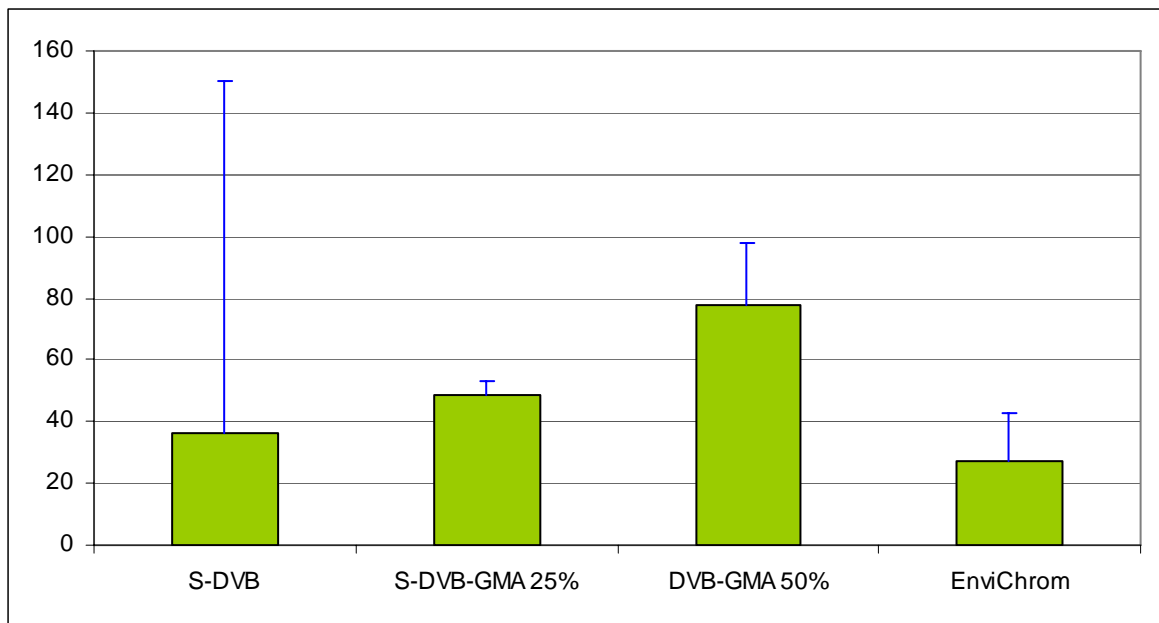


Figura 14: Recuperação da TC no eluído das fases sólidas poliméricas utilizando solvente de diluição como eluente.

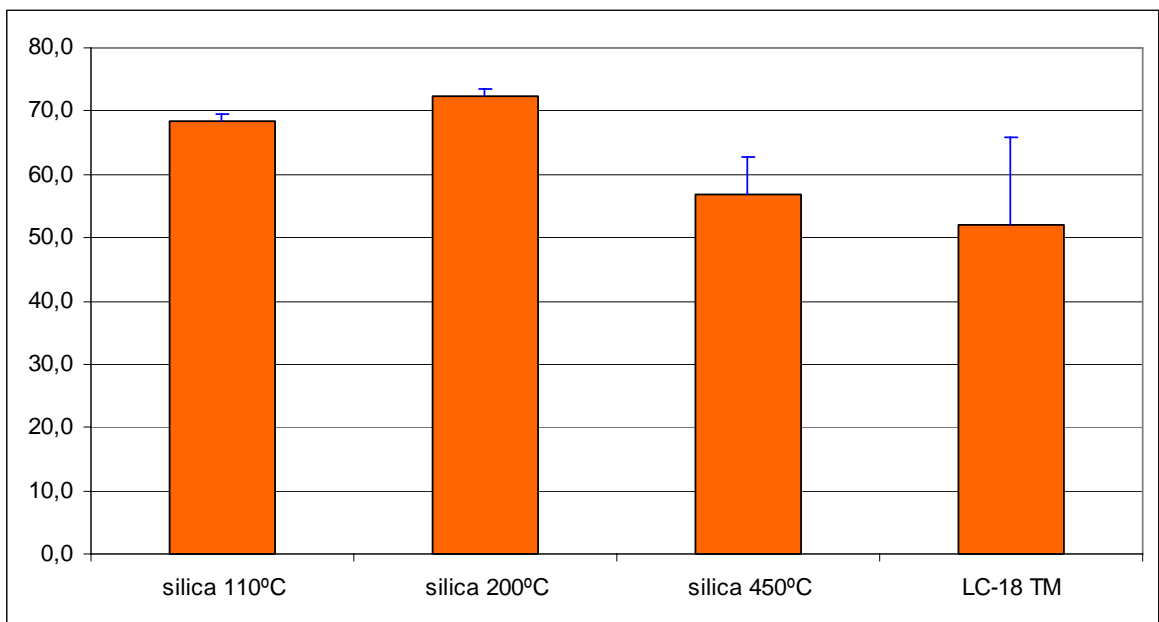


Figura 15: Recuperação da TC no eluído das fases sólidas à base de sílica utilizando solvente de diluição como eluente.

No polímero DVB-GMA 50%, o solvente de diluição apresentou percentual de recuperação mais alto (78%). A alta recuperação, provavelmente seja justificada, pela presença do metacrilato de glicidila (GMA) que confere maior polaridade ao polímero. No entanto, mais testes seriam necessários para avaliar estes índices de recuperação, mas não

foi possível devido à complexidade e tempo hábil de síntese destes polímeros para a finalização desta dissertação.

Com relação à sílica 200°C, o solvente de diluição apresentou os melhores valores de percentual de recuperação (72,5%), com coeficiente de variação baixo (1,0%), quando comparada à sílica comercial. Em termos de extração (recuperação), não houve muita diferença entre a sílica 110°C e a sílica 200°C. Para a sílica 450°C, a extração foi reduzida. A sílica 450°C tem menos zircônio, mas tem mais grupos siloxanos (Si-O-Si), que pode estar competindo com o solvente de diluição pela TC. Visto que, na sílica LC-18 a adsorção da TC não foi completa e que a TC teve uma completa retenção na fase à base de zircônio, pode-se atribuir que o solvente de diluição foi eficiente para deslocar a TC e superar as possíveis interações do analito com a fase de sílica sintetizada, comparada à sílica LC-18, que teve uma recuperação menor do que 60% e CV = 14%. O solvente de diluição é um sistema solvente que contém oxalato de sódio. A literatura tem registrado que o oxalato previne a formação de quelatos da TC com íons metálicos ⁽⁶⁾. Portanto, a possível formação destes quelatos da TC com o íon metálico da fase sólida é contornada, pois o oxalato compete com o antimicrobiano TC e complexa com o íon zircônio. Reforçando esta hipótese, artigos de cromatografia em camada delgada com fase reversa registram que a TC apresenta marcas de cauda nas placas quando soluções de metanol e acetonitrila são usadas no sistema solvente e que sistemas solventes contendo ácido oxálico controlam esta propriedade indesejável da TC ⁽⁶⁾. A forte interação da TC com as FS de sílica funcionalizadas com zirconocenos pode ser atribuída também ao fato de que as fases sólidas apresentam grupos silanóis disponíveis na superfície da sílica. De acordo com Pizzolato [27], “As fases sintetizadas apresentam cerca de 0,3% de Zr/SiO₂ e o nível de saturação indica que o conteúdo desse metal é atingido não simplesmente porque a superfície encontra seu nível de saturação (inexistência de grupos silanol para imobilização), mas por efeito estérico desempenhado por zirconocenos imobilizados na superfície que impedem o acesso de outras moléculas presentes na solução aos grupos silanol residuais. Tendo em vista a presença de grupos silanóis residuais na superfície da sílica e a presença de grupos OH na estrutura da TC, parece que este analito possui maior tendência a interagir com fases funcionalizadas com zirconoceno. Além disso, a presença de sítios de ácidos de Lewis sobre os centros de Zr deve fornecer sítios suplementares para a interação com compostos carbonilados”.

Assim, de acordo com as considerações acima expostas, a sílica 200°C foi considerada satisfatória para avaliar os parâmetros de validação na metodologia para determinação de TC em matrizes ambientais aquosas.

As Figuras 16 e 17 mostram os possíveis mecanismos de adsorção/dessorção do antimicrobiano TC nas sílicas sintetizadas e na sílica comercial.

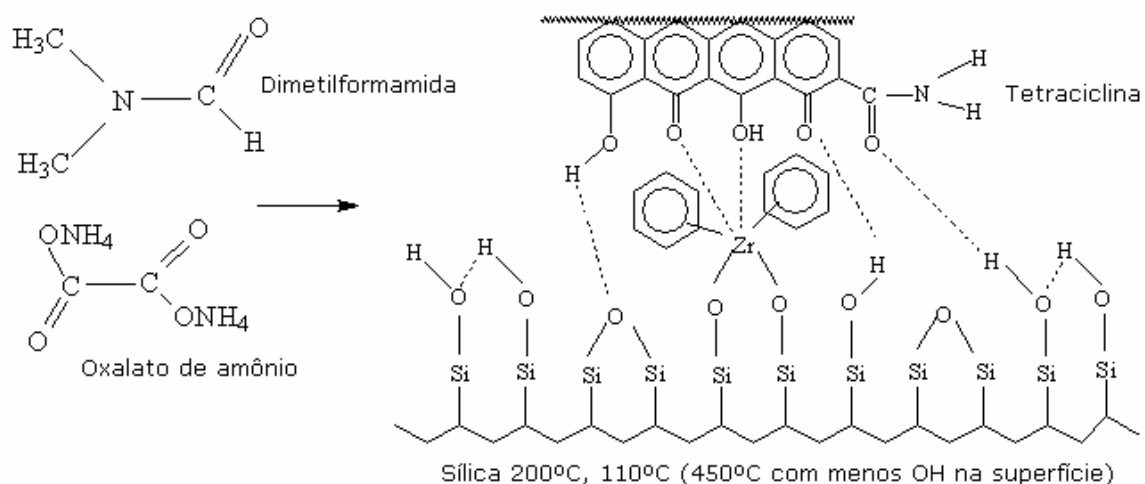


Figura 16: Mecanismo de adsorção entre o antimicrobiano tetraciclina e as sílicas sintetizadas.

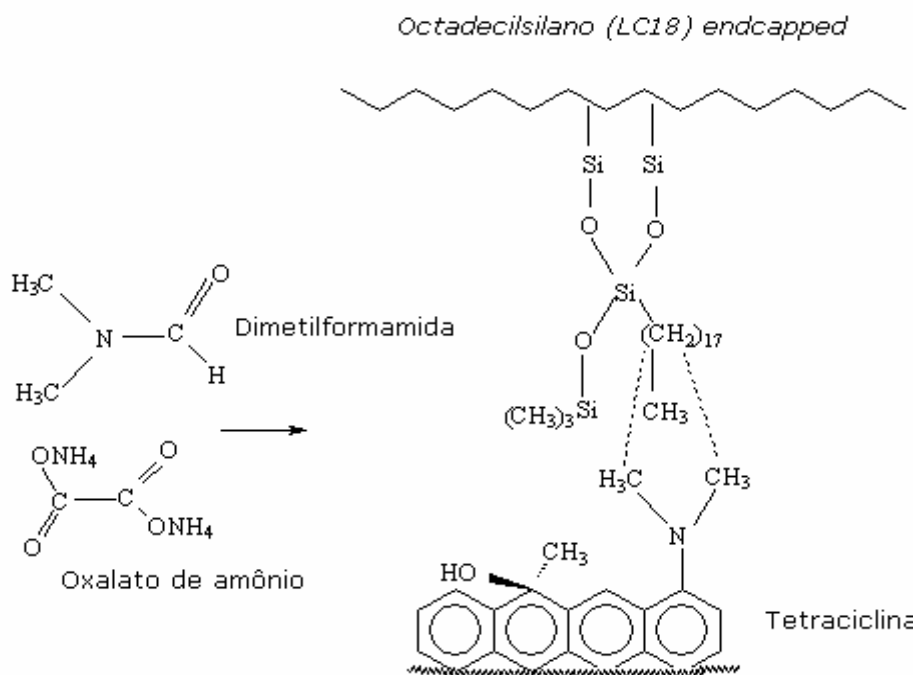


Figura 17: Mecanismo de partição entre o antimicrobiano tetraciclina e a sílica comercial.

4.7. VOLUME DE QUEBRA DE TC EM ÁGUA ULTRAPURA E LIMITE DE DETECÇÃO E DE QUANTIFICAÇÃO DO MÉTODO

A Figura 18 mostra o perfil do volume de quebra da solução aquosa de TC em água ultrapura para a sílica 200°C utilizando o solvente de diluição

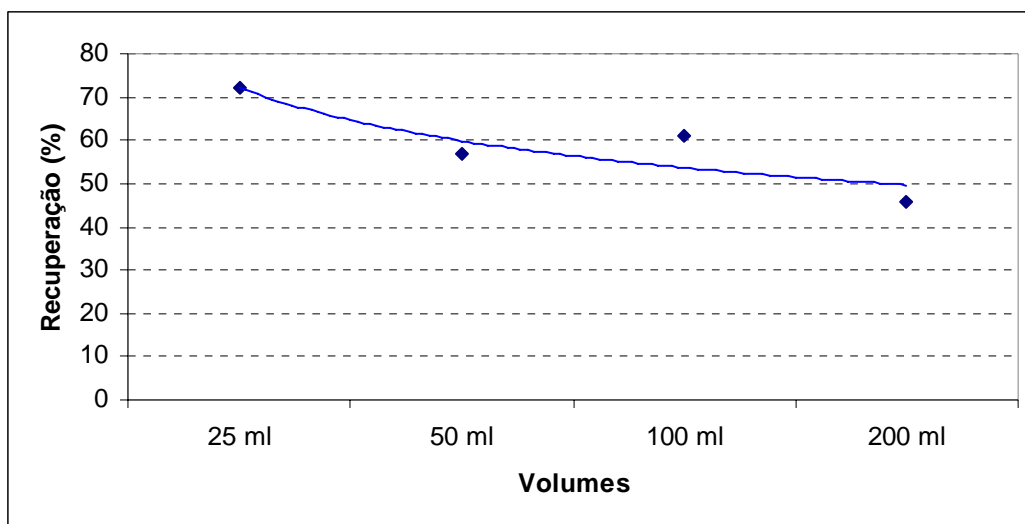


Figura 18: Volume de quebra da solução de TC em água ultrapura para a sílica 200°C.

De acordo com a figura, a sílica 200°C, para TC, apresentou volume de quebra de 25 ml. Como o volume final do extrato é de 5 ml, isto nos dá um fator de concentração de 5. Este comportamento era esperado, pois para compostos moderadamente polares, recuperações quantitativas são encontradas na faixa de 10 a 100 ml ⁽⁹²⁾. Volume menor de 25 ml, no caso 10 ml, não foi testado porque o fator de concentração seria menor, e se fosse considerado um volume de extrato menor de 5 ml, no caso 1 ml, perdas seriam consideráveis em injeções replicadas.

A quantificação das soluções utilizadas para determinação do volume de quebra, foi feita com uma solução padrão de 50 µg/l, preparada em solvente de diluição.

O limite de detecção do método na água ultrapura foi de 4,6 µg/l no extrato e de 0,9 µg/l na amostra.

O limite de quantificação do método na água ultrapura foi de 15 µg/l no extrato e de 3 µg/l na amostra.

4.8. PARÂMETROS DE DESEMPENHO DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA NA MATRIZ DE ÁGUA DO ARROIO DILÚVIO E NA ÁGUA POTÁVEL NA DETERMINAÇÃO DE TETRACICLINA

4.8.1. Curva analítica (linearidade) e intervalo

As curvas analíticas apresentaram baixa dispersão no conjunto de pontos experimentais e menor incerteza dos coeficientes de regressão estimados nos intervalos que variaram conforme Tabela XIV.

Tabela XIV: Avaliação da qualidade das curvas analíticas nos intervalos propostos na quantificação de amostras ambientais.

| | Intervalo (µg/l) | Equações | Coefficiente de correlação(r) | Linearidade (Fcal ≤ Ftab) | Validade da Regressão (Fcal ≥ Ftab) | Eficiência da regressão (R ² > 0,95) |
|----------------|------------------|-----------------|-------------------------------|---------------------------|-------------------------------------|---|
| Água Potável | 25 - 100 | y=36,4x - 175,5 | 0,9998 | Aceita-se | Aceita-se | Aceita-se |
| Água do Arroio | 12,5 - 200 | y=33,8x - 105,3 | 0,9998 | Aceita-se | Aceita-se | Aceita-se |

4.8.2. Volume de quebra

As Figuras 19 e 20 mostram o perfil do volume de quebra da solução aquosa de TC em água potável e na água do arroio para a sílica 200°C utilizando o solvente de diluição como eluente.

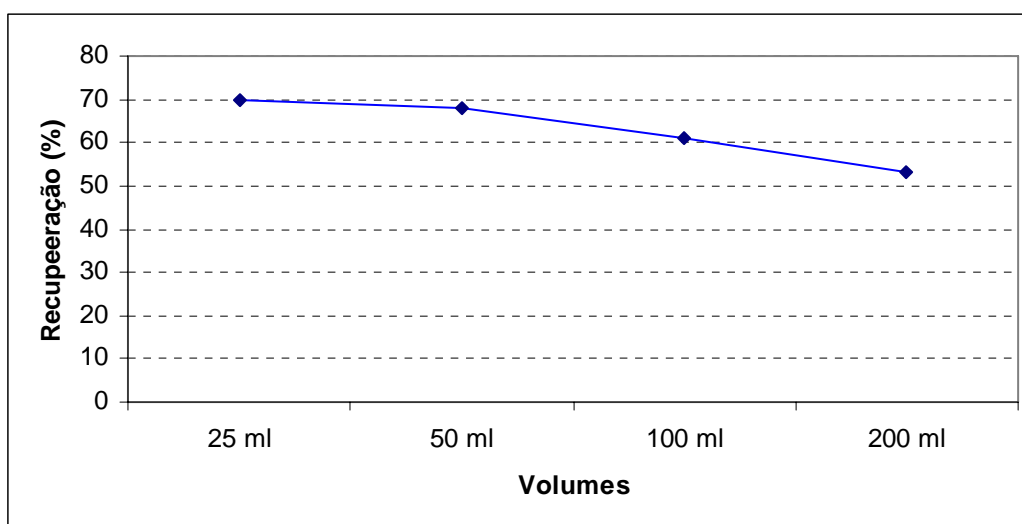


Figura 19: Volume de quebra da solução de TC em água potável para a sílica 200°C.

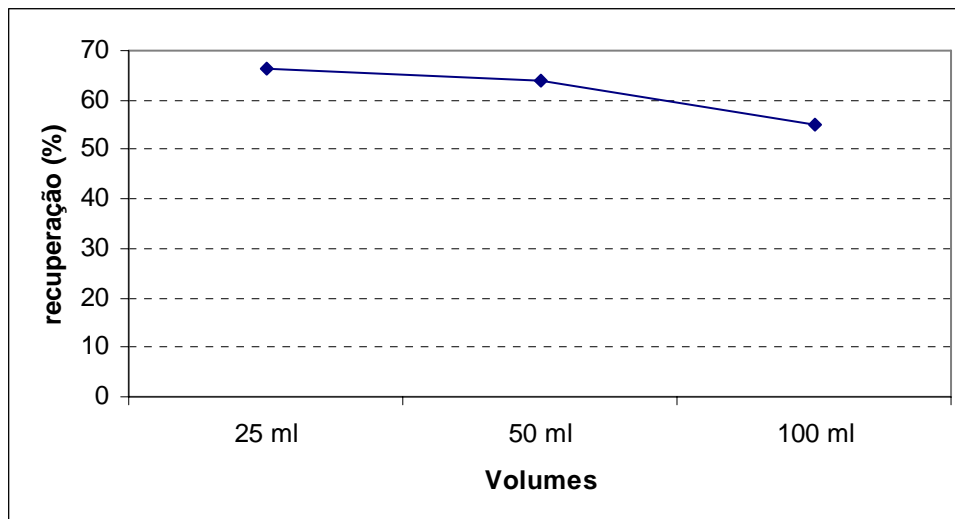


Figura 20: Volume de quebra da solução de TC em água do arroio para a sílica 200°C.

Observa-se que os comportamentos do volume de quebra na água ultrapura, potável e do arroio foram semelhantes indicando que substâncias que possam estar presentes na água potável ou do arroio não afetaram drasticamente a recuperação da TC. No entanto, nas águas do arroio Dilúvio houve um pequeno decréscimo nas recuperações que podem ser justificadas pela presença de várias substâncias como os ácidos húmicos e fúlvicos e, portanto, indicando que TC mostrou pequeno efeito de matriz na matriz de água mais complexa.

4.8.3. Limite de detecção do método (LDM), limite de quantificação do método (LQM) e precisão

A Tabela XV resume a recuperação em 25 ml de água potável e do arroio fortificadas com 0,25 µg de TC, o limite de detecção e de quantificação do método na metodologia em estudo.

Tabela XV: Precisão, LDM e LQM da TC em água potável e da água do arroio.

| | Recuperação ($\mu\text{g/l}$) \pm DP | Precisão (CV%) | LDM ($\mu\text{g/l}$) | LQM ($\mu\text{g/l}$) |
|------------------------|---|-------------------|----------------------------|----------------------------|
| Água potável | 1° cartucho: $51,8 \pm 1,8$ | 1° cartucho: 3,4% | 5,1 (no extrato) | 17,0 (no extrato) |
| | 2° cartucho: $50,2 \pm 1,7$ | 2° cartucho: 3,3% | 1,0 (na amostra) | 3,4 (na amostra) |
| | 3° cartucho: $44,7 \pm 3,9$ | 3° cartucho: 8,8% | | |
| Água do Arroio Dilúvio | 1° cartucho: $66,3 \pm 3,7$ | 1° cartucho: 5,6% | 18,0 (no extrato) | 60,0 (no extrato) |
| | 2° cartucho: $63,8 \pm 4,0$ | 2° cartucho: 6,3% | 3,6 (na amostra) | 12,0 (na amostra) |
| | 3° cartucho: $68,7 \pm 3,2$ | 3° cartucho: 4,7% | | |

Recuperação e desvio padrão (DP) é dado ($n=3$) no nível de concentração de $10 \mu\text{g/l}$.

A repetibilidade do método de extração em fase sólida e o volume de quebra na água do arroio Dilúvio foram verificados na mesma amostra. No entanto, as amostras de água potável foram diferentes, coletadas em dias diferentes, para avaliar inicialmente o volume de quebra e depois a repetibilidade. Pode-se, portanto dizer que na avaliação da repetibilidade da água potável, a amostra de água apresentou substâncias que afetaram a recuperação da TC.

4.8.4. Exatidão

A exatidão do método foi inferida, pois o método apresentou linearidade nos intervalos propostos, além de precisão e especificidade.

4.9. QUANTIFICAÇÃO DE TETRACICLINA NA AMOSTRA DE ÁGUA DO ARROIO DILÚVIO

A partir dos resultados obtidos anteriormente em que foram definidas as melhores condições para analisar a amostra real, utilizando-se como fase sólida a sílica 200 na extração em fase sólida e obtendo-se um fator de concentração de 5 com o solvente de diluição, a análise cromatográfica mostrou ausência de TC na água do arroio Dilúvio.

A Figura 21 mostra os cromatogramas da análise de TC na matriz ambiental utilizando a metodologia em estudo com os parâmetros de melhor desempenho.

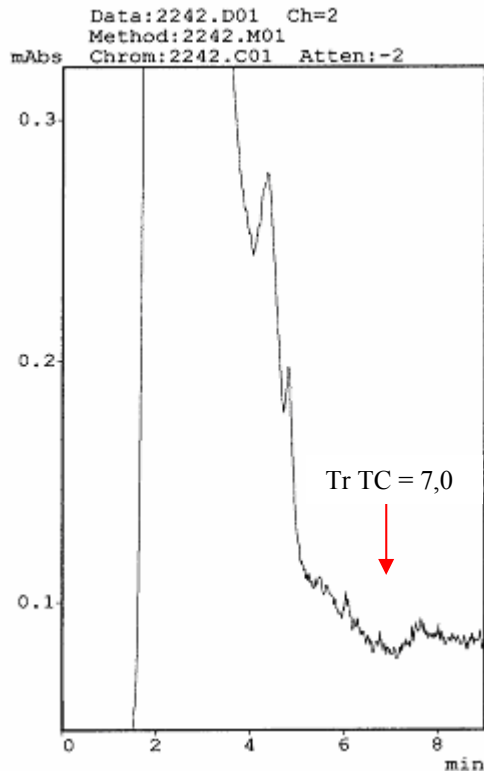


Figura 21: Cromatograma de análise de TC na amostra ambiental na metodologia em estudo.

Os limites do método, calculados com base na razão sinal/ruído, estão acima dos limites instrumentais. Desta forma a TC poderia ter sido detectada na amostra ambiental. A literatura vem registrando estudos sobre a adsorção de fármacos nos solos^(58, 64, 74, 93) e a concentração de antimicrobianos nos sedimentos dos leitos dos rios podem tornar-se mais importante para antimicrobianos com alto coeficiente de sorção (K_{ds}). K_{ds} é definido como a razão da concentração de um composto na fase sólida (C_s) e na água (C_{aq}), no equilíbrio. A TC tem $K_{ds} = 84000 \text{ ml/g}$ ⁽⁶⁴⁾, no entanto, a variação de K_{ds} para um dado composto pode ser significativa em diferentes solos⁽⁹³⁾. Portanto, a tetraciclina pode ter um potencial risco, e investigações nos efeitos ambientais desse antimicrobiano são necessárias.

4.10. ESTABILIDADE DA SOLUÇÃO AQUOSA DE SULFAMETOXAZOL E TRIMETOPRIMA

A estabilidade da solução aquosa de SMX e TM foi avaliada durante dois dias, com análise das áreas dos cromatogramas das soluções nas concentrações de 1 mg/l e 8 µg/l. Durante três dias avaliou-se o pH das mesmas soluções. As soluções foram preparadas em um único dia. Os resultados são mostrados na Tabela XVI.

Tabela XVI: Estudo de estabilidade da solução aquosa de SMX e TM

| | 1º dia | 2º dia | 3º dia | 7º dia |
|-------------------------------------|--|----------|----------|------------------------------------|
| Solução aquosa de SMX e TM (8 µg/l) | pH = 6,3 Área TM = 298 Área SM = 489 | pH = 5,8 | pH = 5,8 | Área TM = 478 Área SM = 478 |
| Solução aquosa de SMX e TM (1 mg/l) | pH = 7,4 Área TM = 33839 Área SM = 61507 | pH = 7,3 | pH = 7,2 | Área TM = 37530 Área SM = 60897 |

Os resultados mostram que TM a 8 µg/l e a 1 mg/l é mais instável durante o período de uma semana quando comparada a SMX, mostrando aumento na área cromatográfica por uma co-eluição desconhecida. Este aumento é maior na concentração mais baixa. A SMX é praticamente estável nas duas concentrações com coeficiente de variação de 1,6% nas soluções de 8 µg/l e 0,7% nas soluções de 1 mg/l. O pH mostrou ligeira queda na solução mais diluída, mas considera-se constante em função das variações do equipamento.

4.11. AVALIAÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE SULFAMETOXAZOL E TRIMETOPRIMA

O método foi avaliado levando-se em conta a precisão das áreas e a resolução de cinco injeções repetitivas de uma solução padrão de 250 µg/l. A alta repetibilidade nas áreas foi obtida com um CV de 0,9% para TM e 3,4% para SMX. A resolução entre o pico da TM e SMX foi de 14,5, estando de acordo com a farmacopéia americana⁽³⁰⁾.

4.12. PARÂMETROS DE DESEMPENHO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE SULFAMETOXAZOL E TRIMETOPRIMA

4.12.1. Seletividade

Pelos mesmos motivos e procedimento relatado no item 4.5.1, as análises dos cromatogramas das soluções branco dos eluentes (Tabela IX) nas fases sólidas à base de sílica (Tabelas IV) foram realizadas, confirmando a seletividade do método. Os brancos dos eluentes nas fases sólidas em estudo não apresentaram picos de interferentes próximos ao tempo de retenção da SMX e da TM (Figura 22 e Anexo).

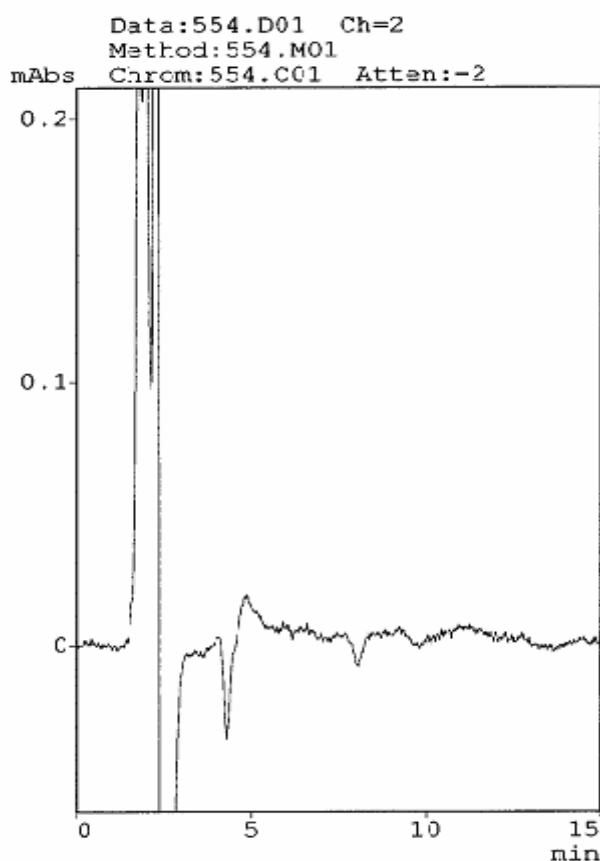


Figura 22: Cromatograma da solução branco do eluente metanol:água 50% da sílica C18.

4.12.1. Limite de detecção instrumental e limite de quantificação instrumental

O menor nível detectado foi de 2,5 µg/l da solução padrão de SMX e TM dissolvida na fase móvel.

O LQI foi 8,32 µg/l (10 R/S).

4.12.2. Curva analítica (linearidade) e intervalo

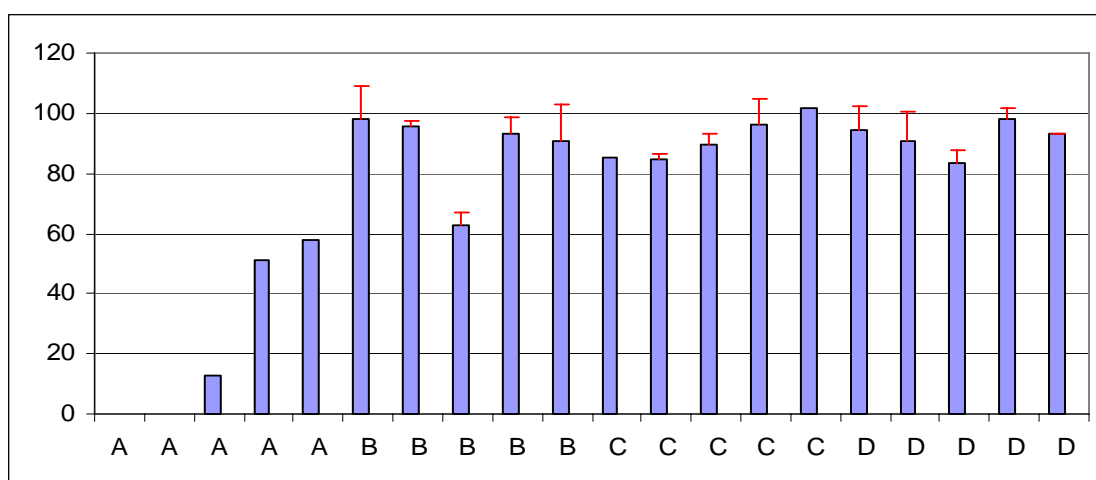
As curvas apresentaram baixa dispersão no conjunto de pontos experimentais e menor incerteza dos coeficientes de regressão estimados nos intervalos que variaram conforme tabela XVII. As curvas foram determinadas em cada grupo de fase sólida no estudo de adsorção/dessorção.

Tabela XVII: Avaliação da qualidade das curvas analíticas nos intervalos propostos na metodologia de SMX e TM.

| | | Experimento | | | | | |
|--------------|-----|------------------|-------------------|-------------------------------|---------------------------|-------------------------------------|---|
| | | Intervalo (µg/l) | Equações | Coefficiente de correlação(r) | Linearidade (Fcal ≤ Ftab) | Validade da Regressão (Fcal ≥ Ftab) | Eficiência da regressão (R ² > 0,95) |
| C18 Waters | SMX | 10 - 1000 | y = 65,8x - 116,5 | 1,0000 | Aceita-se | Aceita-se | Aceita-se |
| | TM | 10 - 1000 | y = 22,7x - 126,9 | 0,9999 | Aceita-se | Aceita-se | Aceita-se |
| Sílica 450°C | SMX | 5 - 1000 | y = 61,3x - 63,2 | 1,0000 | Aceita-se | Aceita-se | Aceita-se |
| | TM | 10 -1000 | y = 23,5x - 163,3 | 1,0000 | Aceita-se | Aceita-se | Aceita-se |
| Sílica 110°C | SMX | 5 - 1000 | y = 63,5x - 16,4 | 1,0000 | Aceita-se | Aceita-se | Aceita-se |
| | TM | 5 - 1000 | y = 24,4x - 96,2 | 0,9999 | Aceita-se | Aceita-se | Aceita-se |
| Sílica 200°C | SMX | 5 - 1000 | y = 60,6x - 87,2 | 1,0000 | Aceita-se | Aceita-se | Aceita-se |
| | TM | 10- 1000 | y = 24,0x - 79,7 | 0,9999 | Aceita-se | Aceita-se | Aceita-se |

4.13. ESTUDO DE ADSORÇÃO/DESSORÇÃO DAS FASES SÓLIDAS FRENTE A SULFAMETOXAZOL E TRIMETOPRIMA

A análise das soluções aquosas de SMX e TM a 10 µg/l, após a percolação nas fases sólidas (Tabela IV), é mostrada na Figura 23.



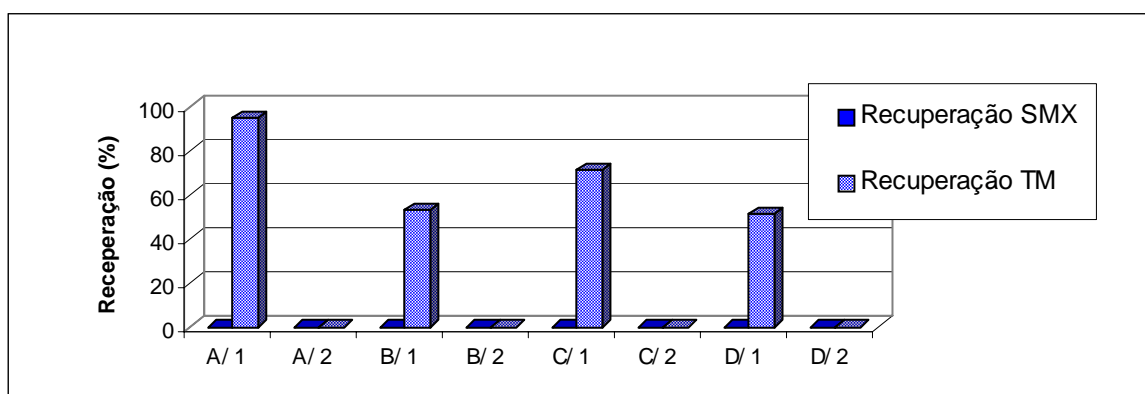
A: C18; B: sílica 450; C: sílica 110; D: sílica 200.

Figura 23: Recuperação de SMX e TM nos eluatos das diferentes fases sólidas.

De acordo com a Figura 23, a SMX praticamente não foi retida nas sílicas sintetizadas, apresentando recuperações de 65 a 106% para as análises dos eluatos. Exceto na sílica comercial C18 da Waters, em que não foi detectado SMX em dois ensaios, indicando algum problema não identificado, a SMX foi parcialmente retida com recuperações entre 13 e 58%. Nesta etapa, em que se estabelece o contato entre o analito em fase aquosa e a fase sólida, a resposta no eluato deveria ser a mesma já que as interações são semelhantes, ou seja, ou deveria reter parcial ou não, ou não deveria reter o analito na fase sólida. Para a TM, no entanto, a retenção foi completa em todas as fases sólidas à base de sílica e pela sílica comercial, indicando um comportamento coerente.

Com relação à sílica comercial, inicialmente foi analisada a ODS (C18) de marca Chrom Expert, mas as análises dos brancos revelaram picos no tempo característico da TM e, portanto não foi usada no estudo de adsorção/dessorção.

A Figura 24 mostra a recuperação da SMX e TM no eluído utilizando MeOH e ACN 100% nas diferentes fases sólidas.



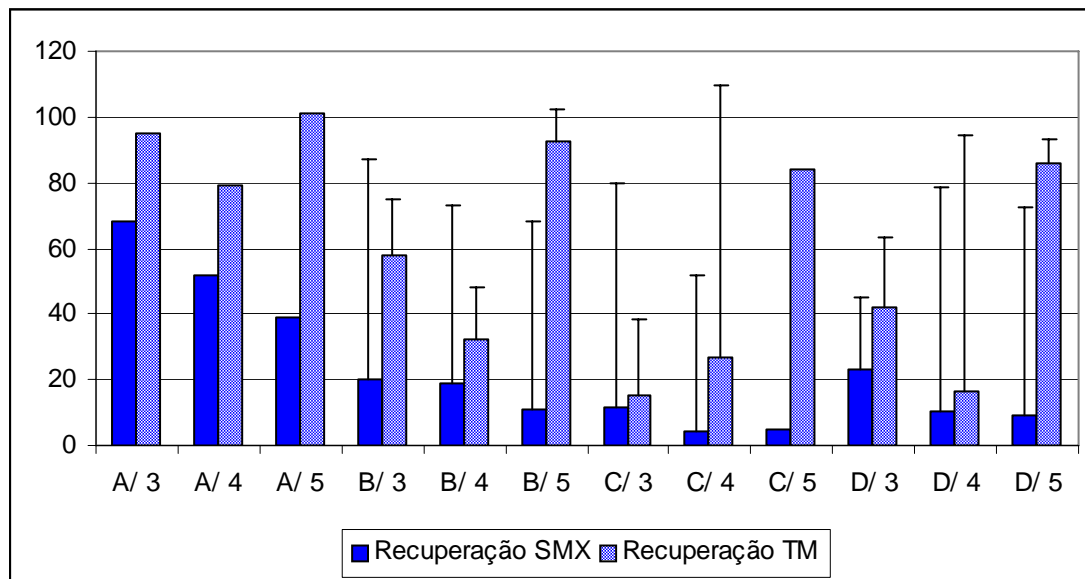
A: C18; B: Sílica 450°C; C: Sílica 110°C; D: Sílica 200°C, 1: MeOH 100%, 2: ACN 100%.

Figura 24: Recuperação de SMX e TM no eluído utilizando metanol 100% e acetonitrila 100%.

Nesta etapa em que é avaliada a capacidade dos eluentes de remover os analitos da fase sólida, percebe-se que a acetonitrila pura não foi eficiente em dessorver a TM nas diferentes fases sólidas à base de sílica. O metanol puro removeu parcialmente a TM destas fases sólidas e promoveu uma melhor dessorção na sílica comercial. No entanto, não foi capaz de remover a SMX que ficou parcialmente retida na sílica comercial.

Assim, metanol e acetonitrila puros não foram eficientes para a etapa de eluição de SMX e TM.

A Figura 25 mostra a recuperação da SMX e TM no eluído com os demais eluentes deste estudo.



A: C18; B: Sílica 450°C; C: Sílica 110°C; D: Sílica 200°C, 3: MeOH 50%, 4: ACN 50%, 5: FM.

Figura 25: Recuperação de SMX e TM no eluído com FM, MeOH e ACN a 50%.

Nesta figura, destacam-se as recuperações em metanol 50% na sílica comercial, porque apresentaram os melhores valores de recuperação para SMX (68%) e TM (95%), indicando que a SMX e a TM tiveram melhor interação com as cadeias lineares de C 18 do que com as fases sólidas à base de zircônio. As demais combinações de eluentes foram eficientes em maior ou menor grau com a TM, já que a SMX, no geral, estava com retenção inferior a 65% nestas fases. Apesar de não ter sido feitas análises em duplicatas na sílica comercial, os demais eluentes, nestas fases sólidas, não mostraram recuperações similares para SMX e TM.

De um modo geral, percebe-se que a mistura metanol:água (50:50) apresentou melhor recuperação nas fases sólidas do que a mistura acetonitrila:água (50:50). Ambas são compostas por solventes polares, sendo que a acetonitrila possui polaridade média. O metanol é um solvente prótico e a acetonitrila um solvente aprótico. Pode-se inferir, que o solvente prótico auxilia mais na dessorção destes analitos nestas fases sólidas do que o solvente aprótico. A fase móvel que é composta por água:acetonitrila:trietilamina (79,9:20:0,1), com uma maior proporção de solvente polar (água), e com um reagente de pareamento iônico (trietilamina) na sua composição, apresentou valores de recuperação

alto para TM (de 84 a 101%) em todas as sílicas. O objetivo da trietilamina na fase móvel é diminuir o efeito dos silanóis que podem estar presentes na coluna analítica ou nas fases à base de sílica. Este reagente aniônico confere uma carga negativa adicional na coluna e isto reduz a retenção da amostra por troca iônica com os grupos silanóis ⁽⁹¹⁾.

As Figuras 26 e 27 mostram os possíveis mecanismos de adsorção/dessorção dos antimicrobianos SMX e TM nas sílicas sintetizadas e na sílica comercial.

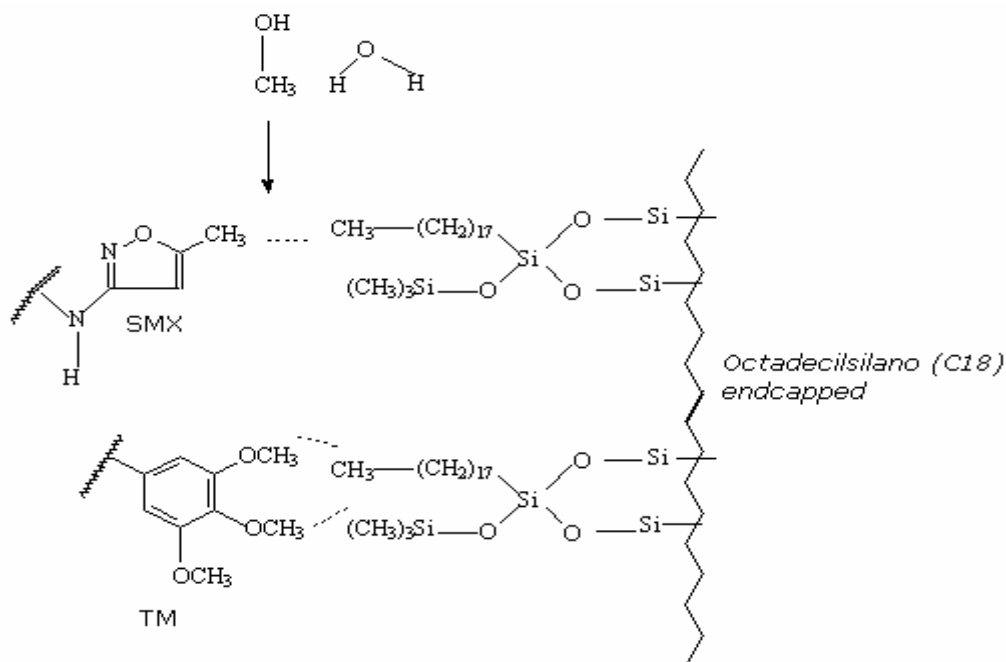


Figura 26: Mecanismo de partição entre os antimicrobianos SMX e TM e a sílica comercial.

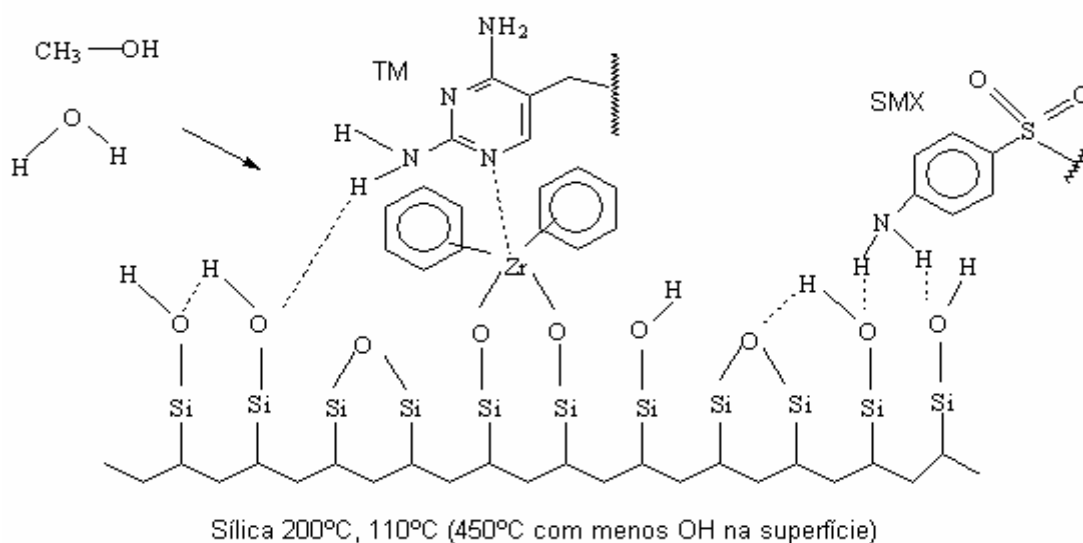


Figura 27: Mecanismo de adsorção entre os antimicrobianos SMX e TM e as sílicas sintetizadas.

4.14. VOLUME DE QUEBRA DE SMX E TM EM ÁGUA ULTRAPURA E LIMITE DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO MÉTODO

A Figura 28 mostra o gráfico do volume de quebra da solução aquosa de SMX e TM em água ultrapura para a sílica comercial C18 Waters utilizando como eluente metanol:água (50:50).

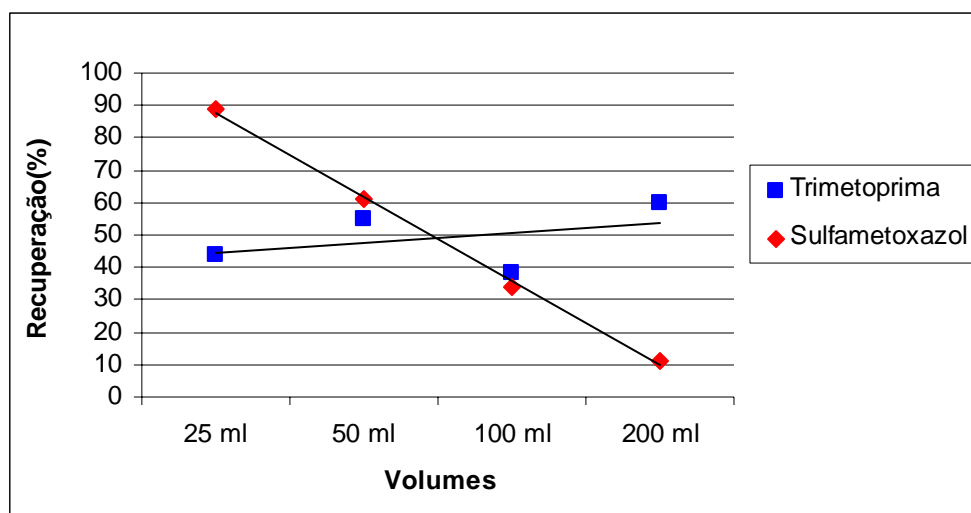


Figura 28: Volume de quebra da solução de SMX e TM em água ultrapura para a sílica comercial.

Neste gráfico percebe-se que para a SMX há uma constante redução na recuperação à medida que o volume de água aumenta. Já para a TM, há pequena variação na faixa de 40 a 60%, sem decréscimo significativo na faixa de volume de solução considerada. Devido a estes resultados, o volume de 25 ml foi escolhido, pois apesar de influenciar pouco a TM, há perda considerável para a SMX, quando o volume é maior que o escolhido. Como o volume final do extrato é de 5 ml, o fator de concentração neste caso também é 5.

A quantificação das soluções utilizadas para determinação do volume de quebra foi feita com uma solução padrão de 40 µg/l, preparada a partir da solução estoque e diluída na fase móvel.

O limite de detecção do método na água ultrapura, nestas condições, foi de 6,1 µg/L no extrato e de 1,2 µg/L na amostra; e o limite de quantificação do método foi de 20 µg/L no extrato e de 4 µg/L na amostra.

4.15. PARÂMETROS DE DESEMPENHO DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA NA MATRIZ DE ÁGUA DO ARROIO DILÚVIO E NA ÁGUA POTÁVEL NA DETERMINAÇÃO DE SULFAMETOXAZOL E TRIMETOPRIMA

4.15.1. Curva analítica e intervalo

As curvas analíticas apresentaram baixa dispersão no conjunto de pontos experimentais e menor incerteza dos coeficientes de regressão estimados nos intervalos que variou conforme Tabela XVIII

Tabela XVIII: Avaliação da qualidade das curvas analíticas nos intervalos propostos na quantificação de amostras ambientais.

| | | Intervalo (µg/l) | Equações | Coefficiente de correlação(r) | Linearidade (Fcal ≤ Ftab) | Validade da Regressão (Fcal ≥ Ftab) | Eficiência da regressão (R ² > 0,95) |
|----------------|-----|------------------|-----------------|-------------------------------|---------------------------|-------------------------------------|---|
| Água Potável | SMX | 10 - 200 | y=61,8x + 95,9 | 0,999 | Aceita-se | Aceita-se | Aceita-se |
| | TM | 10 - 200 | y=24,6x + 107,3 | 0,998 | Aceita-se | Aceita-se | Aceita-se |
| Água do Arroio | SMX | 10 - 200 | y=60,7x + 93,23 | 0,999 | Aceita-se | Aceita-se | Aceita-se |
| | TM | 10 - 200 | y=24,8x + 116,4 | 0,998 | Aceita-se | Aceita-se | Aceita-se |

4.15.2. Volume de Quebra

As Figuras 29 e 30 mostram o volume de quebra da solução aquosa de SMX e TM em água potável e na água do arroio para a sílica comercial utilizando metanol: água (50:50) como eluente.

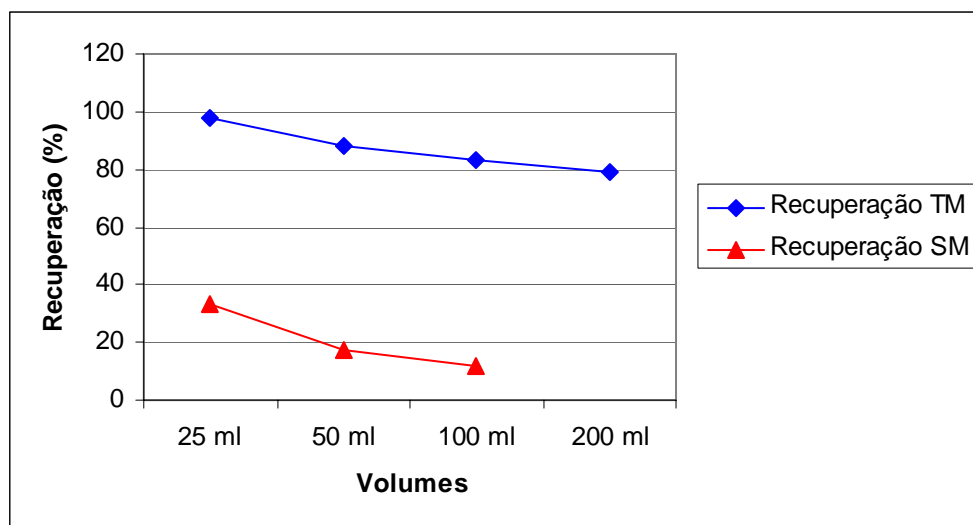


Figura 29: Volume de quebra da solução de SMX e TM em água potável para a sílica comercial.

De acordo com os testes de volume de quebra em água ultrapura e potável, realizados em duplicata, a SMX teve um comportamento mais homogêneo quando comparado a TM. Pode-se dizer então que a TM é mais sensível à técnica de análise ou que a técnica não é robusta para analisar TM. Este aspecto pode estar ligado às variações de lotes de fabricação da sílica comercial durante o estudo.

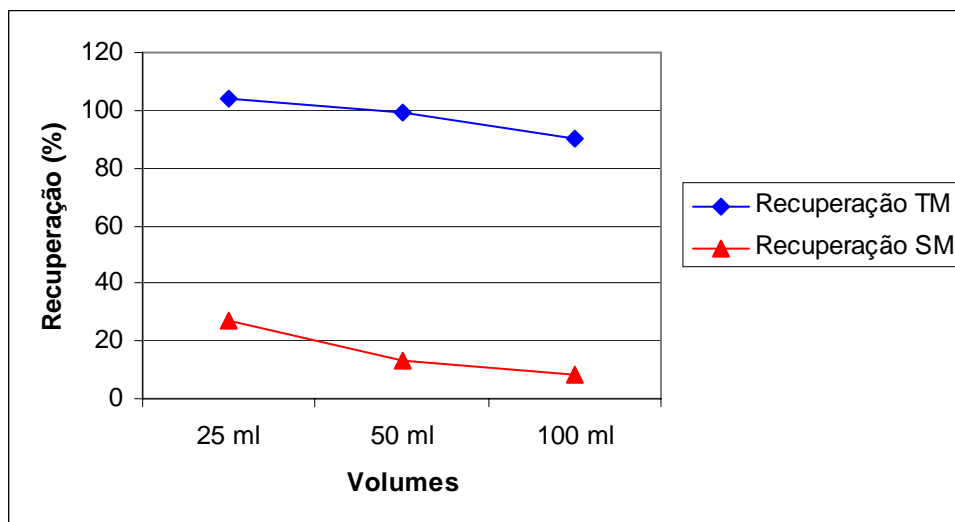


Figura 30: Volume de quebra da solução de SMX e TM em água do arroio para a sílica comercial.

De acordo com os gráficos 29 e 30, o comportamento dos volumes de quebra na água potável e do arroio é semelhante e seguem a tendência do perfil de curva de volume de quebra padrão. Estes gráficos mostram queda nas recuperações de SMX quando comparado à água ultrapura que pode ser justificado pelo aumento da complexidade da matriz.

4.15.3. Limite de detecção do método (LDM), limite de quantificação do método (LQM) e precisão

Determinaram-se os LDM e LQM, isolando SMX e TM de acordo com a metodologia de extração em fase sólida em estudo, bem como a repetibilidade da técnica.

A Tabela XIX resume a recuperação em 25 ml de água potável e do arroio fortificadas com 0,2 µg/l de SMX e TM, o LDM e de LQM na metodologia em estudo.

Tabela XIX: Precisão, LDM e LQM da SMX e TM em água potável e da água do arroio.

| | Recuperação ($\mu\text{g/l}$) \pm DP | Precisão (CV%) | LDM ($\mu\text{g/l}$) | LQM ($\mu\text{g/l}$) |
|------------------------|--|---------------------------|--|---|
| Água potável | SMX: 1º cartucho: $33,0 \pm 0,4$ | SMX: 1º cartucho: 1,3% | SMX: 4,8 (no extrato) 1,0 (na amostra) | SMX: 16,0 (no extrato) 3,2 (na amostra) |
| | TM: 1º cartucho: $98,3 \pm 4,6$ | TM: 1º cartucho: 4,7% | TM: 5,7 (no extrato) 1,1 (na amostra) | TM: 19,0 (no extrato) 3,8 (na amostra) |
| Água do Arroio Dilúvio | SMX: 1º cartucho: $34,4 \pm 0,5$ | SMX: 1º cartucho: 1,6% | SMX: 1,6 (no extrato) | SMX: 5,3 (no extrato) |
| | 2º cartucho: $26,8 \pm 1,9$ | 2º cartucho: 7,1% | 0,3 (na amostra) | 1,1 (na amostra) |
| | 3º cartucho: $20,7 \pm 3,6$ | 3º cartucho: 17,5% | | |
| | TM: 1º cartucho: $107 \pm 3,4$ | TM: 1º cartucho: 3,2% | TM: 1,3 (no extrato) | TM: 4,3 (no extrato) |
| | 2º cartucho: $105 \pm 1,1$ | 2º cartucho: 1,1% | 0,3 (na amostra) | 0,9 (na amostra) |
| | 3º cartucho: $100 \pm 2,4$ | 3º cartucho: 2,4% | | |

Recuperação e desvio padrão (DP) é dado no nível de concentração de $8 \mu\text{g/l}$

Semelhante à metodologia da TC, a repetibilidade do método de extração em fase sólida e o volume de quebra na água do Arroio Dilúvio foi verificada na mesma amostra.

No entanto, nas amostras de água potável considerou-se apenas a repetibilidade das injeções referentes ao extrato de 25 mL da amostra do volume de quebra.

4.15. 4. Exatidão

A exatidão do método foi inferida, pois o método apresentou linearidade nos intervalos propostos, precisão e especificidade.

4.16. QUANTIFICAÇÃO DE SULFAMETOXAZOL E TRIMETOPRIMA NA AMOSTRAS DE ÁGUA DO ARROIO DILÚVIO

A Figura 31 mostra os cromatogramas da análise de SMX e TM na matriz ambiental utilizando a metodologia em estudo com os parâmetros de melhor desempenho.

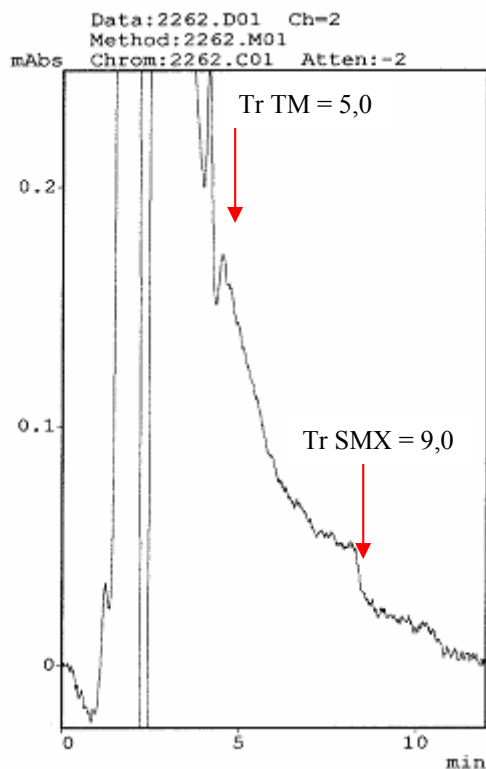


Figura 31: Cromatograma de análise de SMX e TM na amostra ambiental na metodologia em estudo.

Os LDM estão abaixo do LD instrumental para ambos analitos, portanto dificilmente poder-se-ia detectar os picos nos tempos de retenção característicos de SMX e TM.

4.17. OUTRAS FASES SÓLIDAS

A Figura 32 mostra a recuperação de SMX e TM no eluato das novas sílicas (Tabela VI)

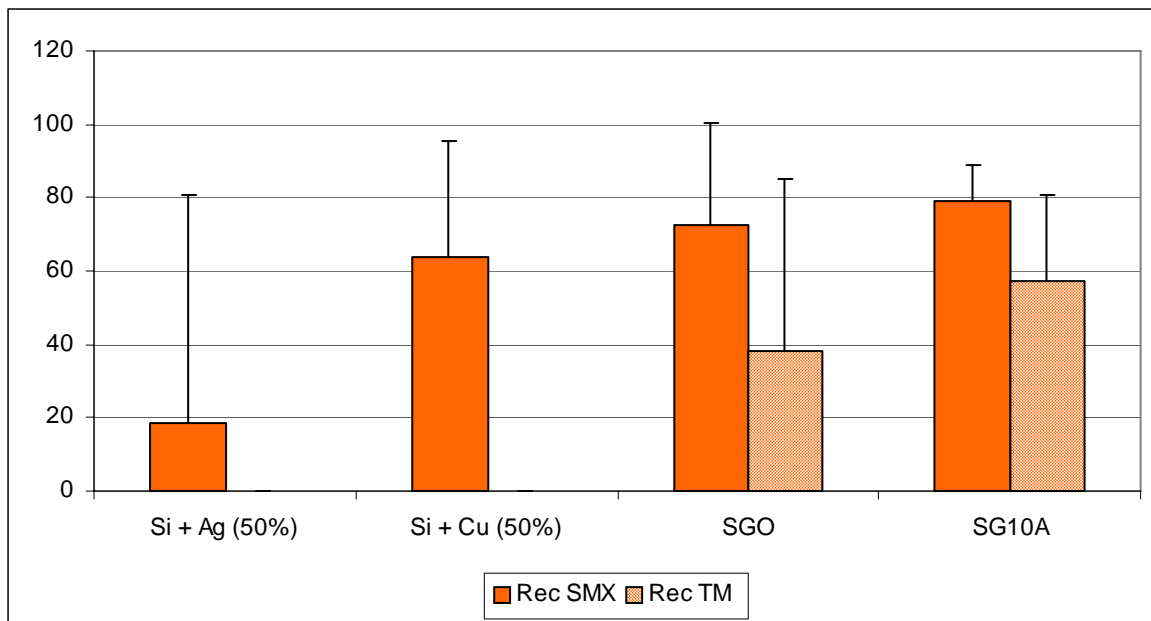


Figura 32: Avaliação da recuperação de SMX e TM nos eluatos das novas sílicas.

De acordo com a figura, a TM foi completamente retida nas sílicas Si + Ag (50%) e Si + Cu (50%) e nas demais teve uma retenção parcial. De forma contrária, SMX praticamente não foi retida em todas as sílicas deste estudo, exceto na sílica Si + Ag (50%) que teve uma retenção parcial. A partir destes resultados percebe-se que Si + Ag (50%) teria um potencial para análise dos dois analitos na mesma metodologia. A quantificação das soluções utilizadas para determinação da recuperação foi feita com uma solução padrão de 50 µg/l, preparada a partir da solução estoque e diluída na fase móvel.

As Figuras 33, 34 e 35 mostram os resultados da avaliação da recuperação de SMX e TM nas diferentes sílicas utilizando fase móvel, metanol:água (50:50) e acetonitrila (50:50) na etapa de eluição. A retenção dos analitos foi feita mediante a percolação de 25,0 mL da solução aquosa de SMX e TM a 50 µg/l e utilizou-se 5,0 ml destes eluentes na etapa de eluição. As recuperações foram avaliadas frente à solução padrão de 250 µg/l.

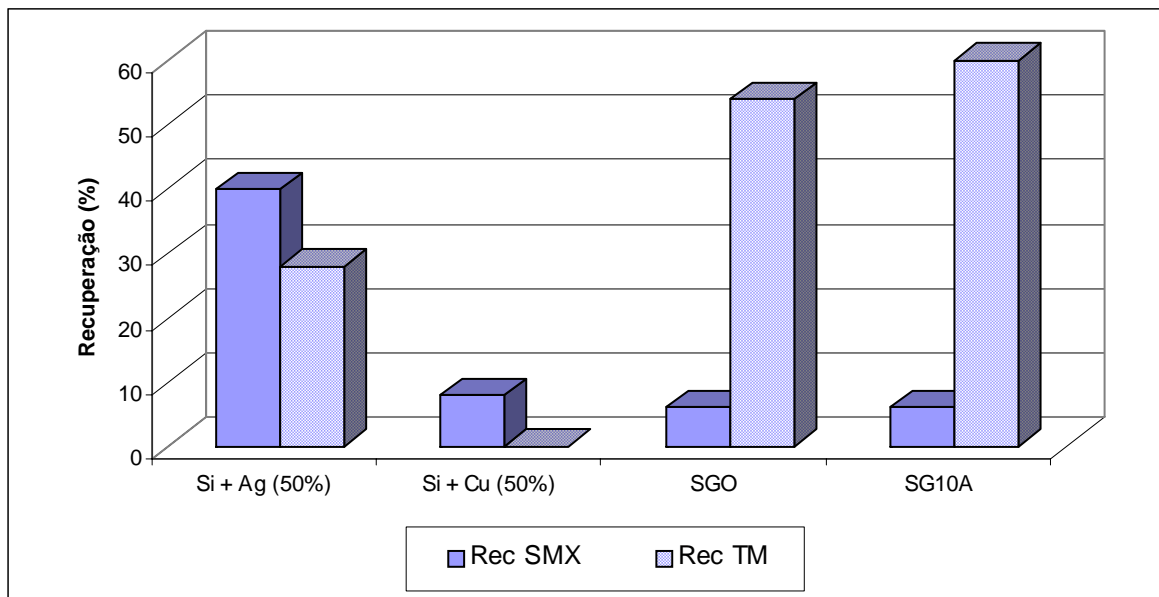


Figura 33: Avaliação da recuperação de SMX e TM utilizando FM como eluente nas diferentes sílicas.

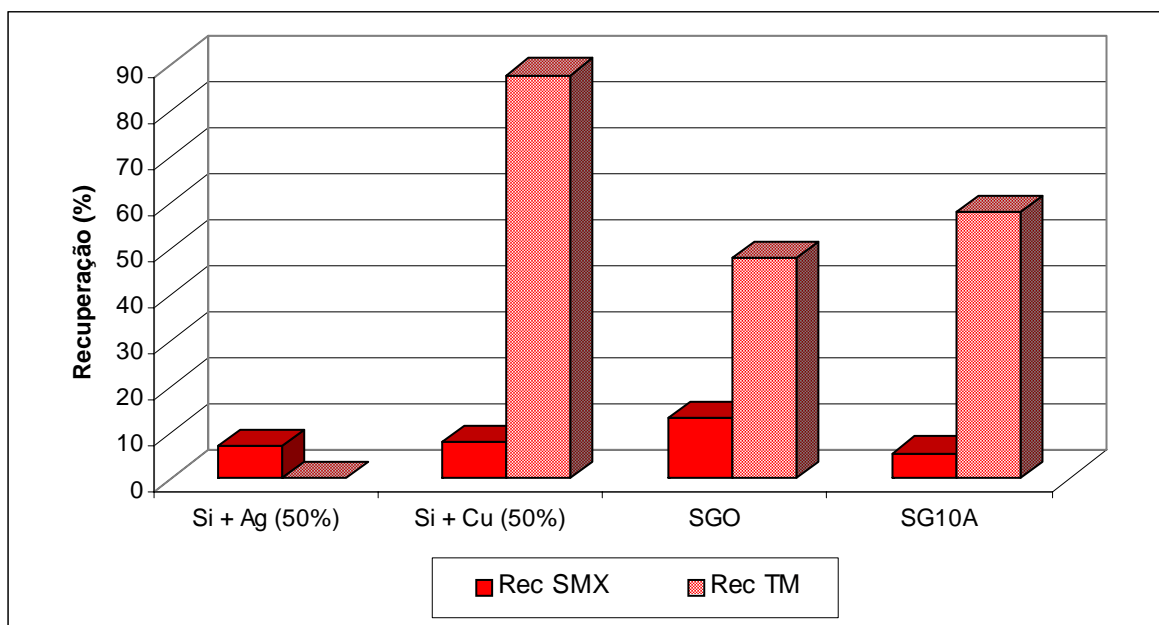


Figura 34: Avaliação da recuperação de SMX e TM utilizando metanol:água (50:50) como eluente nas diferentes sílicas.

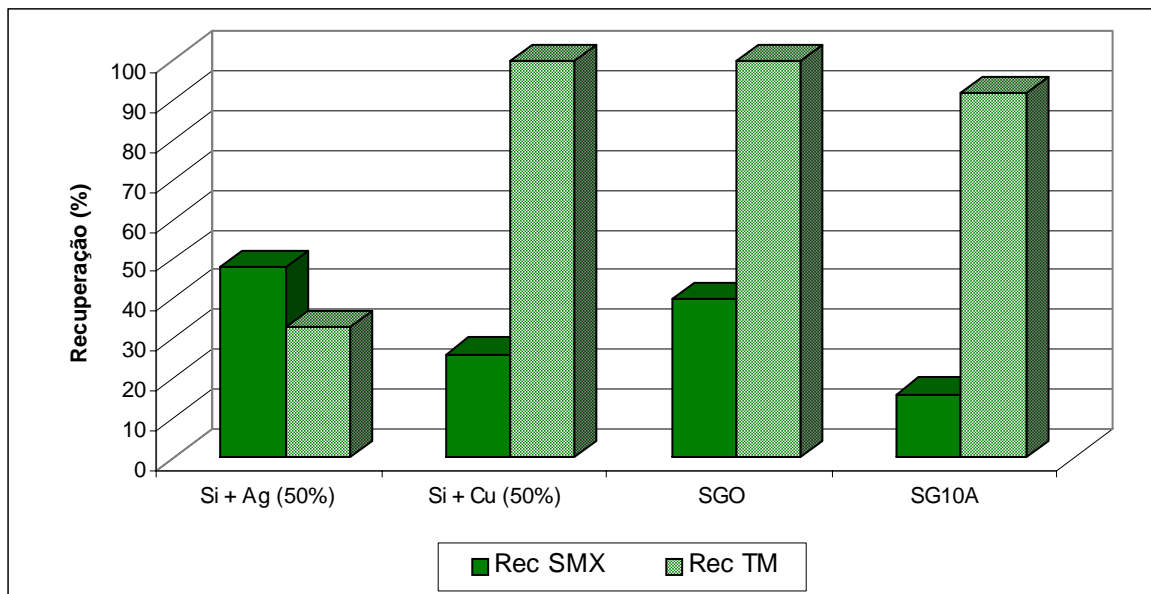


Figura 35: Avaliação da recuperação de SMX e TM utilizando acetoneitrila:água (50:50) como eluente nas diferentes sílicas.

De acordo com os gráficos não se obteve uma sílica que proporcionasse uma recuperação significativa para os dois analitos nos eluentes estudados. Percebem-se recuperações elevadas para TM quando se utiliza acetoneitrila: água (50:50) nas sílicas Si + Cu (50%), SGO e SG10A, mas como SMX foi parcialmente retida por estas fases, estas sílicas não podem ser usadas nesta metodologia em estudo.

5. CONCLUSÕES

As principais conclusões deste trabalho foram:

- Não foi possível a análise simultânea de tetraciclina, sulfametoxazol e trimetoprima por CLAE/UV;
- As melhores condições de análise por CLAE/UV para tetraciclina foram obtidas usando a fase móvel preparada pela mistura de oxalato de amônio 0,1 mol/l, N, N-dimetilformamida e fosfato de amônio dibásico 0,2 mol/l (680: 270: 50) com pH controlado entre de 7,6 e 7,7. A coluna cromatográfica foi uma C8 protegida. O comprimento de onda para análise da TC foi de 280 nm. A taxa de fluxo foi de 1 ml/min, no modo isocrático, e os volumes injetados foram de 20 µl.
- Para sulfametoxazol e trimetoprima a melhor performance cromatográfica foi obtida usando uma fase móvel preparada pela mistura de água, acetonitrila e trietilamina (799: 200: 1) com pH controlado entre $5,9 \pm 0,1$. A coluna cromatográfica foi uma C18 protegida. O comprimento de onda foi de 254 nm, no fluxo de 1 ml/min, no modo isocrático, com volume de injeção de 20 µl.
- A fase sólida que apresentou a melhor recuperação para tetraciclina (70%) foi a sílica 200°C, utilizando o solvente de diluição como eluente. O volume de quebra obtido foi de 25 mL e o fator de concentração foi de 5.
- Para sulfametoxazol e trimetoprima a melhor fase sólida foi a sílica comercial C18 da Waters, utilizando metanol: água (50:50) como eluente. O volume de quebra obtido foi de 25 mL e o fator de concentração foi de 5.
- A trimetoprima, na metodologia usada, mostrou um perfil irregular nas diferentes matrizes. Neste sentido, várias alternativas foram consideradas, mas dentre elas nenhuma se mostrou satisfatória.
- A água potável foi coletada após meia hora de vazão da torneira. A amostra da torneira não foi filtrada e foi analisada no mesmo dia. As amostras do arroio foram coletadas em frasco de vidro âmbar limpo. As amostras engarrafadas foram transportadas em gelo ao laboratório imediatamente após a coleta. Para remover material suspenso, a amostra que recebe mais lançamentos de efluentes foi filtrada a vácuo através de filtro de papel cuja gramatura era de 80 g/m^2 seguido por filtro

de membrana de 0,45 µm. A amostra que recebe menos lançamentos de efluentes foi filtrada duas vezes com filtro de membrana de 0,45 µm. A filtração das amostras foi feita logo após a chegada no laboratório. Após a filtração, as amostras foram mantidas a 4°C em frasco de vidro âmbar totalmente preenchido, em posição vertical, até a extração que foi realizada num período máximo de 2 dias.

- Os limites de detecção e quantificação do método de análise de tetraciclina em água ambiental foi de 3,6 µg/l e 12,0 µg/l, respectivamente. Para o método de análise de sulfametoxazol e trimetoprima os limites foram de 0,3 µg/l e 1,1 µg/l, respectivamente, para sulfametoxazol e de 0,3 µg/l e 0,9 µg/l, respectivamente, para trimetoprima. No entanto, não é possível inferir se estes valores são satisfatórios em termos ambientais uma vez que não há legislação específica.
- Os parâmetros de validação parcial para ambas as metodologias foram satisfatórios.
- A análise da amostra real coletada do arroio Dilúvio não apresentou traços de tetraciclina, sulfametoxazol e trimetoprima nas metodologias utilizadas.
- Para futuras análises de tetraciclina, utilizando a metodologia proposta por este trabalho, sugere-se preservante (Na₂EDTA) na coleta de amostra real devido à instabilidade da solução aquosa. Comparativamente com outro método de detecção, de acordo com os artigos 60 e 62, que utilizou CLAE-EM/EM na análise de TC, a amostra foi coletada, filtrada e estocada a 4°C até extração, dentro de dois dias. Somente anterior à extração, a amostra foi preparada pela adição de EDTA e, após análise, detectou-se TC nos efluentes da ETA. No entanto, o método de detecção destes artigos é diferente do proposto por este trabalho.
- Sugere-se uma validação na coleta, na técnica de amostragem, no tempo de armazenamento e na preservação das amostras reais.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bila, D.M.; Dezotti, M.; *Quim. Nova* **2003**, 26, 523.
2. Lindsey, M.E.; Meyer, M.; Thurman, E.M.; *Anal. Chem.* **2001**, 73, 4640.
3. Renew, J.E.; Huang, C-; *J. of Chromatogr. A* **2004**, 1042, 113.
4. Hirsch, R.; Ternes, T.A.; Haberer, K.; Mehlich, A.; Ballwanz, F.; Kratz, K-; *J. of Chromatogr. A* **1998**, 815, 213.
5. Nozal, L.; Arce, L.; Simonet, B.M.; Ríos, A.; Valcárcel, M.; *Anal. Chim. Acta* **2004**, 517, 89.
6. Oka, H.; Ito, Y.; Matsumoto, H.; *J. of Chromatogr. A* **2000**, 882, 109.
7. Schenck, F.J.; Callery, P.S.; *J. of Chromatogr. A* **1998**, 812, 99.
8. Chen, Y.; Lin, C.; *J. of Chromatogr. A* **1998**, 802, 95.
9. Zhou, J.; Gerhardt, G.C.; Baranski, A.; Cassidy, R.; *J. of Chromatogr. A* **1999**, 839, 193.
10. Zhu, J.; Snow, D.D.; Cassada, D.A.; Monson, S.J.; Spalding, R.F.; *J. of Chromatogr. A* **2001**, 928, 177.
11. Cahill, J.D.; Furlong, E.T.; Burkhardt, M.R.; Kolpin, D.; Anderson, L.G.; *J. of Chromatogr. A* **2004**, 1041, 171.
12. Hirsch, R.; Ternes, T.; Haberer, K.; Kratz, K.; *Sci. Total Environ.* **1999**, 225, 109.
13. Ternes, T.a.; *Trends Anal Chem.* **2001**, 20, 419.
14. Farré, M.; Ferrer, I.; Ginebreda, A.; Figueras, M.; Olivella, L.; Tirapu, L.; Vilanova, M.; Barceló, D.; *J. of Chromatogr. A* **2001**, 938, 187.
15. Queiroz, S.C.N.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.F; *Quim. Nova* **2001**, 24, 68.
16. Geller, A.M.; Dissertação de Mestrado – *Preparação de sílica organofuncionalizada à base de zircônia e estudos de adsorção de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e pesticidas organoclorados* – PGQ – UFRGS, **2003**.
17. Daughton, C.G.; Ternes, T.A.; *Environ. Health Perspectives* **1999**, 107, 907.
18. Sørensen, B.H.; Nielsen, S.N.; Lanzky, P.F.; Ingerslev, F.; Lützhof, H.C.H.; Jørgensen, S.E.; *Chemosphere*, **1998**, 36, 357.
19. Cleuvers, M.; *Toxicology Letters* **2003**, 142, 185.
20. Stumpf, M.; Ternes, T.A.; Wilken, R.; Rodrigues, S. V.; Baumann, W.; *Sci. Total Environ.* **1999**, 225, 135.

21. Alda, M.J.L.; Díaz-Cruz, S.; Petrovic, M.; Baeceló, D.; *Water Pollution: Emerging Organic Pollution in Waste Waters and Sludge*; Springer-Verlag Heidelberg: Barcelona, **2004**, p181.
22. Williams, D.A.; Lemke, T.L.; *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*; 5^a ed., Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, Baltimore, New York, London, Bueno Aires, Hong Kong, Sydney, Tokyo, **1974**, p 857.
23. Gilman, A. G.; Goodman, L. S.; Gilman, A.; *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*; Guanabara Koogan S.A.: Rio de Janeiro, **1983**, p 979.
24. Hartig, C.; Storm, T.; Jekel, M.; *J. of Chromatogr. A* **1999**, 854, 163.
25. Reverté, S.; Borrull, F.; Pocurull, E.; Marcé, R.M.; *J. of Chromatogr. A* **2003**, 1010, 225.
26. Ohlsen, K.; Ternes, T.; Werner, G.; Wallner, U.; Löffler, D.; Ziebuhr, W.; Witte, W.; Hacker, J.; *Environ. Microbiol.* **2003**, 5(8), 711.
27. Pizzolato, T.M.; Gessler, T.; Adams, M.M.; Peralba, M.C.R.; Santos, J.H.Z.; no prelo.
28. Fontanals, N.; Galià, M.; Marcé, M.; Borrull, F.; *Chromatographia* **2004**, 60, 511.
29. Freitas, L. de L.; de Luca, M.A.; Moura, S.F.; Silveira, F.; Pizzolato, T.M.; Honaiser, N.P.; no prelo.
30. USP. The United States Pharmacopeia, 28^o ed., Rockville: United States Pharmacopeial Convention, **2005**.
31. Ribani, M.; Bottoli, C.B.G.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.F.; Melo, L.F.C.; *Quim. Nova* **2004**, 27, 771.
32. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada N^o 899 de 29 de maio de **2003**. Dispõem sobre *Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos*. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/legis>>. Acesso em julho de 2005.
33. Shabir, G.A.; *J. of Chromatogr. A* **2003**, 987, 57.
34. Barceló, D.; *Trends in Analytical Chemistry* **2003**, 22, editorial n.10.
35. BrandŠteterová, E.; Kubalec, P.; Bovanová, L.; Simko, P.; Bednáríková, A.; MacháčKová, L.; *Z Lebensm Unters Forsch A* **1997**, 205, 311.
36. Furusawa, N.; *J. of Chromatogr. A* **1999**, 839, 247.
37. Heller, D. N.; Ngoh, M. A.; Donoghue, D.; Podhorniak, L.; Righter, H.; Thomas, M. H.; *J. of Chromatogr. B* **2002**, 774, 39.

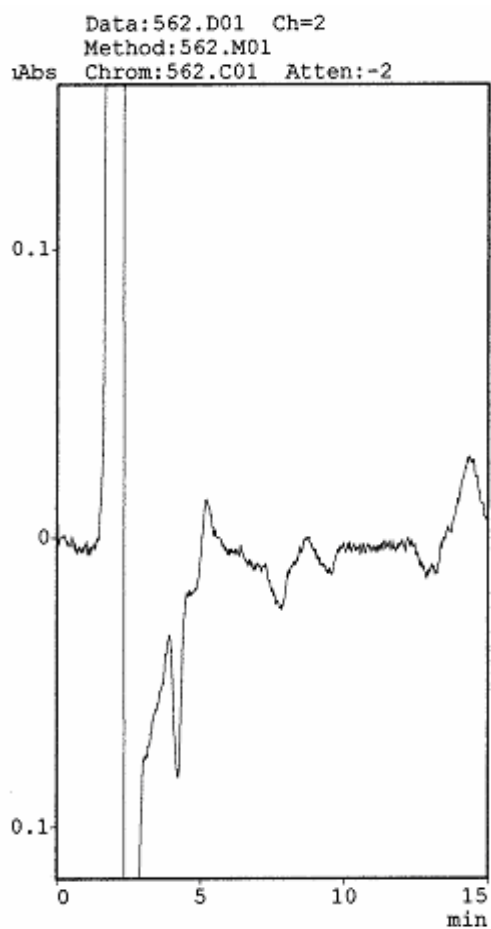
38. Furusawa, N.; *Talanta* **2003**, 59, 155.
39. Castellari, M.; García-Regueiro, J. A.; *Chromatographia* **2003**, 58, 789.
40. Cinquina, A. L.; Longo, F.; Anastasi, G.; Giannetti, L.; Cozzani, R.; *J. of Chromatogr. A* **2003**, 987, 227.
41. Blackwell, P. A.; Lützhøft, H. H.; Ma, H.-.; Halling-Sørensen, B.; Boxall, A. B. A.; Kay, P.; *Talanta* **2004**, 64, 1058.
42. Pecorelli, I.; Bibi, R.; Fioroni, L.; Galarini, R.; *J. of Chromatogr. A* **2004**, 1032, 23.
43. Viñas, P.; Balsalobre, N.; López-Erroz, C.; Hernández-Córdoba, M.; *J. of Chromatogr. A* **2004**, 1022, 125.
44. Rudek, M. A.; Hartke, C.; Zabelina, Y.; Zhao, M.; New, P.; Baker, S. D.; *J. of Pharm. and Biomed. Analysis* **2005**, 37, 751.
45. Sanderson, H.; Ingerslev, F.; Brain, R. A.; Halling-Sørensen, B.; Bestari, J. K.; Wilson, C. J.; Johnson, D. J.; Solomon, K. R.; *Chemosphere* **2005**, 60, 619.
46. Himmelsbach, M.; Buchberger, W.; *Microchim Acta* **2005**, 151, 67.
47. Pena, A.; Pelantova, N.; Lino, C. M.; Silveira, M. I. N.; Solich, P.; *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 3784.
48. Andersen, W. C.; Roybal, J. E.; Gonzales, S. A.; Turnipseed, S. B.; Pfenning, A. P.; Kuck, L. R.; *Anal. Chim. Acta* **2005**, 529, 145.
49. Babić, S.; Ašperger, D.; Mutavdžić, D.; Horvat, A. J. M.; Kaštelan-Macan, M.; *Talanta* **2006**, 70, 732.
50. Fang, G.-.; He, J.-.; Wang, S.; *J. of Chromatogr. A* **2006**, 1127, 12.
51. Valverde, R. S.; García, M. D. G.; Galera, M. M.; Goicoechea, H. C.; *Anal. Chim. Acta* **2006**, 562, 85.
52. Zoyou, A.; Vasiliadou, C.; *Chemosphere* **2006**, 64, 307.
53. Malintan, N. T.; Mohd, M. A.; *J. of Chromatogr. A* **2006**, 1127, 154.
54. Anderson, C. R.; Rupp, H. S., Wu, W.-.; *J. of Chromatogr. A* **2005**, 1075, 23.
55. RENAME – Relação Nacional de medicamentos Essenciais. Disponível em: <http://w.w.w.anvisa.gov.br/medacamentos/essencial.htm>. Acesso em julho de 2007.
56. Petrović, M.; Hernando, M.D.; Díaz-Cruz, M., S.; Barceló, D.; *J. of Chromatogr. A* **2005**, 1067, 1.
57. Göbel, A.; Thomsen, A.; Mcardell, C., S.; Joss, A.; Giger, W.; *Environ. Sci. Technol.* **2005**, 39, 3981.

58. Hamscher, G.; Sczesny, S.; Höper, H.; Nau, H.; *Anal. Chem.* **2002**, 74, 1509.
59. Cunningham, V. L.; Buzby, M.; Hutchinson, T.; Mastrocco, F.; Parke, N.; Roden, N.; *Environ. Sci. Technol.* **2006**, 40, 3456.
60. Yang, S.; Cha, J.; Carlson, K.; *J. of Chromatogr. A* **2005**, 1097, 40.
61. Blackwell, P. A.; Lützhøft, H. H.; Ma, H.; Halling-Sørensen, B.; Boxall, A. B. A.; Kay, P.; *J. of Chromatogr. A* **2004**, 1045, 111.
62. Miao, X.; Bishay, F.; Chen, M.; Metcalfe, C., D.; *Environ. Sci. Technol.* **2004**, 38, 3533.
63. Batt, A. L.; Aga, D.; *Anal. Chem.* **2005**, 77, 2940.
64. Batt, A. L.; Bruce, I. B.; Aga, D. S.; *Environmental Pollution* **2006**, 142, 295.
65. Granados, M.; Encabo, M.; Compañó, R.; Prat, M. D.; *Chromatographia* **2005**, 61, 471.
66. Castiglioni, S.; Bagnati, R.; Calamari, D.; Fanelli, R.; Zuccato, E.; *J. of Chromatogr. A* **2005**, 1092, 206.
67. Reverté, S.; Borrull, F.; Pocurull, E.; Marcé, R. M.; *J. of Chromatogr. A* **2003**, 1010, 225.
68. Stoob, K.; Singer, H. P.; Goetz, C. W.; Ruff, M.; Mueller, S. R.; *J. of Chromatogr. A* **2005**, 1097, 138.
69. Göbel, A.; McArdell, C. S.; Suter, M. J. -F.; Giger, W.; *Anal. Chem.* **2004**, 76, 4756.
70. Lindberg, R. H.; Wennberg, P.; Johansson, M. I.; Tysklind, M.; Andersson, B. A. V.; *Environ. Sci. Technol.* **2005**, 39, 3421.
71. Balakrishnan, V. K.; Terry, K. A.; Toito, J.; *J. of Chromatogr. A* **2006**, 1131, 1.
72. Gros, M.; Petrović, M.; Barceló, D.; *Talanta* **2006**, 70, 678.
73. Sacher, F.; Lange, F. T.; Brauch, H.; Blankenhorn, I.; *J. of Chromatogr. A* **2001**, 938, 199.
74. Kim, S.; Eichhorn, P.; Jensen, J., N.; Weber, A., S.; Aga, D.; *Environ. Sci. Technol.* **2005**, 39, 5816.
75. Federal Drug Administration; *Guidance for Industry – Environmental Assessment of Human Drugs and Biologics Applications*, Revision 1; FDA Centre for Drug Evaluation and Research; Rockville, MD, **1998**. Disponível em: <<http://www.fda.gov/guidance/1730fnl.pdf>>. Acesso em março de 2007.

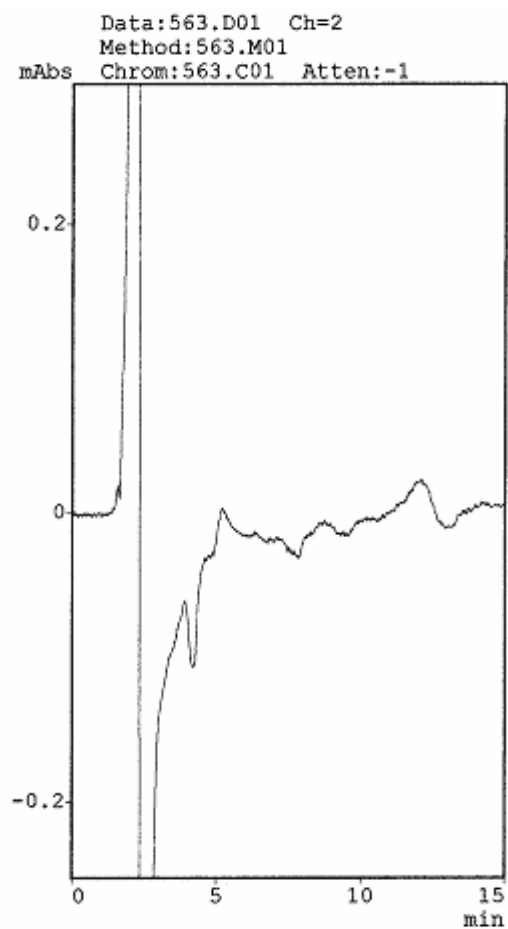
76. EMEA; European Medicines Agency; Londres, **2006**. Disponível em: <<http://w.w.w.emea.eu.int>>. Acesso em março de 2007.
77. Ogasawara, S; *Shokubai* **1976**, 18, 124.
78. Brito, N. M.; Junior, O. P. de A.; Polese, L.; Ribeiro, M. L.; *Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambient* **2003**, 13, 129.
79. Hubert, Ph.; Chiap, P.; Crommen, J.; Boulanger, B.; Chapuzet, E.; Mercier, N.; Bervoas-Martin, S.; Chevalier, P.; Grandjean, D.; Lagorce, P.; Lallier, M.; Laparra, M.C.; Laurentie, M.; Nivet, J.C.; *Anal. Chim. Acta* **1999**, 391, 135.
80. LabCompliance; *Validation of Analytical Methods: Review and Strategy*, Revision 2.01, julho de **2001**. Disponível em: < <http://www.labcompliance.com> >. Acesso em abril de 2007.
81. International Conference on Harmonisation (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*, Genebra. **2005**.
82. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), *Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis*, Budapest. **1999**.
83. BRASIL. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR ISO/IEC 17025:**2005**. *Requisitos Gerais para Competência de Laboratórios de Ensaio e Calibração*.
84. INMETRO, *Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos*, **2003** (DOQ - CGCRE – 008). Disponível em <<http://www.inmetro.gov.br>>. Acesso em julho de 2005.
85. AOAC Peer Verified Methods Program, *Manual on policies and procedures*, Arlington, VA, **1993**.
86. US FDA Technical Review Guidance: *Validation of Chromatographic Methods*, Center for Drug evaluation and research (CDER), Rockville, MD, **1993**.
87. Lanças, F. M.; *Extração em Fase Sólida (SPE)*; Editora Rima: São Carlos, SP, **2004**.
88. Ciola, R.; *Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho (HPLC)*; Editora Edgard Blücher LTDA: São Paulo, SP, **1998**.
89. Chui, Q. S. H.; Zucchini, R.R.; Lichtig, J.; *Quim. Nova* **2001**, 24, 374.
90. Hewlett Packard, *Seleção e operação de colunas para HPLC*.

91. Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; Glajch, J. L.; *Practical HPLC Method Development*; John Wiley: Nova Iorque, **1997**.
92. Araujo, M.B.C.; Tese de Doutorado – *Estudo de um método multiclasse/multirresíduo para a determinação de pesticidas em amostras aquosas* – PGQ – UFRGS, **2004**.
93. Tolls, J.; *Environ. Sci. Technol.* **2001**, 17, 3397.
94. Morandi, I. C.; Faria, C. M.; *A difícil recuperação de arroios em áreas urbanas – arroio Dilúvio – Porto Alegre – RS*; XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental.
95. Bendati, M. M.; Nogueira, L. A; Dalacosta, J. R. G.; *Revista ECOS* **1996**, 6, 32.
96. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada N° 306, de 07 de dezembro de **2004**. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviço de saúde. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/legis>>. Acesso em 12/07/05.
97. Brasil. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução N° 358, de 29 de abril de **2005**. Dispõe sobre o tratamento e a disposição final dos resíduos dos serviços de saúde e dá outras providências. Brasília, DF, 2005.
98. Rio Grande do Sul. Secretaria do Meio Ambiente. Conselho Estadual do Meio Ambiente - CONSEMA. Resolução N° 129, de 24 de novembro de **2006**. Dispõe sobre a definição de Critérios e Padrões de Emissão para Toxicidade de Efluentes Líquidos lançados em águas superficiais do Estado do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2006.
99. Santos dos J. H. Z.; Krug, C.; Rosa da, M. B.; Stedile, F. C.; Dupont, J.; Forte, M. de C.; *J. of Molec. Catalysis A: Chem.* **1999**, 139, 199.

7. ANEXOS

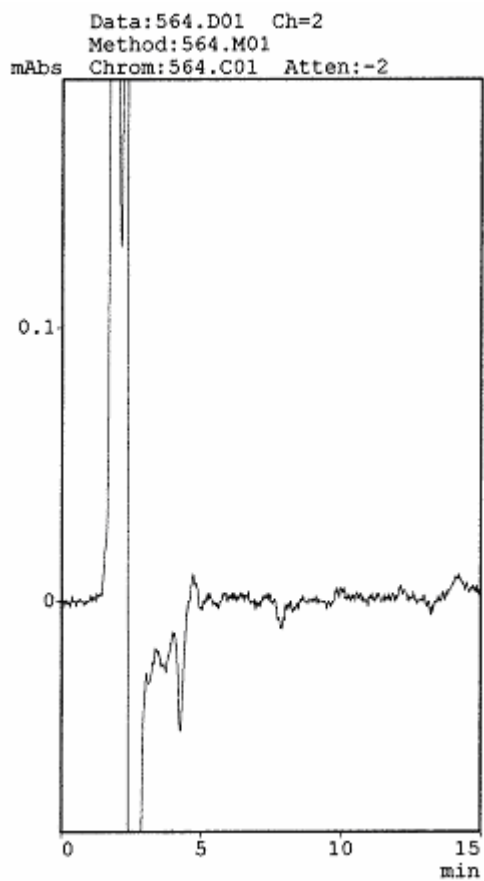


(A)

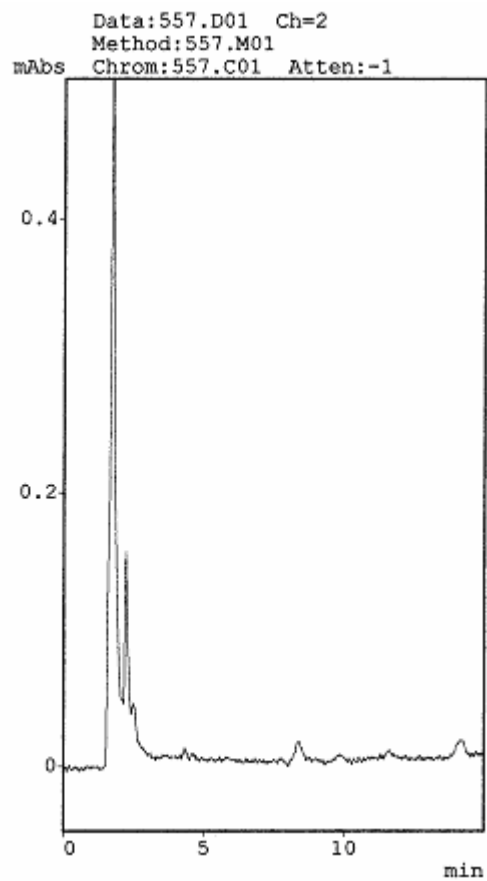


(B)

Figura 36: Cromatogramas da solução branco ACN 100% da sílica 110°C (A) e solução branco ACN 100% da sílica C18 (B).

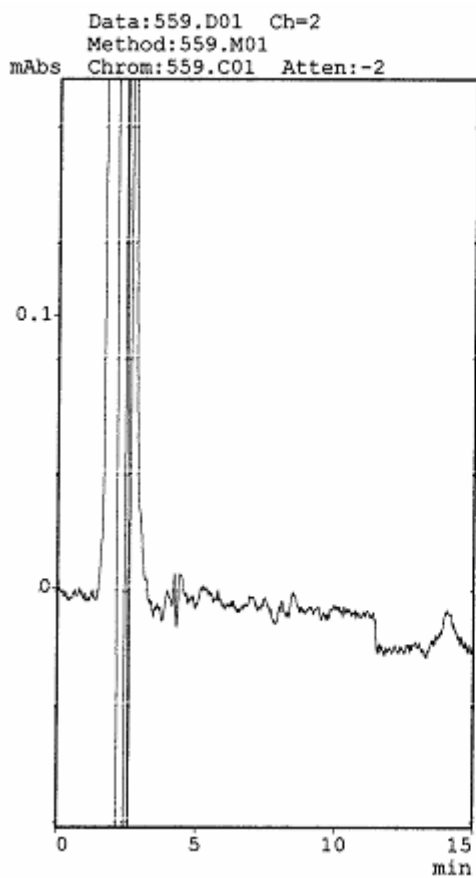


(A)

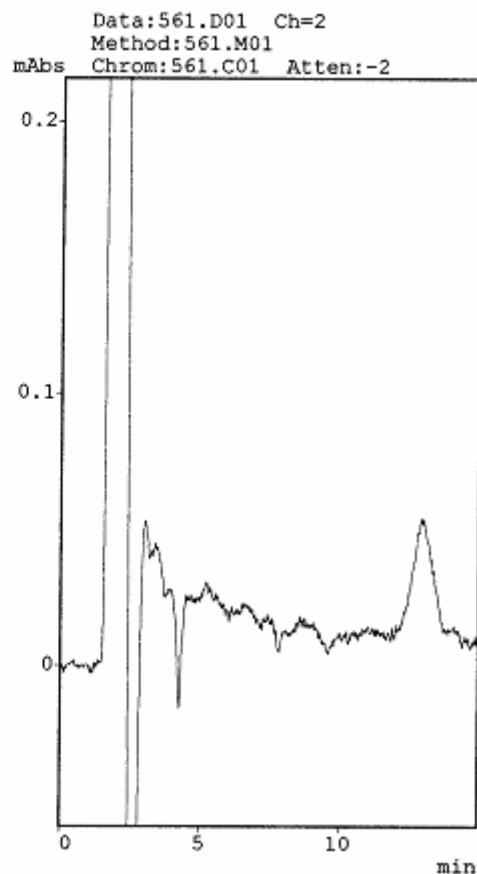


(B)

Figura 37: Cromatogramas da solução branco ACN 50% da sílica C18 (A) e solução branco FM da sílica 200°C (B).

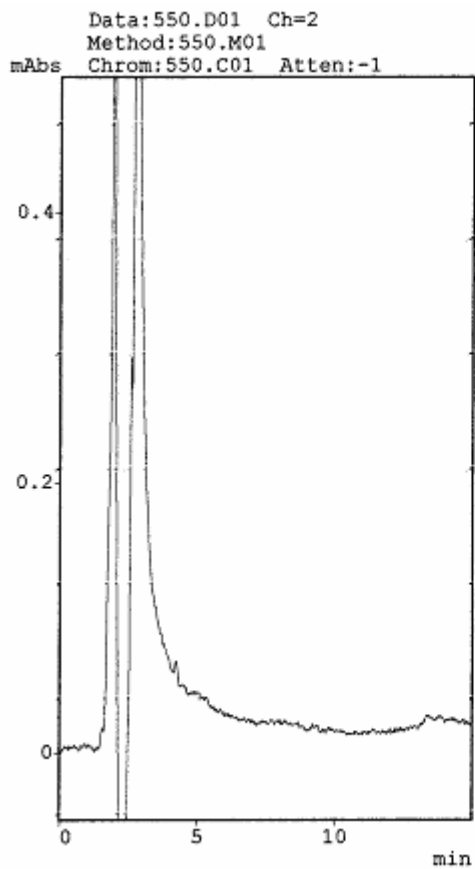


(A)

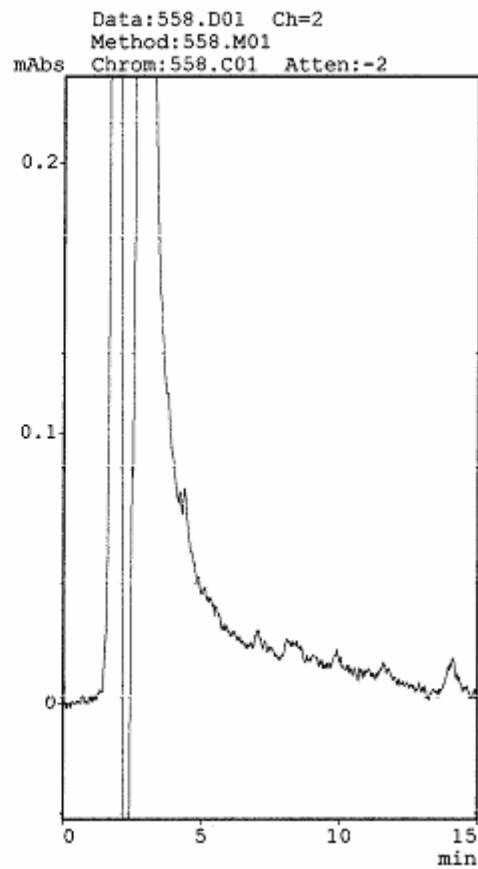


(B)

Figura 38: Cromatogramas da solução branco MeOH 50% da sílica 110°C (A) e solução branco ACN 50% da sílica 110°C (B).

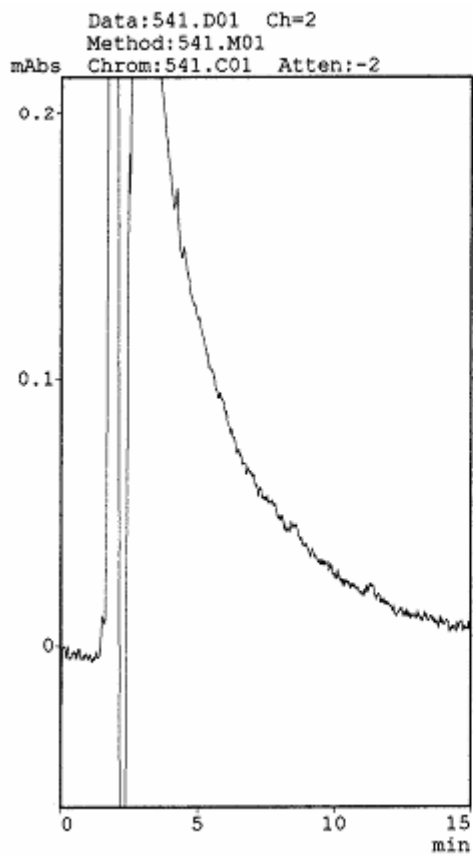


(A)

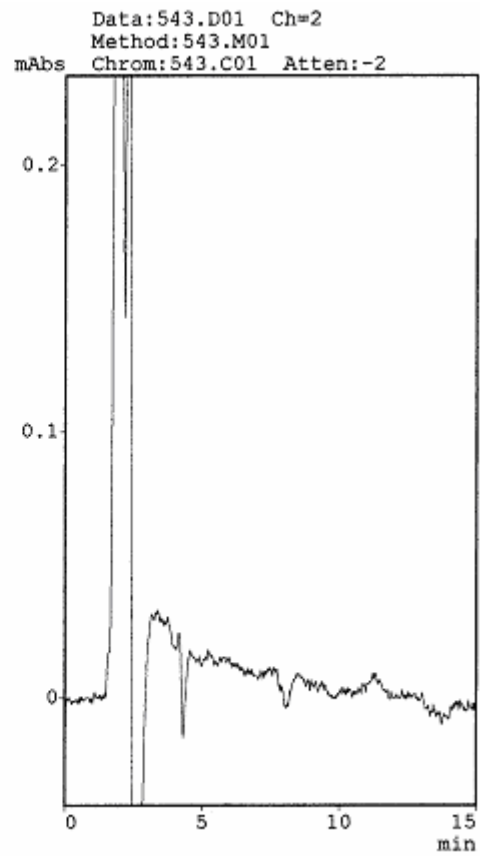


(B)

Figura 39: Cromatogramas da solução branco FM da sílica C18 (A) e solução branco FM da sílica 110°C (B).

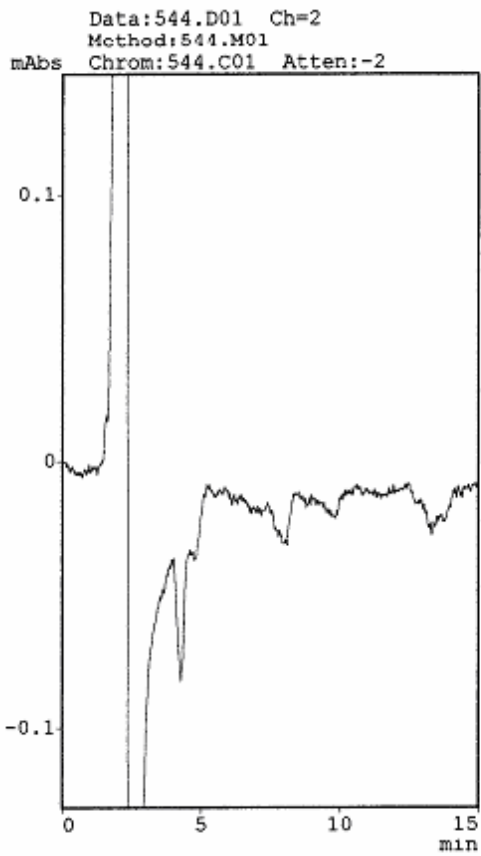


(A)

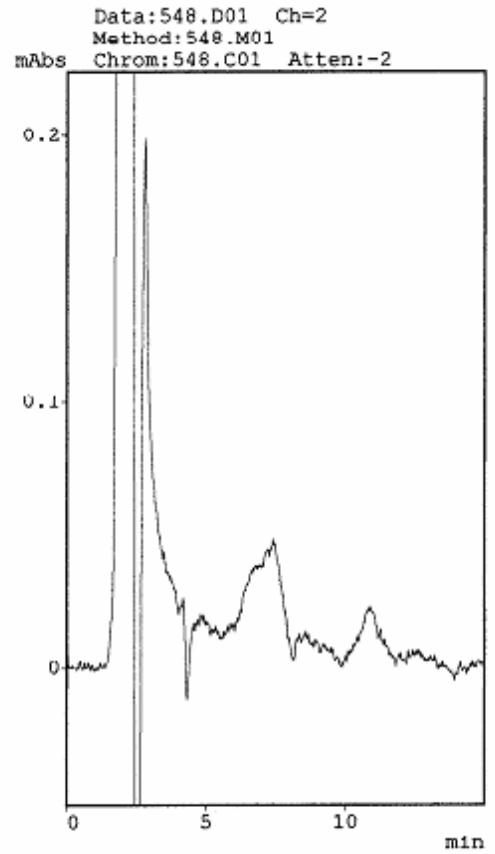


(B)

Figura 40: Cromatogramas da solução branco FM da sílica 450°C (A) e solução branco ACN 50% da sílica 200°C (B).



(A)



(B)

Figura 41: Cromatogramas da solução branco ACN 100% da sílica 450°C (A) e solução branco ACN 50% da sílica 450°C (B).