

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

Desenvolvimento e validação de um método analítico para determinação dos fármacos Diclofenaco, Nimesulida e Paracetamol em águas superficiais da cidade de São Carlos-SP

Aluno: Gustavo Henrique Lourenço Vicente

Orientadora: Prof^a Eny Maria Vieira

Gustavo Henrique Lourenço Vicente

Desenvolvimento e validação de um método analítico para determinação dos fármacos Diclofenaco, Nimesulida e Paracetamol em águas superficiais da cidade de São Carlos-SP

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo como parte dos quesitos para obtenção do título de Mestre em Química Analítica

Orientadora: Prof^a Dra. Eny Maria Vieira

São Carlos

2011

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus por tudo alcançado até hoje.

À professora Eny Maria Vieira pela orientação, amor, carinho e pelas palavras de incentivo durante todo o trabalho.

Aos meus pais Myrian e Edmilson que nunca deixaram de me apoiar nas minhas decisões e que da melhor forma possível estiveram sempre ao meu lado.

Às minhas irmãs Hinara, Aline e Rose e ao meu irmão Emerson que sempre estiveram me incentivando durante minha graduação e o mestrado.

Ao meu avô Isaac (*in memoriam*) que tenho certeza que de onde estiver está muito feliz com a conclusão deste trabalho.

À toda minha família que mesmo distante estavam sempre presentes na minha vida.

Aos meus amigos do LaQuAAE Dri, Lú, Dani, Dalbe, Guilherme, Eliane pela ajuda, discussões científicas, amizade e por inúmeras vezes trazer alegria ao laboratório.

Ao Raphael pela ajuda durante o trabalho e por inúmeras vezes solucionar algumas dúvidas sobre a cromatografia e o HPLC.

À Aninha pelo incentivo e carinho durante o mestrado e pelos momentos bons que passamos juntos.

Ao Thiaguinho, Zeh, Fabio, Diogo e Leo pelos anos que moramos juntos na república.

À Amandinha, Marina (Garça), Cíntia, Malu pela amizade durante os anos de graduação e mestrado.

Aos amigos do IQSC Barbieri, Jú, Leandro, Dai (agora na Federal), Eduardo, Dyovani, Murilo.

Aos amigos que fiz durante os 6 anos que morei em São Carlos e especialmente à minha turma da Química 05 da UFSCar pela convivência durante a graduação.

Ao meu amigo Rodrigo Flores pelos momentos de distração em São Paulo.

Aos motoristas Roberto e Sidnei que me ajudaram durante as coletas de água em São Carlos.

Ao técnico Julio Cesar Trofino da Hidráulica e Saneamento pelas medidas de oxigênio dissolvido.

Às secretárias da pós graduação do IQSC, Andréia e Silvia, pela ajuda durante todo o mestrado e pelo incentivo a não desistir do mestrado mesmo durante o período que estive sem bolsa.

À secretária Gislei (Gi) pela ajuda em todos os momentos e na realização da burocracia que devemos seguir.

Ao Instituto de Química de São Carlos (IQSC) pelo apoio e pela infraestrutura disponível para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Ao CNPq e a FAPES pelo auxílio financeiro.

À todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho e que não foram citados.

Obrigado !

“Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena
Acreditar no sonho que se tem
Ou que seus planos nunca vão dar certo
Ou que você nunca vai ser alguém
Tem gente que machuca os outros
Tem gente que não sabe amar
Mas eu sei que um dia a gente aprende
Se você quiser alguém em quem confiar
Confie em si mesmo
Quem acredita sempre alcança!”

Renato Russo

RESUMO

Resíduos de fármacos estão presentes em diversas matrizes ambientais e estudos focados na determinação destes têm ganhado grande importância nos últimos anos, devido ao aumento do consumo de medicamentos pela população. A questão do controle de resíduos de compostos farmacologicamente ativos no meio ambiente aquático foi reconhecida como uma das questões emergentes na Química Ambiental, e tem-se dado maior importância visto que os fármacos são encontrados em matrizes em estudos em concentrações de μgL^{-1} e ngL^{-1} . Nesta pesquisa estudou-se três fármacos anti-inflamatórios que são amplamente consumidos pela população: diclofenaco, nimesulida e paracetamol. O método analítico foi desenvolvido e validado para a determinação destes fármacos em amostras de águas superficiais da cidade de São Carlos (SP). Inicialmente foi feita a validação do método proposto segundo a Resolução DOQ-CGCRE-008 do INMETRO. Os limites de detecção, e de quantificação e inferior de quantificação do método para a determinação do diclofenaco, nimesulida e paracetamol, foram, respectivamente, 0,5; 1,1 e $1,1\mu\text{gL}^{-1}$. A linearidade, desvio-padrão relativo, exatidão e recuperação média para o diclofenaco foram, respectivamente, R de 0,99, 3,03%, 100,55% e 97,94%. Para a nimesulida, os valores de linearidade, desvio-padrão relativo, exatidão e recuperação, foram, R de 0,98, 2,43%, 101,46% e 100,67%. Já para o paracetamol obteve-se os seguintes valores para linearidade, desvio-padrão relativo, exatidão e recuperação, R de 0,99, 3,50%, 97,94% e 93,17%, respectivamente. Na segunda etapa deste estudo aplicou-se o método validado na análise de amostras de águas coletadas na cidade de São Carlos (SP). Para o método de extração utilizou-se a extração em fase sólida (SPE) e como técnica analítica utilizou-se o HPLC/DAD. Os resultados não indicaram a presença dos fármacos diclofenaco, nimesulida e paracetamol até o limite de detecção do método empregado

Palavras chaves: Fármacos, diclofenaco, nimesulida, paracetamol, SPE, HPLC

ABSTRACT

Residues of drugs are present in various environmental matrices and studies focused on the determination of these have gained in importance in recent years, due to increased drug consumption by the population. The issue of control of residues of pharmacologically active compounds in the aquatic environment was recognized as one of the emerging issues in environmental chemistry, and has given greater importance since the drugs are found in studies in matrices at concentrations μgL^{-1} and ngL^{-1} . In this study was studied three drugs that are widely consumed by the population: diclofenac, nimesulide and acetaminophen. The analytical method was developed for the determination of these drugs in surface water samples from São Carlos (SP). Initially, made a validation of the method proposed second resolution DOQ-008-CGCRE INMETRO. The detection, quantification and lower quantification limits of method for determining of diclofenac, nimesulide and paracetamol were 0.5, 1.1 and 1.1 μgL^{-1} , respectively. The linearity, relative standard , accuracy and average recovery of the method for diclofenac were, respectively, R equal to 0.99, 3.03%, 100.55% and 97.94%. For nimesulide, the values of linearity, relative standard, accuracy and recovery were R equal to 0.98, and 2.43%, 101.46% and 100.67%. For acetaminophen obtained the following values for linearity, relative standard, accuracy and recovery, R equal to 0.99, 3.50%, 97.94% and 93.17% respectively. In the second stage of the study applied the validated method in the analysis of water samples collected in the São Carlos (SP). For extracting the drugs, SPE cartridges were used followed by HPLC / DAD. The results indicate the absence of the studied drugs diclofenac, nimesulide and acetaminophen down to the detection limits of the method employed.

Keywords: Drugs, diclofenac, nimesulide, acetaminophen, SPE, HPLC

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rotas de destino final de fármacos no meio ambiente.....	14
Figura 2. Fluxograma do procedimento de extração em fase sólida – SPE.....	32
Figura 3. Localização dos pontos de coleta na cidade de São Carlos.....	35
Figura 4. Ponto de coleta (1) - Rio Tijuco Preto.....	37
Figura 5 . Ponto de coleta (2) - Rio Monjolinho.....	37
Figura 6. Ponto de coleta (3) - Rio Santa Maria do Leme.....	38
Figura 7. Ponto de coleta (4) - Rio Gregório.....	38
Figura 8. Ponto de coleta (5) – Ribeirão da Água Fria.....	39
Figura 9. Espectro de UV do diclofenaco.....	40
Figura 10. Espectro de UV da nimesulida.....	41
Figura 11. Espectro de UV do paracetamol.....	42
Figura 12. Sobreposição dos espectros dos fármacos diclofenaco, nimesulida e paracetamol.....	43
Figura 13. Espectro de comparação entre os comprimentos de onda de 248nm e 280nm para o paracetamol, nimesulida e diclofenaco.....	44
Figura 14. Cromatograma da solução-padrão mista dos fármacos, na concentração $100 \mu\text{g L}^{-1}$ para cada composto (FM MeOH:H ₂ O, em gradiente, fluxo de 1 mL min^{-1} , volume de injeção de $20 \mu\text{L}$, $\lambda = 280 \text{ nm}$, temp. = $26 \text{ }^\circ\text{C}$).....	45
Figura 15. Seletividade do método para análise dos fármacos diclofenaco, nimesulida e paracetamol (tempo de retenção paracetamol = $9,41 \text{ min.}$, nimesulida = $13,64 \text{ min.}$ e paracetamol = $14,74 \text{ min.}$).....	47
Figura 16. Linearidade do método para análise do diclofenaco de $0,5$ a $1,5 \mu\text{g.L}^{-1}$...	50
Figura 17. Linearidade do método para análise do diclofenaco de 10 a $50 \mu\text{g.L}^{-1}$	50
Figura 18. Linearidade do método para análise da nimesulida de $0,2$ a $1,2 \mu\text{g.L}^{-1}$	51
Figura 19. Linearidade do método para análise da nimesulida de 10 a $50 \mu\text{g.L}^{-1}$	51
Figura 20. Linearidade do método para análise do paracetamol de $0,4$ a $2,4 \mu\text{g.L}^{-1}$..	52
Figura 21. Linearidade do método para análise do paracetamol de 15 a $75 \mu\text{g.L}^{-1}$	52
Figura 22. Amostra de água da coleta de março fortificada com diclofenaco.....	60
Figura 23. Amostra de água da coleta de março fortificada com nimesulida.....	60
Figura 24. Amostra de água da coleta de março fortificada com paracetamol.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ocorrência de fármacos no meio ambiente.....	17
Tabela 2. Propriedades físicas e químicas dos fármacos estudados.....	20
Tabela 3. Programação utilizada na eluição no modo gradiente	30
Tabela 4. Coordenadas dos pontos dos pontos de coleta dos córregos que cortam a cidade de São Carlos.....	35
Tabela 5. Limites de detecção e de quantificação para o método proposto na análise dos fármacos em água; volume de injeção 20 μ L.....	48
Tabela 6. Limites inferiores de quantificação para o método proposto na análise dos fármacos em água; volume de injeção 20 μ L.....	49
Tabela 7. Precisão e Exatidão do método no primeiro dia de análise do diclofenaco.....	53
Tabela 8. Precisão e Exatidão do método no segundo dia de análise do diclofenaco.....	54
Tabela 9. Precisão e Exatidão do método no primeiro dia de análise do nimesulida.....	54
Tabela 10. Precisão e Exatidão do método no segundo dia de análise do nimesulida.....	54
Tabela 11. Precisão e Exatidão do método no primeiro dia de análise do paracetamol.....	54
Tabela 12. Precisão e Exatidão do método no segundo dia de análise do paracetamol.....	54
Tabela 13. Precisão e Exatidão interdias do método para os fármacos.....	55
Tabela 14. Recuperação do método SPE para o diclofenaco.....	56
Tabela 15. Recuperação do método SPE para o nimesulida.....	56
Tabela 16. Recuperação do método SPE para o paracetamol.....	56
Tabela 17. Índice pluviométrico dos meses de Agosto e Setembro de 2010.....	57
Tabela 18. Índice pluviométrico dos meses de Fevereiro e Março de 2011.....	57
Tabela 19. Oxigênio dissolvido, temperatura e pH das amostras coletadas no mês de Setembro de 2010.....	58
Tabela 20. Oxigênio dissolvido, temperatura e pH das amostras coletadas no mês de Março de 2011.....	58

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	12
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	13
3. OBJETIVOS.....	28
3.1. Objetivo Geral.....	28
3.2. Objetivos Específicos.....	28
4. EXPERIMENTAL.....	29
4.1. Metodologia.....	29
4.1.1. Padrão Analítico.....	29
4.1.2. Comparação entre dois métodos de extração.....	30
4.1.3. Escolha do cartucho e condições de extração em fase sólida (SPE).....	31
4.1.4. Validação do método analítico para determinação dos fármacos diclofenaco, nimesulida e paracetamol.....	32
4.1.5. Área de estudo.....	34
4.1.6. Coleta e estocagem das amostras.....	36
4.1.7. Descarte dos resíduos gerados.....	39
5.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5.1. Condições cromatográficas para análise dos fármacos diclofenaco, nimesulida e paracetamol em efluentes domésticos da cidade de São Carlos- SP.....	40
5.2. Validação do método analítico para análise dos fármacos diclofenaco, nimesulida e paracetamol.....	45
5.2.1. Seletividade.....	46
5.2.2. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).....	47
5.2.3. Limite inferior de quantificação (LIQ).....	48
5.2.4. Linearidade.....	49
5.2.5. Precisão e exatidão.....	53
5.2.6. Recuperação.....	55
5.3. Análise das amostras das águas superficiais da cidade de São Carlos (SP).....	57
6. TRABALHOS FUTUROS.....	62
7. CONCLUSÃO.....	62
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

RESUMO

Resíduos de fármacos estão presentes em diversas matrizes ambientais e estudos focados na determinação destes têm ganhado grande importância nos últimos anos, devido ao aumento do consumo de medicamentos pela população. A questão do controle de resíduos de compostos farmacologicamente ativos no meio ambiente aquático foi reconhecida como uma das questões emergentes na Química Ambiental, e tem-se dado maior importância visto que os fármacos são encontrados em matrizes em estudos em concentrações de μgL^{-1} e ngL^{-1} . Nesta pesquisa estudou-se três fármacos anti-inflamatórios que são amplamente consumidos pela população: diclofenaco, nimesulida e paracetamol. O método analítico foi desenvolvido e validado para a determinação destes fármacos em amostras de águas superficiais da cidade de São Carlos (SP). Inicialmente foi feita a validação do método proposto segundo a Resolução DOQ-CGCRE-008 do INMETRO. Os limites de detecção, e de quantificação e inferior de quantificação do método para a determinação do diclofenaco, nimesulida e paracetamol, foram, respectivamente, 0,5; 1,1 e $1,1\mu\text{gL}^{-1}$. A linearidade, desvio-padrão relativo, exatidão e recuperação média para o diclofenaco foram, respectivamente, R de 0,99, 3,03%, 100,55% e 97,94%. Para a nimesulida, os valores de linearidade, desvio-padrão relativo, exatidão e recuperação, foram, R de 0,98, 2,43%, 101,46% e 100,67%. Já para o paracetamol obteve-se os seguintes valores para linearidade, desvio-padrão relativo, exatidão e recuperação, R de 0,99, 3,50%, 97,94% e 93,17%, respectivamente. Na segunda etapa deste estudo aplicou-se o método validado na análise de amostras de águas coletadas na cidade de São Carlos (SP). Para o método de extração utilizou-se a extração em fase sólida (SPE) e como técnica analítica utilizou-se o HPLC/DAD. Os resultados não indicaram a presença dos fármacos diclofenaco, nimesulida e paracetamol até o limite de detecção do método empregado

Palavras chaves: Fármacos, diclofenaco, nimesulida, paracetamol, SPE, HPLC

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A água é um recurso natural de enorme importância para os seres humanos, e por muitos anos foi considerado um recurso natural infinito, porém o uso indevido da água vem chamando a atenção para sua reutilização e o seu uso de forma consciente. A quantidade de água existente no planeta está dividida entre a atmosfera, o subsolo, os rios e os lagos, sendo que cerca de 97,5% desta água é salgada e está em oceanos e mares, 2,493% é doce, mas se encontra em geleiras ou em regiões subterrâneas (aqüíferos) de difícil acesso e 0,007% é doce e é encontrada em rios, lagos e na atmosfera, e é considerada de fácil acesso ao consumo humano¹.

A água é um recurso natural, estratégico e social, essencial à existência e bem-estar do homem e à manutenção dos ecossistemas do planeta. O acelerado crescimento populacional levou a fabricação e introdução de novos compostos químicos no meio ambiente que, até então os efeitos negativos causados aos seres humanos não haviam sido estudados¹. Dentre os compostos químicos introduzidos pode-se citar os fármacos, agroquímicos, etc.

Existem poucos estudos sobre os efeitos de fármacos à biota aquática, porém estudos vêm ganhando grande importância na área da química ambiental, já que são usados continuamente pela população. Além deste fato, o estudo de fármacos na água apresentou grande importância na comunidade científica a partir da década de 90, devido ao aumento do consumo e da produção.

A maioria dos fármacos é excretada pelos seres humanos após a administração e muitos destes podem ser considerados persistentes por serem introduzidos continuamente no meio ambiente, o que faz com que os resíduos de fármacos resistam à processos de tratamento de esgoto sanitário e água². Portanto é necessário o

desenvolvimento e validação de métodos analíticos confiáveis para a determinação de fármacos, afim de que tais métodos sejam amplamente utilizados no controle de qualidade de amostras ambientais, principalmente em águas superficiais que em grande parte dos casos são tratadas e reutilizadas por estações de tratamento de esgotos, e lançadas novamente no corpo hídrico das cidades.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Pesquisas sobre fármacos no meio ambiente tornou-se uma área de estudo crescente nos últimos anos, devido ao fato de eles ainda não estarem inseridos em legislações que regulamentam a qualidade da água quanto a presença de fármacos^{3,4}, e assim faz com que estes sejam candidatos a futuras legislações que vão depender do efeito que possam causar aos organismos aquáticos e à saúde humana³.

Estudos conduzidos por pesquisadores em várias partes do mundo sobre a ocorrência de antibióticos, hormônios, anestésicos, antidepressivos, antiinflamatórios dentre outros fármacos em esgoto sanitário, águas superficiais e sedimentos, mostram o quanto a presença de fármacos são prejudiciais a saúde humana, animal e de organismos aquáticos. Estudos estimam que cerca de 3000 diferentes compostos são usados como constituintes de produtos na medicina animal e humana, o que corresponde a um número elevado de moléculas de diferentes grupos e propriedades físicas e químicas e estruturais⁵⁻⁷.

Os fármacos são encontrados em matrizes sejam elas biológicas, como por exemplo, urina e plasma sangüíneo ou ambientais, como por exemplo, em águas superficiais, organismos aquáticos, esgoto sanitários entre outros⁶⁻⁸ A principal rota de entrada de fármacos no ambiente aquático em geral é por meio das estações de

tratamento de esgoto (ETEs) ou através do lançamento clandestino de esgoto sanitário nos rios. Quando o esgoto é transportado até uma ETE alguns compostos podem ser biodegradados, degradado parcialmente ou permanecerem inalterado ao longo do tempo podendo contaminar o meio ambiente^{2,9}.

A Figura 1 apresenta as possíveis rotas para o destino final de fármacos quando introduzidas no meio ambiente.

Como pode ser observada, a entrada principal dos fármacos no meio ambiente é feita após a aplicação do medicamento na medicina veterinária ou humana, que após a excreção através das fezes ou da urina são lançados no solo e posteriormente atingem as águas do subsolo e chegam até as estações de tratamento. Outra rota possível para os resíduos de fármacos é a utilização das águas superficiais nas estações de tratamento de esgotos, que por diversas vezes são contaminadas com lançamento clandestino de esgotos e acabam sendo contaminadas.

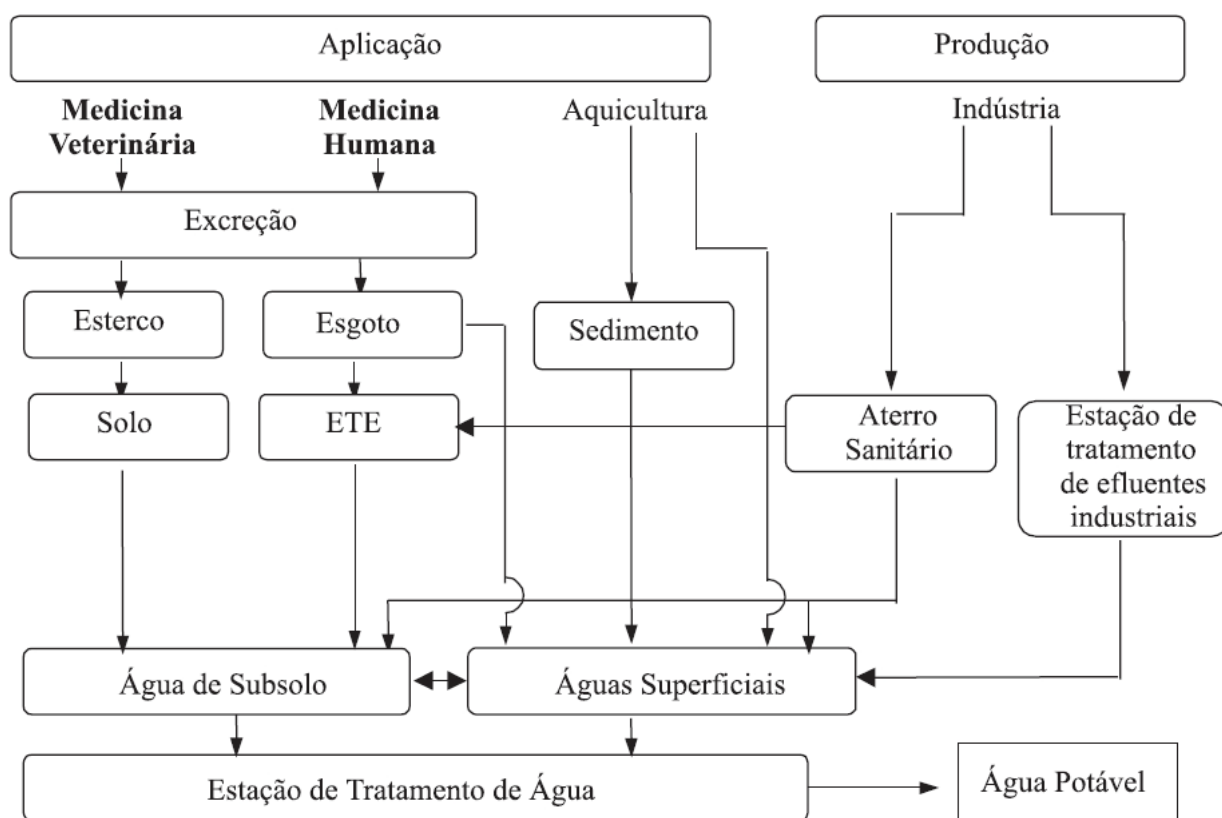


Figura 1 – Rotas de destino final de fármacos no meio ambiente (adaptada de BILA, 2003)².

Embora haja grande preocupação mundial em relação à presença de fármacos no meio ambiente, no Brasil há poucos dados na literatura sobre a ocorrência de substâncias farmacologicamente ativas em amostras ambientais.

O uso de medicamentos sem prescrição médica tem aumentado nos últimos anos no Brasil, isto faz com que o Brasil apareça entre os dez maiores mercados consumidores do mundo¹⁰. Em pesquisa feita pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), cerca de 50% dos medicamentos controlados são vendidos sem a exigência de prescrição médica¹⁰.

O paracetamol e o ácido acetilsalicílico são os dois analgésicos mais populares e os mais consumidos atualmente no mundo¹¹. A presença de fármacos no meio ambiente representa riscos ainda pouco conhecidos e no Brasil existem poucas normas que regulamentam sua presença em amostras ambientais, o que dificulta estabelecer valores limites aceitáveis e confiáveis de resíduos de fármacos¹¹.

Nos Estados Unidos, o órgão que regulamenta a presença de resíduos de fármacos em ambientes aquáticos é a Agência dos Estados Unidos para Administração de Alimentos e Drogas (USFDA). As regras seguidas são submetidas por meio de uma revisão ambiental requerida para novos fármacos e encaminhada ao FDA. Na Europa, há alguns anos existem normas para riscos ambientais decorrentes do uso descontrolado de fármacos. No ano de 2005 algumas mudanças foram feitas e novas normas foram disponibilizadas. A novidade dessas normas é a recomendação de testes de ecotoxicidade crônica e aguda, reconhecendo que a maioria dos compostos farmacêuticos ativos pode apresentar efeitos crônicos mesmo em baixas concentrações¹².

Segundo a Agência Européia para Produtos Medicinais (EMEA), caso a concentração do analito presente no meio ambiental esteja abaixo de $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$, este

provavelmente não é considerado um risco ambiental. Já para valores acima deste, deve ser feita uma análise do efeito causado pelo fármaco⁶.

Os fármacos são considerados o maior grupo de produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais (PPCP) que têm sido encontrados em ambientes aquáticos. O metabólito de antilipêmicos, ácido clofíbrico, foi o primeiro resíduo de fármaco a ser encontrado em esgotos sanitários de grandes cidades da Europa¹³.

Pesquisas feitas sobre o monitoramento de resíduos fármacos em efluentes de Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs) e em águas naturais em diversas cidades mostram concentração na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} , e estes são encontrados porque são desenvolvidos para serem persistentes a fim de manter suas propriedades químicas e depois de certo tempo serem mantidas suas características terapêuticas. Segundo Mulroy entre 50 e 90% da dose de um fármaco aplicada a um paciente é excretada de forma inalterada e portanto persiste nas vias de descarte. Estudos sobre a presença de fármacos no ambiente aquático têm sido feitos em diversos países, dentre os quais, Alemanha, Austrália, Canadá, Croácia, Itália, Espanha e Estados Unidos^{5-7, 14}. As principais matrizes estudadas são efluentes e afluentes de estação de esgoto sanitário^{8,15-17} e água superficial^{5,8,16,18}, sendo também encontrados alguns fármacos em baixas concentrações em água potável^{17,19}, água do mar²⁰, estuários²¹ e sedimentos de rios²².

Muller et al em 2002²³, em estudo feito na Holanda determinaram os limites toxicológicos para alguns fármacos, com base em 10% da dose máxima diária aceitável ou para o limite máximo permitido para resíduo de fármacos de uso veterinário em leite, considerando 60 kg o peso médio de uma pessoa. Neste estudo²³ foram estabelecidos os seguintes limites de quantificação para fármacos em água potável: paracetamol, $150 \mu\text{g L}^{-1}$; sulfametoxazol, $75 \mu\text{g L}^{-1}$; carbamazepina, $50 \mu\text{g L}^{-1}$; metoprolol, $50 \mu\text{g L}^{-1}$; diclofenaco, $7,5 \mu\text{g L}^{-1}$; bisoprolol, $1 \mu\text{g L}^{-1}$; bezafibrate, $35 \mu\text{g L}^{-1}$; eritromicina, $15 \mu\text{g L}^{-1}$; fenofibrate,

50 µg L⁻¹; ácido acetil salicílico, 25 µg L⁻¹; ibuprofeno, 150 µg L⁻¹; ácido clofibrico, 30 µg L⁻¹; cloranfenicol, 25 µg L⁻¹ ²³.

A Tabela 1 apresenta um resumo com algumas pesquisas envolvendo a ocorrência de fármacos em amostras ambientais.

Tabela 1 – Ocorrência de fármacos no meio ambiente.

Fármaco	Concentração (µg L ⁻¹)	Matriz de estudo	País Autor Ano
Diclofenaco Ibuprofeno Naproxeno	0,5-3,5	água superficial e água tratada	Polônia ZGOŁA-GRZES'KOWIAK et al 2010 ³⁰
Diclofenaco Ibuprofeno	4-10 5-10	águas superficiais e água tratada	Luxemburgo PAILLER, J.-Y. A. K et al 2009 ²⁹
Ibuprofeno Paracetamol Diclofenaco Carbamazepina	34-168 0,24-28 29-246 <LOQ-4,3 0,2-3,6 0,14-2,2 0,12-0,31 0,11-0,23	afluente de ETE efluente de ETE afluente de ETE efluente de ETE afluente de ETE efluente de ETE afluente de ETE efluente de ETE	Espanha GÓMEZ, M. J. et al 2007 ²⁴
Ibuprofeno Paracetamol Cafeína Diclofenaco Carbamazepina	máx 4,57 máx 3,13 máx 83,2 máx 0,510 máx 0,008	efluente hospitalar	Espanha GÓMEZ, M. J. et al 2007 ²⁵
Ibuprofeno, Diclofenaco e Ác. mefenâmico	0,150- 2	efluente de tratamento de esgoto	Suíça TAUXE-WUERSCH, A. et al 2005 ²⁶
Paracetamol Carbamazepina Diazepam Diclofenaco Ibuprofeno Naproxeno	máx 23,5 máx 0,145 máx 0,274 máx 0,0023 máx 0,045 máx 0,041 máx 0,053 máx 17,2	afluente de ETE efluente de ETE afluente de ETE efluente de ETE efluente de ETE efluente de ETE afluente de ETE	Coréia, Canadá e E.U.A. TRENHOLM, R. A. et al 2006 ²⁷
Paracetamol Diclofenaco	< 0,05 <0,02-0,46	efluente de esgoto água de superfície	Reino Unido HILTON, M. J. et al 2003 ⁸
Fluoxetina Paracetamol Lincomicina Sulfatometaxazol	máx 0,012 >10 máx 0,73 máx 1,9	água de córrego	E.U.A. NEBOT, C. et 2002 ²⁸

Em 1997 no estado do Rio de Janeiro Ternes et al¹ desenvolveram uma pesquisa na busca pela determinação de resíduos de fármacos no meio ambiente, neste estudo foram encontradas concentrações de 0,1 a 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ de alguns fármacos presentes em efluentes de ETE. Foi encontrada indometacina na concentração de 0,95 $\mu\text{g L}^{-1}$; cofibrato à concentração de 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e bezofibrato de 1,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ ¹⁶.

A qualidade da água da cidade de Campinas, no ano de 2006, foi alvo de estudo afim de investigar a presença de interferentes endócrinos, e produtos farmacêuticos e de higiene pessoal. Foram encontrados neste estudo o dietil na concentração de 1 a 106 $\mu\text{g L}^{-1}$, dibutilftalato na concentração de 0,2-3 $\mu\text{g L}^{-1}$, estradiol de 1,8-6 $\mu\text{g L}^{-1}$, etinilestradiol de 1-3,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, progesterona de 1,2-4 $\mu\text{g L}^{-1}$, bisfenol A de 2-64 $\mu\text{g L}^{-1}$, colesterol de 9-301 $\mu\text{g L}^{-1}$ e coprostanol de 5-41 $\mu\text{g L}^{-1}$. Quando foram analisadas amostras de esgoto bruto e esgoto tratado foi encontrado diclofenaco na concentração de 2,87 $\mu\text{g L}^{-1}$ em esgoto bruto e de 1,78 $\mu\text{g L}^{-1}$ em esgoto tratado¹⁹.

Pailler et al em 2009²⁹ na cidade de Belvaux em Luxemburgo, fez um estudo sobre a ocorrência de alguns fármacos e hormônios em amostras de águas superficiais de alguns rios da cidade. Foram encontrados após as análises feitas níveis de diclofenaco entre 4-10 $\mu\text{g L}^{-1}$ em água tratada de rios da cidade.

Outro estudo feito em 2010 por Zgoła-Grzes'kowiak et al³⁰ em que pesquisadores tinham objetivo de comparar níveis de concentração de alguns fármacos em água tratada e água de rios de algumas cidades da Polônia. Os autores encontraram alguns fármacos como diclofenaco, ibuprofeno e naproxeno à níveis de concentração que variam de 3,5 a 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, sendo a concentração mais baixa desses fármacos em água coletada após o tratamento para o consumo humano.

Os fármacos constituem uma importante classe de compostos, e são substâncias químicas com constituição definida e que podem ser utilizadas na prevenção, cura e até

mesmo como agente de diagnóstico de doenças. Esta classe de compostos pode ser usada afim de fornecer substâncias em baixa concentração ao organismo humano, como as vitaminas, sais minerais e hormônios¹.

Os fármacos estão divididos em classes diferentes de acordo com a ação no organismo humano e a estrutura molecular que apresentam. Por exemplo, existe a classe dos anti-hipertensivos, um exemplo desses é a hidroclorotiazida, agentes antiinflamatórios não-esteróides (ácido acetil salicílico, paracetamol, diclofenaco, ibuprofeno e fenoprofeno, nimesulida), antiepilépticos (arbamazepina), ansiolíticos (diazepam) e anti-histamínicos (loratadina)^{16, 10, 31}.

Os antiinflamatórios não esteróides (AINEs) é a classe de fármacos mais prescrita pelos médicos, esta por sua vez apresenta três tipos de efeito: antiinflamatório, analgésico e antipirético. Esta classe de medicamentos também lidera estudos feitos para determinação em amostras ambientais principalmente em águas já que são solúveis em água além de permanecerem inalteradas após o tratamento de esgoto¹⁷. Desta classe de compostos destacam-se três fármacos: o diclofenaco sódico (acetato de 3-(2,6 dicloroanilino) fenil sódico), paracetamol (N-(4-hidroxifenil) etanamida) e nimesulida (4-nitro-2-fenoxi-trifluorometano-sulfonamida).

O diclofenaco sódico é um antiinflamatório não esteróide derivado do ácido fenilacético, e é um eficaz analgésico, antiinflamatório e antipirético, sua fórmula molecular é $C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$ e massa molecular de $318,0 \text{ g mol}^{-1}$. O mecanismo de ação deste antiinflamatório se dá pela inibição da biossíntese da prostaglandina sintase (ciclo-oxigenase), ou seja, a não produção desta proteína atua aliviando sintomas da inflamação e da dor³².

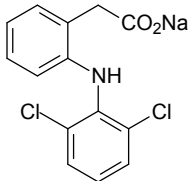
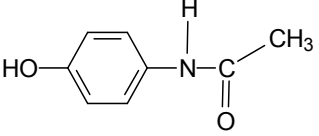
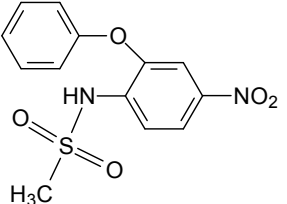
O paracetamol é um fármaco com consideráveis propriedades analgésicas, porém apresenta propriedades antiinflamatórias consideradas insignificantes clinicamente. Sua

fórmula molecular é $C_8H_9NO_2$ e a massa molecular é de $153,16 \text{ g mol}^{-1}$. Este fármaco é metabolizado principalmente pelo fígado, onde grande quantidade desta substância converte-se em compostos inativos por formação de sulfatos e glicuronídeo, sendo posteriormente excretado pelos rins¹¹.

A nimesulida é um medicamento denominado quimicamente de N-(4-nitro-2-fenoxifenil) metanossulfonamida, é um eficaz medicamento antiinflamatório não-esteroidal, inibidor seletivo da cicloxigenase-2 (COX-2), com propriedades antiinflamatória, antipirética e analgésica, que difere de outros compostos dessa classe pelo fato de exibir caráter ácido em virtude do grupo químico sulfonamida. Insolúvel em soluções ácidas, com ponto de fusão entre 143°C a 145°C , possui massa molecular de $308,31 \text{ g mol}^{-1}$ e forma molecular de $C_{13}H_{12}N_2O_5S$ ³³.

A Tabela 2 apresenta as características físicas e químicas dos fármacos estudados.

Tabela 2 – Propriedades físicas e químicas dos fármacos estudados

Fármaco CAS ¹	Grupo	Fórmula Química	Estrutura Química	pKa
Diclofenaco Sódico (15307-79-6)	Antiinflamatório		$C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$ (318,1)	4,2
Paracetamol (103-90-2)	Analgésico e antitérmico		$C_8H_9NO_2$ (151,2)	9,5
Nimesulida (51803-78-2)	Antiinflamatório		$C_{13}H_{12}N_2O_5S$	6,5

¹ Número de Registro no Chemical Abstracts Service

Como os fármacos tem sido objeto de vários estudos em muitos países, é necessário que se desenvolvam técnicas analíticas para quantificação, e existem algumas que são bem estabelecidas e registradas nos órgãos governamentais, como, por exemplo, a ANVISA. Os métodos analíticos oficiais são utilizados tanto para o controle da qualidade da matéria-prima como para o controle do produto acabado. Muitos métodos foram desenvolvidos e implementados para o controle de resíduos de fármacos em alimentos, podendo se destacar em especial a presença de antibióticos no leite³⁴.

O preparo de amostras tem sido automatizado, buscando-se a eliminação de erro humano na manipulação, a diminuição do tempo de assistência do analista durante a análise, bem como o risco de contato com substâncias prejudiciais a saúde e o aumento significativo do número de análises de amostras³⁵.

Muitos fármacos estão presentes em amostras ambientais em baixa concentração e exigem o uso de métodos que possibilitem a pré-concentração dos analitos de interesse na matriz em estudo²². Métodos são utilizados para a extração e pré concentração de fármacos em amostras de água, destacando-se a extração em fase sólida (SPE)⁷⁻¹¹ e a microextração em fase sólida (MSPE)²²⁻²⁵. Uma colaboração de grande importância para o desenvolvimento acelerado de técnicas capazes de determinar fármacos em amostras ambientais é o desenvolvimento de procedimentos para análise de resíduos de pesticidas, que em inúmeras vezes podem ser modificados em pequenas etapas e serem aplicados para resíduos de fármacos^{13,36}.

A extração em fase sólida (SPE) envolve a partição dos compostos de interesse entre um líquido (eluente) e uma fase sólida (sorvente), o que permite a pré-concentração e purificação dos analitos de interesse por meio do processo de sorção. O uso da SPE teve início a cerca de 50 anos atrás, porém somente em meados dos anos 70 e após inúmeras inovações a técnica começou a ser usada como uma alternativa à extração

líquido-líquido no pré-tratamento de amostras. Este método é usado a princípio exclusivamente na pré concentração de micropoluentes orgânicos em amostras ambientais, porém obteve grande avanço e potencial interesse quando utilizada na especiação de traços de metais em diversas matrizes^{37,38}.

A SPE é um método de separação líquido-sólido baseado nos mecanismos de separação da cromatografia líquida de baixa pressão, também conhecida como cromatografia líquida clássica, basicamente a extração em fase sólida comporta-se como uma cromatografia líquida empregando-se uma pequena coluna aberta, que usualmente é conhecida como cartucho de extração, o qual contem a fase sólida³⁹.

Na extração em fase sólida estão envolvidas 4 etapas, que são: condicionamento do adsorvente, adição da amostra, remoção dos interferentes e eluição dos analitos de interesse.

Na primeira etapa a fase móvel deve ser condicionada com um solvente apropriado de acordo com o material a ser ativado, e em seguida deve-se percolar sobre o mesmo o mesmo solvente dos analitos. Esta etapa é de grande importância, já que é nela que ocorrerá a eliminação das impurezas presentes inicialmente no cartucho^{38,39}.

A segunda etapa da SPE é a adição da amostra sobre a fase móvel. O volume usado varia de acordo com o fator de concentração que deseja-se alcançar. A percolação da amostra através do adsorvente deve ocorrer de forma quantitativa e lenta para que se alcance resultados reprodutíveis^{38,39}.

A terceira etapa envolvida na extração em fase sólida, que pode ser opcional em alguns casos, é a lavagem ou limpeza da fase sólida. Nesta etapa do procedimento deve-se escolher um solvente apropriado, ou seja, um solvente que apresente baixa força de eluição que não seja capaz de eluir o analito de interesse do adsorvente de empacotamento. A secagem do adsorvente após esta etapa também é importante, já que

a presença de água ao final das etapas pode, em alguns casos dificultar a subsequente concentração das substâncias de interesse e sua análise³⁷⁻³⁹.

A última etapa consiste na eluição do analito de interesse em um pequeno volume de eluente, de forma que a solução coletada já se encontre em concentração apropriada para a análise. Nesta etapa a escolha do eluente é importante, pois ele deve eluir o analito de interesse, mas não permitir a eluição de interferentes que não tenham sido eliminados na etapa de limpeza³⁹.

Em comparação com a cromatografia líquida clássica, alguns mecanismos de separação envolvidos na SPE se equivalem: a adsorção, partição em fase normal ou reversa, troca iônica ou exclusão por tamanho, isso vai depender das características da fase sólida utilizada no empacotamento do cartucho. Algumas vantagens da SPE são: o envolvimento de menos manipulações do analito em comparação com a extração líquido-líquido (LLE), menor tempo no preparo da amostra, consumo de menor quantidade de solventes orgânicos e geração de menor volume de resíduos³⁹.

A busca por técnicas capazes de separar e analisar amostras complexas levou ao desenvolvimento e inovação da cromatografia, destacando-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizada desde 1969. A evolução da técnica e sua enorme escala de utilização fez com que esta torna-se conveniente para uma grande variedade de amostras, alta velocidade de análise e níveis de detecção cada vez menores. Hoje em dia esta técnica é usada em diversas áreas, como na indústria farmacêutica na purificação de produtos de síntese orgânica ou de produtos naturais, caracterização de metabólitos, avaliação de ingredientes ativos, impurezas, produto de degradação, testes de dissolução, em estudos farmacodinâmicos e farmacocinéticos entre outros.

A cromatografia líquida de alta eficiência é um método físico-químico de separação, no qual há um equilíbrio entre duas fases: uma fase sólida, ou seja, um adsorvente que recheia uma coluna (fase estacionária) e uma fase móvel que percorre sobre a fase estacionária. Desta forma, a fase móvel (solvente) contido em um reservatório é bombeada constantemente através da coluna cromatográfica, é neste ponto que ocorre a separação dos analitos de interesse¹³⁻⁴⁰.

Depois que se obtém uma separação otimizada dos analitos de interesse da matriz estudada, faz-se necessário a utilização de método de detecção sensível e seletivo. Para a determinação de níveis baixos de concentração o HPLC utiliza como detectores o de arranjo de diodos (DAD), fluorescência (FL), ultravioleta (UV) e espectrômetro de massas (MS), sendo feita a escolha entre tais detectores de acordo com a característica da molécula a qual se deseja quantificar. A cromatografia líquida de alta eficiência é usada em grande escala na indústria farmacêutica, visto que não é necessária a volatilização do composto, além do não uso de soluções derivatizantes que gera muitas vezes um alto custo final da análise além de maior tempo e gasto na análise²².

Determinado método é considerado validado se suas características estiverem de acordo com os pré-requisitos estabelecidos. Há diferença entre a execução propriamente dita do experimento, ou seja, a coleta de dados experimentais, e sua validação.

Para que haja o registro de um novo produto, todos os órgãos reguladores exigem a validação do método analítico empregado, e neste caso estes órgãos estabelecem documentos oficiais que são diretrizes que devem ser seguidas no processo de validação de um processo. A validação tem como objetivo demonstrar que o método analítico é apropriado para a finalidade proposta².

As diretrizes regulamentadoras mais conhecidas no Brasil são a Resolução RE n° 899, da ANVISA e o DOQ-CGCRE-008, do Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO)⁴¹.

Os principais parâmetros de validação de métodos cromatográficos são seletividade, linearidade, função da resposta (gráfico analítico), intervalo de trabalho, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), recuperação, precisão (repetitividade, precisão intermediária e reprodutividade).

Um método é considerado específico quando ele é capaz de produzir resposta para apenas um analito, mas quando é capaz de gerar diversas respostas mas pode distinguir entre elas, ele é considerado seletivo. Na seletividade, a espécie de interesse deve ter o sinal analítico isento de qualquer interferente que possa levar a confusão ou interpretação errônea dos dados não gerando assim, confiabilidade no resultado quantitativo do método. Segundo a Resolução do INMETRO que será seguida nesta pesquisa, diz que, se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a tendência e a precisão estarão seriamente comprometidas^{39,41}.

A linearidade do método, ou a função da resposta (gráfico analítico) é determinada de acordo com a resposta linear que o equipamento usado para desenvolver o método produz, ou seja, é necessário verificar até que ponto a faixa de concentração do analito, coincide com a faixa dinâmica linear e assegurar que nenhum outro fenômeno tenha impacto que comprometa a resposta. A linearidade do método é expressa por uma equação matemática usada para o cálculo da concentração do analito de interesse na amostra real.

A equação da reta (eq.1) que relaciona a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito é a seguinte:

$$y = a + bx \quad (\text{eq.1})$$

onde; **y** é a resposta medida (absorbância, área ou altura do pico, etc.), **x** é a concentração, **a** é a interseção do eixo y quando $x = 0$ e **b** é a inclinação da curva analítica que representa a sensibilidade do método^{39,41}.

O método é considerado mais sensível quando pequenas variações de concentração resultam em maior variação de resposta, ou seja, maior inclinação (b). São necessários no mínimo cinco níveis de concentração para construir a curva analítica, e o número de replicadas em cada nível de concentração deve ser bem próximo da empregada na rotina do laboratório. A linearidade do método pode ser testada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados (R^2)⁴¹.

A faixa linear ou faixa de trabalho deve ser determinada de acordo a cobrir a presente faixa de aplicação para a qual o método deva ser usado, e a concentração do analito presente na amostra, sempre que possível, no centro da faixa de trabalho. No limite inferior da faixa de concentração, o fator limitante é o valor do limite de quantificação. No limite superior, os fatores limitantes dependem do sistema de resposta do equipamento de medição^{39,41}.

Quando se analisa amostras que apresentem baixa concentração de um determinado analito, é necessário que se saiba qual o menor valor de concentração do analito ou da propriedade que pode ser detectada pelo método, este valor pode variar em função do tipo da amostra analisada. É necessário que tenha segurança de que todas as etapas do método estejam incluídas para a determinação do limite de detecção (LD). Para

a validação de um método basta que se forneça uma indicação do nível em que a detecção do analito pode ser distinguida do sinal do branco/ruído. É recomendado no mínimo 7 replicatas para a determinação do limite de detecção, sendo que o valor deste deve ser de 3,143 vezes o desvio padrão amostral, valor este referente a 99% de confiança do método⁴¹.

O limite de quantificação (LQ), muitas vezes chamado de limite de determinação, corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco). Este limite, após ter sido determinado, deve ser testado com amostras independentes, para averiguar se a tendência e a precisão conseguidas são satisfatórias⁴¹.

A precisão de um método é normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição, e que pode ser expressa de três formas: por meio da repetitividade, precisão intermediária e da reprodutibilidade, sendo todas as três expressas pelo desvio padrão e o coeficiente de variação⁴¹.

O coeficiente de variação (CV) também conhecido como desvio padrão relativo (DPR), é calculado da seguinte forma:

$$C.V. = DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (\text{eq.2})$$

onde DP é o desvio padrão e CMD é a concentração média determinada.

A determinação da robustez de um método analítico, pode-se recorrer ao teste de *Youden*. Trata-se de um teste que permite não só avaliar a robustez do método, como também ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência de cada uma dessas variações. Convém salientar que, quanto maior for a robustez de um método, maior será a confiança desse relacionamento à sua precisão⁴¹.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O objetivo desta pesquisa é desenvolver condições analíticas para a determinação dos fármacos diclofenaco sódico, nimesulida e paracetamol em água.

3.2. Objetivos Específicos

- Desenvolvimento e otimização de um método de separação dos fármacos diclofenaco sódico, nimesulida e paracetamol utilizando o sistema de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detecção por arranjo de diodos (HPLC-DAD);

- Determinar por meio de valores de recuperação, o quanto o método é capaz de recuperar os fármacos após feita a extração em fase sólida de amostras fortificadas e detecção e quantificação por HPLC-DAD;

- Validação do método desenvolvido, considerando parâmetros de validação segundo a resolução DOQ-CGCRE-008 do INMETRO;

- Aplicação do método validado para a determinação dos fármacos estudados em amostras de água superficiais dos córregos da cidade de São Carlos, SP.

4. EXPERIMENTAL

4.1. Metodologia

4.1.1. Padrão analítico

Inicialmente para a determinação do comprimento de onda máximo de absorção dos fármacos estudados, foram preparadas soluções de concentração 50 mgL^{-1} , as quais foram analisadas utilizando um espectrofotômetro de UV, e assim foram obtidos os espectros de absorção para cada um dos três fármacos estudados.

Após realizada a varredura no espectro de absorção, foi preparada uma solução estoque de 50 mgL^{-1} da misturas dos fármacos diclofenaco sódio (Sigma-Aldrich[®], C.A.S. 15307-79-6), nimesulida (Sigma-Aldrich[®], C.A.S. 51803-78-2) e paracetamol (Sigma-Aldrich[®], C.A.S. 103-90-2) em metanol (P.A., T.Baker [®], C.A.S. No. 67-56-1) grau HPLC, que foram armazenados em um frasco de vidro âmbar e estocados a 4°C . Durante o desenvolvimento de pesquisa foram feitas diluições, sendo que tais soluções foram preparadas em água de nascente filtradas com filtro de acetato de celulose de poro $0,45\mu\text{m}$, a fim de eliminar as partículas sólidas em suspensão. Após feitas corridas com a solução estoque de concentração 50 mgL^{-1} da mistura, com a finalidade de se obter a melhor separação dos picos cromatográficos, preparou-se soluções estoques individuais dos fármacos para identificar entre os três picos obtidos quais seriam cada um deles de acordo com o tempo de retenção de cada um. Utilizou-se então a fase móvel composta por metanol e água, ambos acidificados com ácido trifluoracético (TFA), utilizando o modo gradiente com as condições apresentadas na Tabela 3.

A vazão foi mantida em 1,0 mL min⁻¹ durante toda a análise, que ocorreu em tempo total de 18 min, e a temperatura da coluna foi fixada em 25 °C.

Tabela 3 - Programação utilizada na eluição no modo gradiente.

Tempo (min)	Metanol (% v/v)	Água (% v/v)
0	5	95
3	5	95
11	95	5
16	5	95

Utilizou-se uma coluna C₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 µm, Agilent Technologies®), acoplada à pré-coluna C₁₈ (12,5 x 4,6 mm, 5 µm, Agilent Technologies®)

4.1.2. Comparação entre dois métodos de extração

Nesta etapa do trabalho foi feita a escolha do adsorvente a ser utilizado e da forma na qual o adsorvente iria ser condicionado afim de se obter uma boa recuperação. Para isso foram testados dois tipos adsorventes: C18 (SPE – C18 Agilent Technologies® de 500mg e 6mL) e OPT (SPE - Sampliq OPT - Agilent Technologies® de 60mg e 3mL), sendo a forma de condicionamento do adsorvente diferente em cada caso.

Com algumas modificações em relação ao método de extração proposto por Hilton et al⁸ O adsorvente C18 foi condicionado, com 6 mL de metanol (*P.A., T.Baker*®, C.A.S. No. 67-56-1), 6 mL de água livre de orgânicos e 6 mL de água acidificada com HCl (pH 3).

Em seguida, percolou-se através do adsorvente a amostra, ou seja, 200 mL de água livre de orgânicos dopada com padrão dos fármacos. Na etapa de clean-up (limpeza do adsorvente), utilizou-se 5mL de água livre de orgânicos, deixando o cartucho secar por

10 minutos. Posteriormente fez-se a eluição com 3 mL de metanol, secagem sob fluxo brando de nitrogênio e redissolução com 500µL de metanol, todo procedimento feito à pressão de 15kPa. Para o cartucho de OPT, o adsorvente foi condicionado com 3mL de hexano (*P.A., UltimAR[®], C.A.S. 110-54-3*), 1,5mL de acetona (*P.A., ChromAR[®], C.A.S. N^o.67-64-1*) e 3 mL de metanol, da mesma forma do procedimento anterior utilizando cartucho C18 , percolou-se 200 mL de água livre de orgânicos dopada com padrão dos fármacos, porém para este adsorvente não foi necessária a etapa de limpeza. A eluição foi feita com 10 mL de metanol, secou-se sob fluxo brando de nitrogênio e fez-se a redissolução com 500µL de metanol.

4.1.3. Escolha do cartucho e condições de extração em fase sólida (SPE)

Empregando-se o adsorvente OPT (SampliQ OPT - Agilent Technologies[®] de 60mg e 3mL) e procedeu-se a extração da seguinte forma: a fase sólida foi condicionado com 3,0 mL de hexano, 1,5 mL de acetona e 3,0 mL de metanol. Após percolou-se através do cartucho 200 mL de amostra filtrada, que foi seco por 10 minutos e a eluição foi feita com 10 mL de metanol. O extrato foi seco sob fluxo brando de nitrogênio e reconstituído com 500 µL de metanol.

Após meia hora, 20µL da amostra foi injetada no HPLC-DAD. A Figura 2 representa um fluxograma de cada etapa de extração.

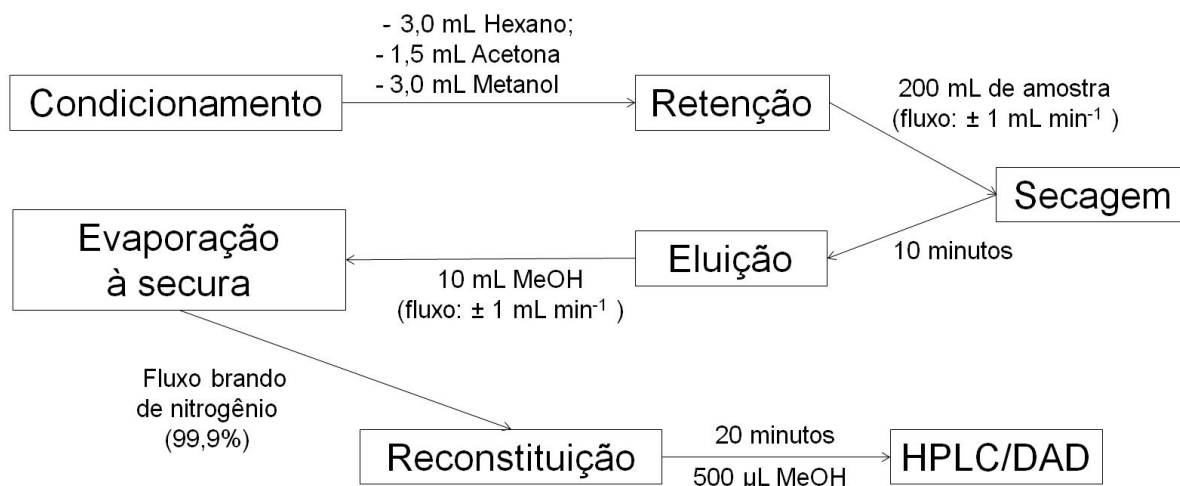


Figura 2 - Fluxograma do procedimento de extração em fase sólida - SPE.

4.1.4. Validação do método analítico para determinação dos fármacos diclofenaco, nimesulida e paracetamol

Na etapa de validação as amostras foram preparadas com água de nascente filtradas com filtro de acetato de celulose de poro 0,45µm, a fim de eliminar as partículas solidas em suspensão, que pode ser considerada sem a presença dos analitos em estudo, só confirma-se a presença destes após a adição de solução estoque de diclofenaco, nimesulida e paracetamol em 200 mL de água de nascente. Após feita esta etapa, as amostras foram extraídas por extração em fase sólido e analisadas por HPLC/DAD.

Para a obtenção dos parâmetros de validação seguiu-se da seguinte maneira:

- **Seletividade** - nesta etapa foi analisada uma amostra em branco, ou seja, uma matriz sem analito e outra contendo os analitos de interesse, ou seja, fortificado com os padrões; ambas foram submetidas a análise na mesmas condições cromatográficas propostas.

- **Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)** – preparou-se diferentes concentrações dos analitos de interesse que foram adicionadas à água de nascente. O LD deve ser de duas a três vezes maior que a amplitude do ruído, já o limite de LQ tem que ser no mínimo cinco vezes maior que a amplitude do ruído.

- **Limite inferior de quantificação (LIQ)** – preparou-se cinco amostras diferentes da concentração do LQ. Caso houver precisão e exatidão dentro dos limites aceitáveis, ou seja, precisão de até 20% e exatidão de 80 a 120%, pode-se admitir que este valor é o limite inferior de quantificação (LIQ), caso contrário, é necessário que se aumente este valor a fim de se obter valores considerados aceitáveis.

- **Linearidade** – para determinação da curva de linearidade, utilizou-se seis soluções com concentração diferente, sendo que para cada concentração a análise foi feita em triplicata. A curva analítica só pode ser considerada aceita caso o LIQ tenha desvio de até 20% comparada com a concentração nominal e para as outras concentrações desvio de até 15%, no mínimo quatro concentrações da curva analítica devem cumprir os critérios anteriores, sendo obrigatório para o LIQ e para a maior concentração da curva analítica. Para que o parâmetro de linearidade seja aceito, o coeficiente de correlação linear (R^2) deve ser igual ou superior a 0,98.

- **Precisão e exatidão** – preparou-se cinco concentrações diferentes, nas quais abrangeram as concentrações baixa, média e alta, sendo que para cada concentração

foram preparadas cinco amostras que foram extraídas e analisadas. Para a confirmação deste parâmetro, foram feitos dois testes em dias diferentes para determinar a precisão e exatidão intra e inter-corridas, considerando que o desvio ou coeficiente de variação deva ser de até 15% para todas as concentrações, menos pro LIQ que pode ser de até 20%, e exatidão deve estar entre 80 a 120%.

- **Recuperação** – nesta etapa preparou-se soluções com concentração diferentes abrangendo novamente as concentrações baixa, média e alta linearidade do método, e para cada concentração fez-se três amostras, que posteriormente foram extraídas e analisadas. Utilizando-se das mesmas soluções de concentração selecionada, três amostras que não foram submetidas à extração e foram injetadas diretamente no HPLC/DAD. Os resultados obtidos depois de feitas as análises, que devem ser precisos e exatos, foram comparados a fim de se obter valores aceitáveis de recuperação.

4.1.5. Área de estudo

O município de São Carlos está inserido em duas bacias hidrográficas: Mogi-Guaçu e Tietê-Jacaré. A bacia Mogi-Guaçu inclui as sub-bacias das Araras, Mogi-Guaçu, das Cabeceiras, Chibarro, do Colombo, das Gabirobas, e do Pântano, entretanto a bacia do Tietê-Jacaré compreende as sub-bacias do Monjolinho, do Feijão e do Jacaré-Guaçu.

A sub-bacia do Rio Monjolinho situa-se na região centro oeste do estado de São Paulo localizada entre os paralelos 21°57' e 22°06' de latitude sul e os meridianos 47° 50' e 48°05' de longitude oeste. O Rio Monjolinho nasce próximo da periferia da cidade de São Carlos e a cruza no sentido Leste-Oeste, tendo uma extensão de aproximadamente 43,25 km. Após atravessar o centro urbano, o Rio do Monjolinho percorre áreas agropastoris até desaguar em outro curso d'água no Rio Jacaré-Guaçu.

Os pontos de coleta foram definidos de modo que abrangessem grande parte dos rios da malha hídrica da cidade de São Carlos. A Figura 3 apresenta os pontos relacionados para que fossem feitas as coletas e a Tabela 4 as coordenadas de cada ponto.



Figura 3 – Localização dos pontos de coleta na cidade de São Carlos (SP)

Tabela 4 – Coordenadas dos pontos dos pontos de coleta dos córregos que cortam a cidade de São Carlos (Fonte: Google Earth)

Ponto de coleta	Latitude	Longitude
Ponto 1	22°00'08.18" S	47°53'59.94" O
Ponto 2	22°00'02.19" S	47°53'59.29" O
Ponto 3	21°59'57.40" S	47°54'02.49" O
Ponto 4	22°01'03.28" S	47°54'42.76" O
Ponto 5	22°01'23.96" S	47°55'27.62" O

4.1.6. Coleta e estocagem das amostras

As amostras de água dos córregos da cidade de São Carlos foram coletadas em duas épocas distintas, sendo a primeira após um período de estiagem compreendido entre os meses de junho e agosto de 2010 (inverno) e outra no primeiro semestre de 2011. As coletas foram feitas em horários determinados de acordo com a característica e qualidade da água superficial dos córregos no local da coleta, ou seja, como nos córregos há lançamento clandestino de esgoto, optou-se por uma coleta no período da manhã e outra no período da tarde, já que existe uma maior probabilidade de adentrar esgoto sanitário no corpo hídrico. Foram feitas análise de pH, oxigênio dissolvido, e temperatura da água durante a coleta. Logo após a coleta foram adicionadas algumas gotas de metanol na amostra, a fim de cessar a atividade microbiana, estas por fim foram acondicionadas em frascos de vidro estéreis sob refrigeração ($\pm 4^{\circ}\text{C}$) e transportadas em caixas isolantes ao laboratório, onde foram armazenadas em refrigerador.

As Figuras de 4 a 8 apresentam as fotos dos pontos de coleta de acordo com as coordenadas geográficas da Tabela 3.



Figura 4 – Ponto de coleta (1) - Rio Tijuco Preto (Foto Gustavo; 2010).



Figura 5 – Ponto de coleta (2) - Rio Monjolinho (Foto Gustavo; 2010).



Figura 6 – Ponto de coleta (3) - Rio Santa Maria do Leme (Foto Gustavo; 2010).



Figura 7 – Ponto de coleta (4) – Rio Gregório (Foto Gustavo; 2010).



Figura 8 – Ponto de coleta (5) – Ribeirão da Água Fria (Foto Gustavo; 2010).

Observa-se nas Figuras 4 a 8 que próximo aos pontos de coleta existem residências o que pode facilitar o descarte clandestino de esgoto sobre o corpo hídrico, aumentando a possibilidade da presença de fármacos nos pontos amostrados.

4.1.7. Descarte dos resíduos gerados

Os resíduos gerados durante as extrações foram inicialmente acondicionados em frascos apropriados e rotulados, sendo estocados em local ventilado e posteriormente encaminhados ao Laboratório de Resíduos Químicos, Campus USP – São Carlos, onde serão processados⁴⁴.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Condições cromatográficas para análise dos fármacos diclofenaco, nimesulida e paracetamol em efluentes domésticos da cidade de São Carlos-SP

A identificação do comprimento de onda máximo de absorção para cada fármaco foi feita de acordo com a absorção máxima após a análise de soluções estoque padrão de cada um separadamente . O diclofenaco apresenta absorção máxima em 280 nm como demonstrado no espectro na região do UV, Figura 9.a

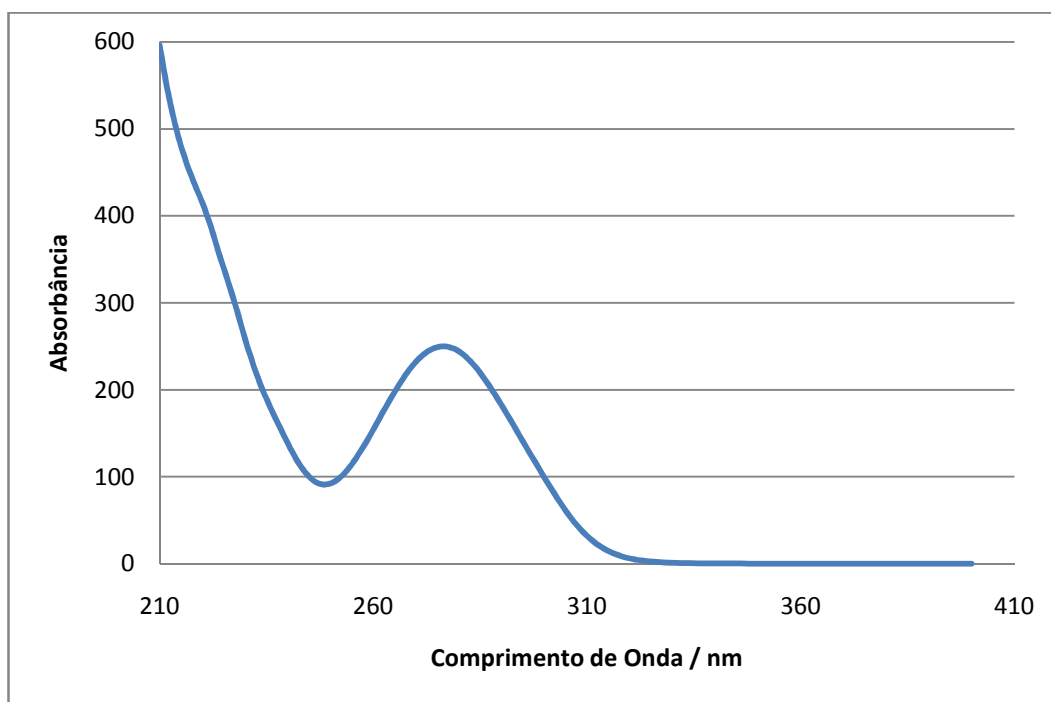


Figura 9 – Espectro de UV do diclofenaco

Para a nimesulida a absorção máxima observada foi em 298 nm como pode ser observado no espectro na região do UV, Figura 10.

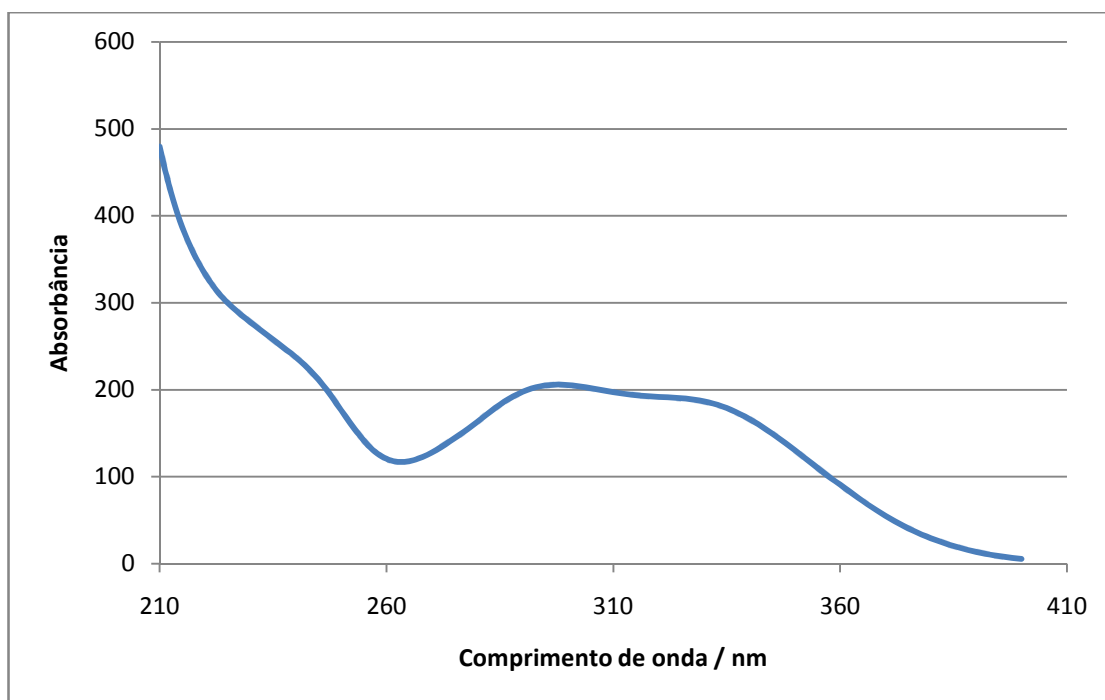


Figura 10 – Espectro de UV da nimesulida

Da mesma forma que os anteriores, a Figura 11 apresenta o espectro na região do UV para o fármaco paracetamol.

Observa-se que a absorção máxima ocorre em 248nm na região do ultra-violeta.

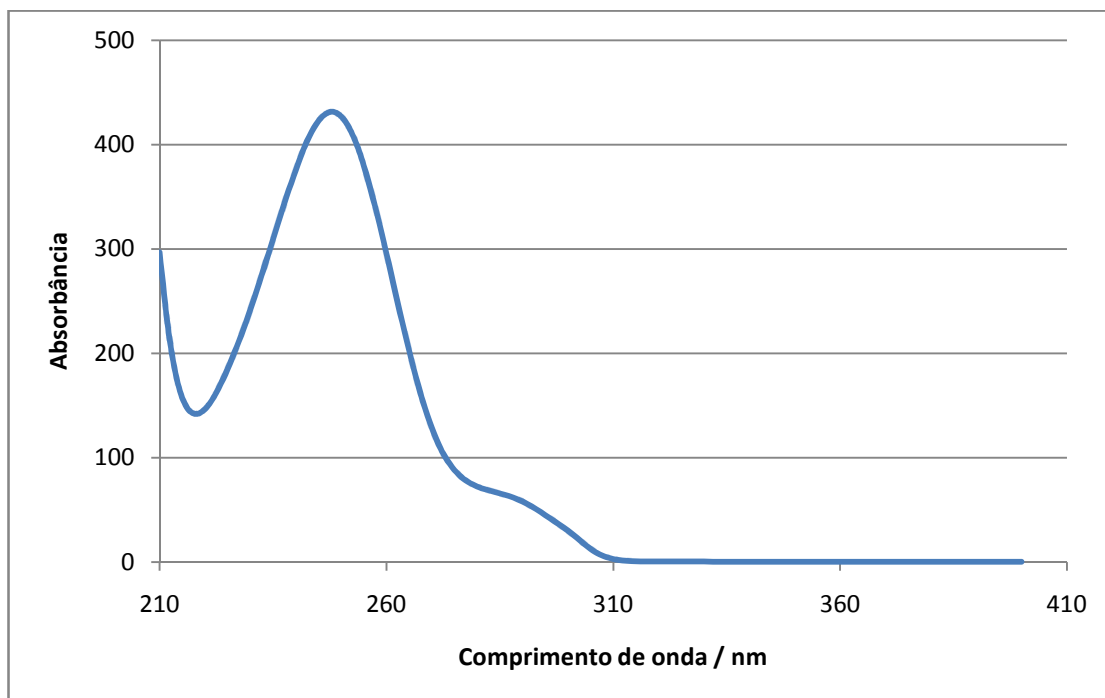


Figura 11 – Espectro de UV do paracetamol

Como os fármacos apresentam absorção máxima distintos, optou-se pelo comprimento de onda de 280nm, pois pode-se observar por meio da Figura 12, que no comprimento de onda de 280nm o fármaco paracetamol apresenta uma absorção significativa. Apesar de os comprimentos de ondas na região menor que 220nm apresentem um alto valor de absorção, optou-se por usar 280nm, seguindo recomendações de Cass e Degani⁴⁵ que indicam a utilização de comprimento de ondas superiores a 220nm, pois abaixo deste valor geralmente é observado interferência da fase móvel.

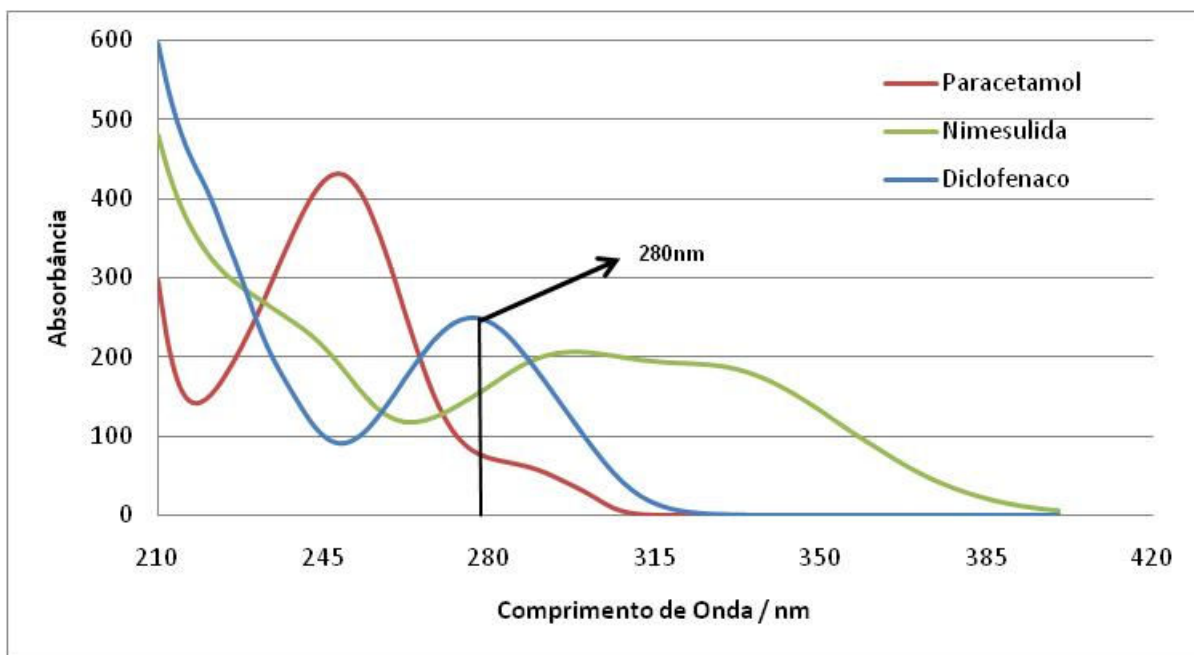


Figura 12 – Sobreposição dos espectros dos fármacos diclofenaco, nimesulida e paracetamol.

A Figura 13 mostra a comparação entre os comprimentos de ondas de 248nm e 280nm, e observa-se que realmente um melhor cromatograma é obtido quando utiliza-se o comprimento de onda de 280nm.

Neste caso não houve a necessidade de se utilizar o comprimento de onda de 248nm, visto que a nimesulida que apresentou absorção máxima neste comprimento de onda, Figura 10, mantém uma banda considerável de absorção em 280nm.

Observa-se que há um aumento da linha de base nos cromatogramas a partir do tempo próximo a 10 minutos, isto dá-se devido ao efeito do gradiente da fase móvel utilizada.

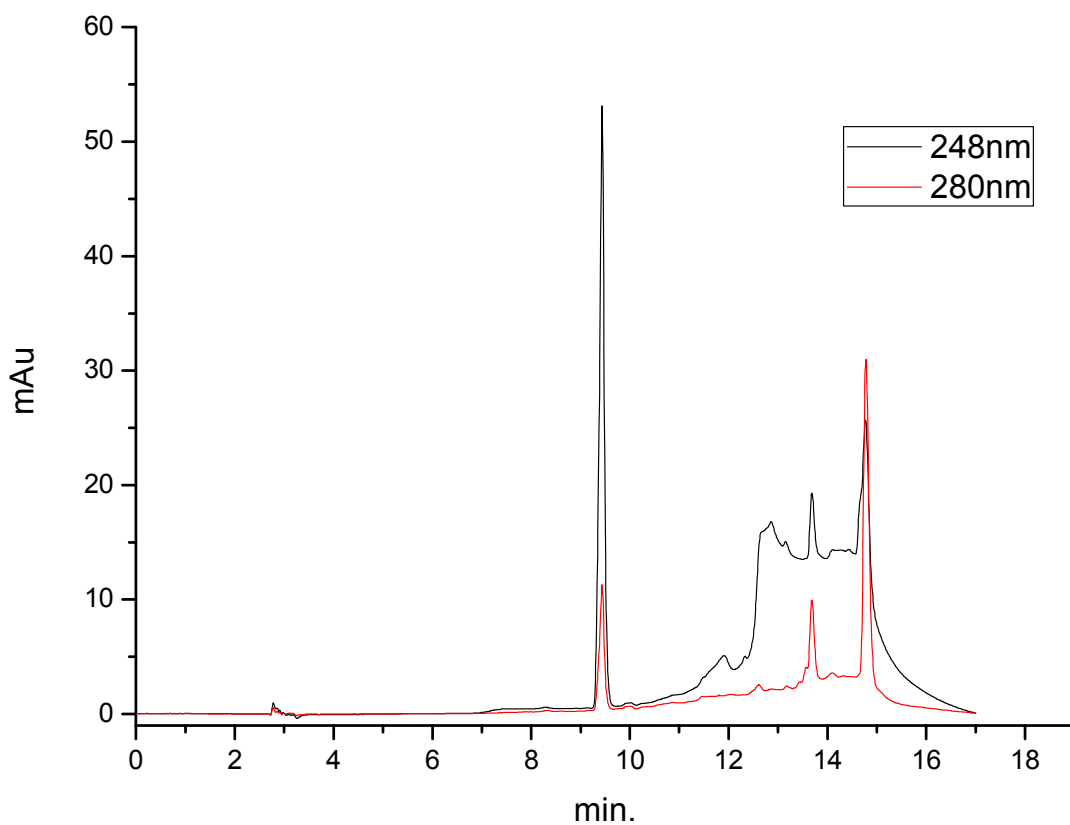


Figura 13 – Espectro de comparação entre os comprimentos de onda de 248nm e 280nm para o paracetamol, nimesulida e diclofenaco.

A fase móvel utilizada foi a descrita na Tabela 3, pois foi nesta condição que obteve-se melhor resposta cromatográfica. O cromatograma da Figura 14 apresenta um cromatograma obtido a partir da análise da solução contendo os analitos, na concentração de $100\mu\text{gL}^{-1}$ de cada composto.

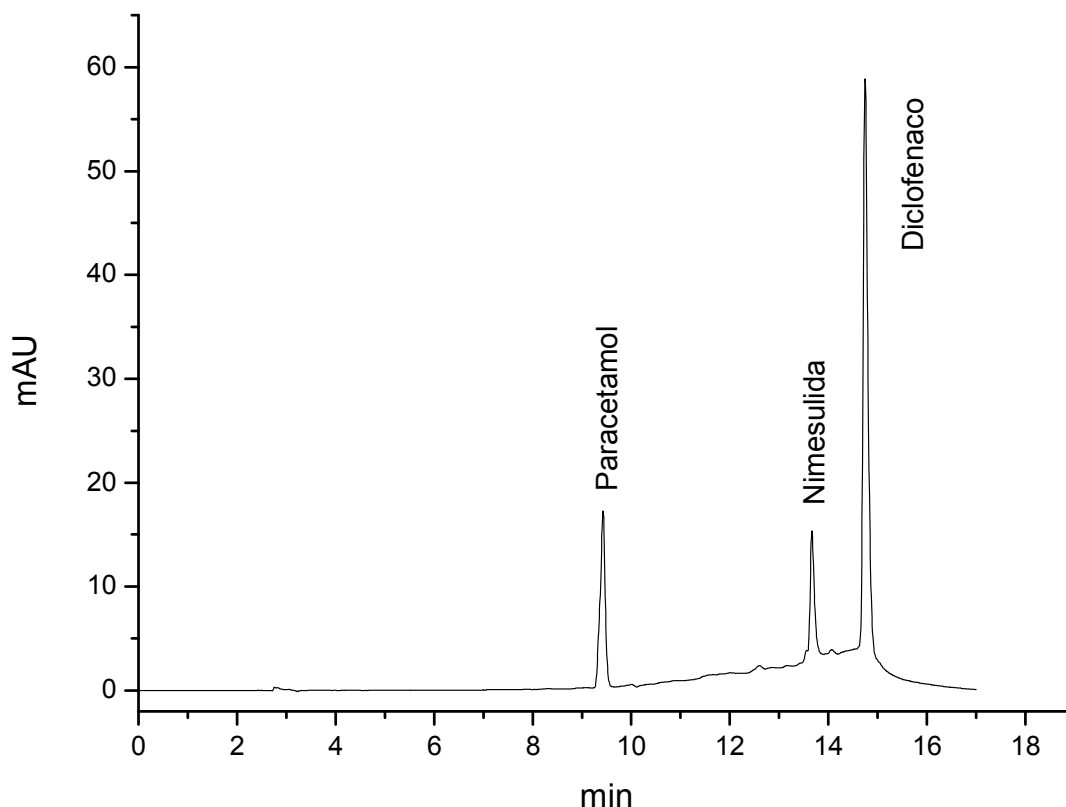


Figura 14 – Cromatograma da solução-padrão mista dos fármacos, na concentração $100\mu\text{g L}^{-1}$ para cada composto (FM MeOH:H₂O, em gradiente, fluxo de 1 mL min^{-1} , volume de injeção de $20\mu\text{L}$, $\lambda = 280\text{ nm}$, temp. = $26\text{ }^\circ\text{C}$).

5.2. Validação do método analítico para análise dos fármacos diclofenaco, nimesulida e paracetamol

Os parâmetros utilizados para a validação do método propostos foram seletividade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), limite inferior de quantificação (LIQ), linearidade, precisão, exatidão intra e inter-corrída e recuperação.

5.2.1. Seletividade

Para que fosse levantado o parâmetro seletividade da validação, analisou-se uma amostra do branco, ou seja, a matriz sem os analitos estudados e uma amostra de água de nascente com os analitos, ambos foram submetidas às mesmas condições cromatográficas. Para isso filtrou-se 200 mL da água de nascente e submeteu-se a SPE, da mesma forma em um mesmo volume diluiu-se uma solução estoque de concentração 300mg L^{-1} afim de se obter a concentração de $25\mu\text{g L}^{-1}$, que também foi extraída por SPE. Os extratos foram submetidos à análise empregando-se HPLC/DAD. Pode-se observar no cromatograma da Figura 15 que na amostra do branco não há interferentes provenientes da matriz, ou seja, sinais próximos ao tempo de retenção dos analitos estudados, o que poderia gerar falsos positivos ou negativos.

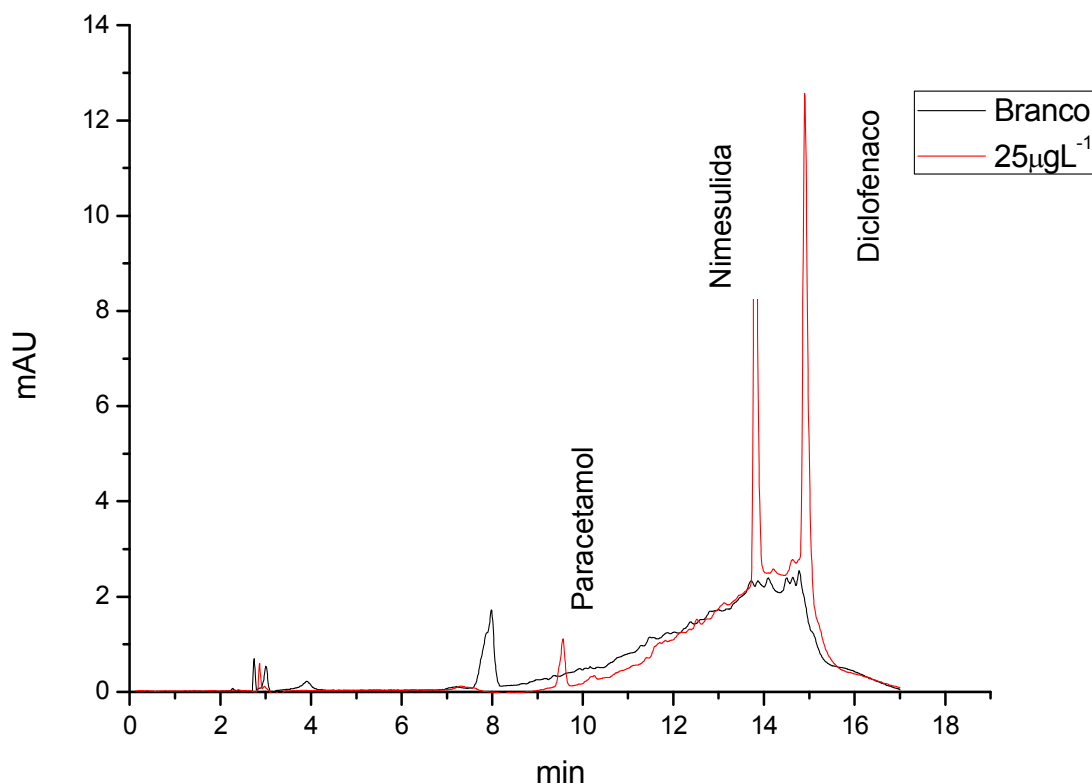


Figura 15 – Seletividade do método para análise dos fármacos diclofenaco, nimesulida e paracetamol (tempo de retenção paracetamol = 9,41 min , nimesulida = 13,64 min e paracetamol = 14,74 min)

Desta forma, pode-se afirmar que o método utilizado para determinar os fármacos em estudo é seletivo e adequado para a validação proposta, já que verifica-se pelo cromatograma que não existe picos próximos ao tempo de retenção dos analitos que é 9,41 min para o paracetamol; 13,64 min para a nimesulida e 14,74 min para o paracetamol.

5.2.2. Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

De acordo com a DOQ-CGCRE-008, do Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO)⁴¹ basta que se forneça uma indicação do nível em que a detecção do analito pode ser distinguida do sinal do branco/ruído. É recomendado no mínimo 7

replicatas para a determinação do limite de detecção, sendo que o valor deste deve ser de 3,143 vezes o desvio padrão amostral, valor este referente a 99% de confiança do método.

As amostras foram preparadas em água de nascente diluindo-se a solução estoque da mistura dos analitos, com posterior extração SPE e análise em HPLC. Analisou-se as seguintes soluções na concentração de 0,25; 0,5; 0,8 e 1,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os fármacos diclofenaco, paracetamol e nimesulida. Os limites de detecção e de quantificação, Tabela 5, apresentam-se adequado se comparados com outros estudos feitos anteriormente, Tabela 1^{8, 24-30}.

Tabela 5 – Limites de detecção e de quantificação para o método proposto na análise dos fármacos em água; volume de injeção 20 μL .

Fármaco	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Diclofenaco	0,5	1,1
Nimesulida	0,5	1,1
Paracetamol	0,8	1,2

5.2.3. Limite inferior de quantificação (LIQ)

Preparou-se cinco soluções de diferentes concentrações, sendo utilizada as concentrações dos limites de quantificação para cada fármaco, ou seja, 1,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o diclofenaco e nimesulida e 1,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o paracetamol. Todas as soluções foram preparadas a partir da diluição de uma solução estoque em 200 mL de água de nascente filtrada, extraída por SPE e análise por HPLC.

A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos do desvio padrão relativo (DPR) e da exatidão.

Tabela 6 – Limites inferiores de quantificação para o método proposto na análise dos fármacos em água; volume de injeção 20 μ L.

Fármaco	DPR (%)	Exatidão (%)
Diclofenaco	6,59	107,72
Nimesulida	7,18	98,65
Paracetamol	5,14	113,43

Como o desvio padrão dos fármacos estudados é menor do que 20% e exatidão entre 80 e 120% pode-se considerar os valores dos limites de quantificação (LQ) como sendo os valores dos limites inferiores de quantificação (LIQ)⁴¹ de acordo com a DOQ-CGCRE-008, do Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO), ou seja, para os fármacos diclofenaco e nimesulida tem-se os LIQ iguais a 1,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ e para o paracetamol temos LIQ igual a 1,2 $\mu\text{g L}^{-1}$.

5.2.4. Linearidade

A linearidade do método foi feita levantando a curva para cada fármaco e para cada fármaco. Este procedimento foi feito-se em triplicata. Os resultados obtidos e as curvas serão apresentados nas Figuras 16 a 21.

Foram construídas três curvas para o diclofenaco, sendo a primeira feita com soluções em concentrações consideradas baixas de 0,5; 0,7; 0,9; 1,1; 1,3 e 1,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, Figura 16, e outra com concentrações consideradas altas 10,0; 20,0; 30,0; 40,0 e 50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, Figura 17.

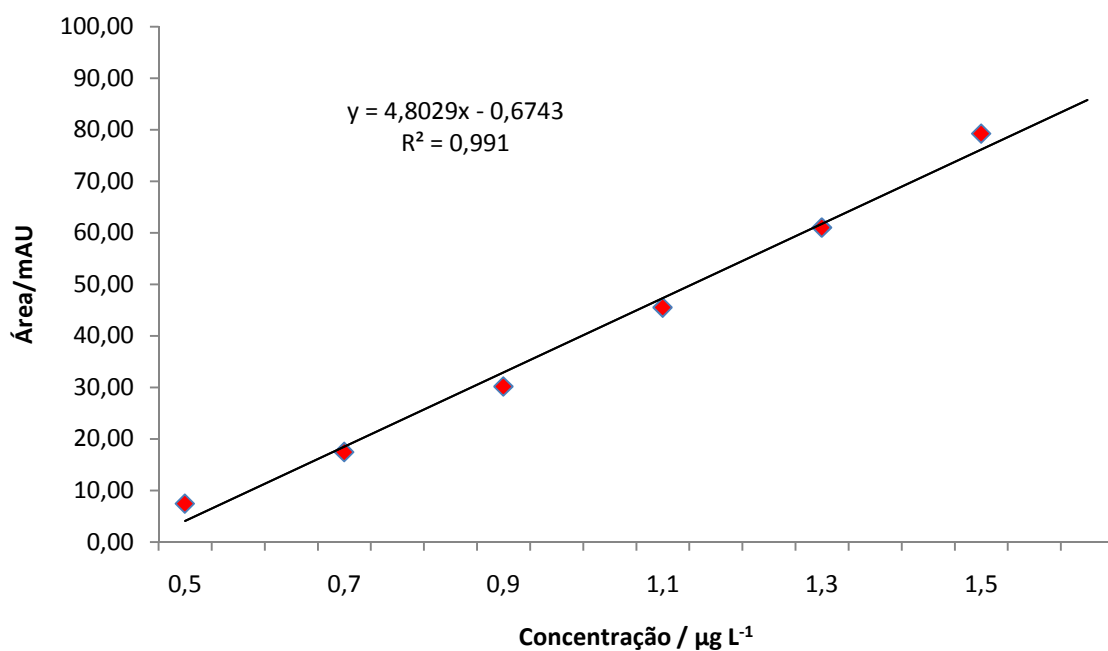


Figura 16 – Linearidade do método para análise do diclofenaco de 0,5 a 1,5 $\mu\text{g L}^{-1}$.

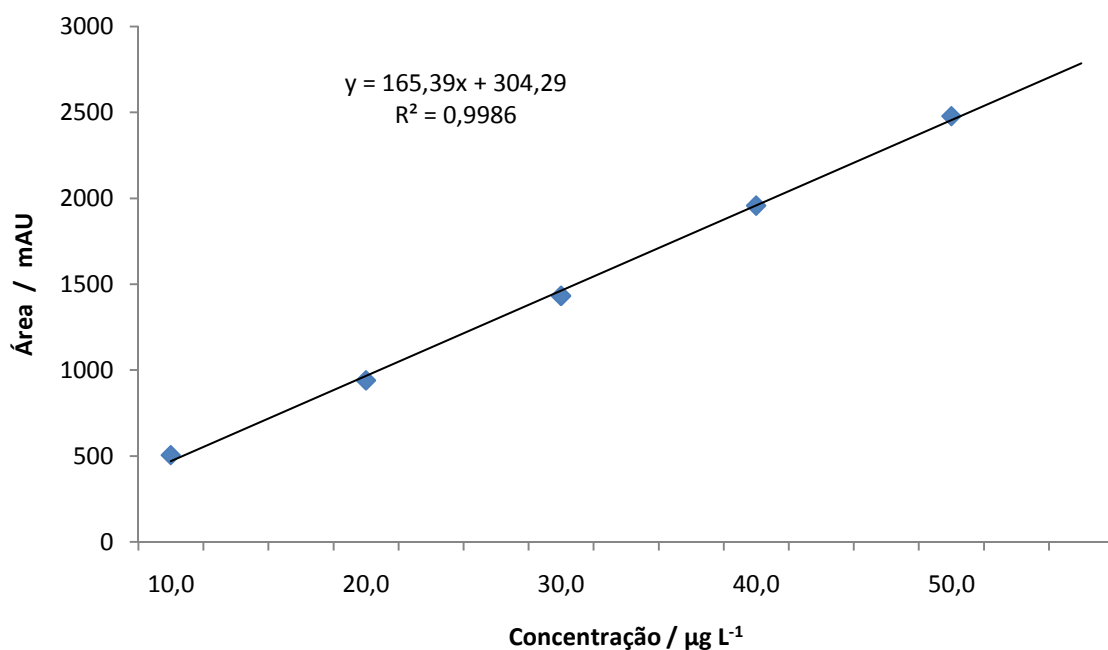


Figura 17 – Linearidade do método para análise do diclofenaco de 10 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Foram utilizadas as soluções de nimesulida de concentrações de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 e 1,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a construção da curva de concentrações mais baixas, Figura 18 e 10,0; 20,0; 30,0; 40,0 e 50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para concentrações mais altas, Figura 19.

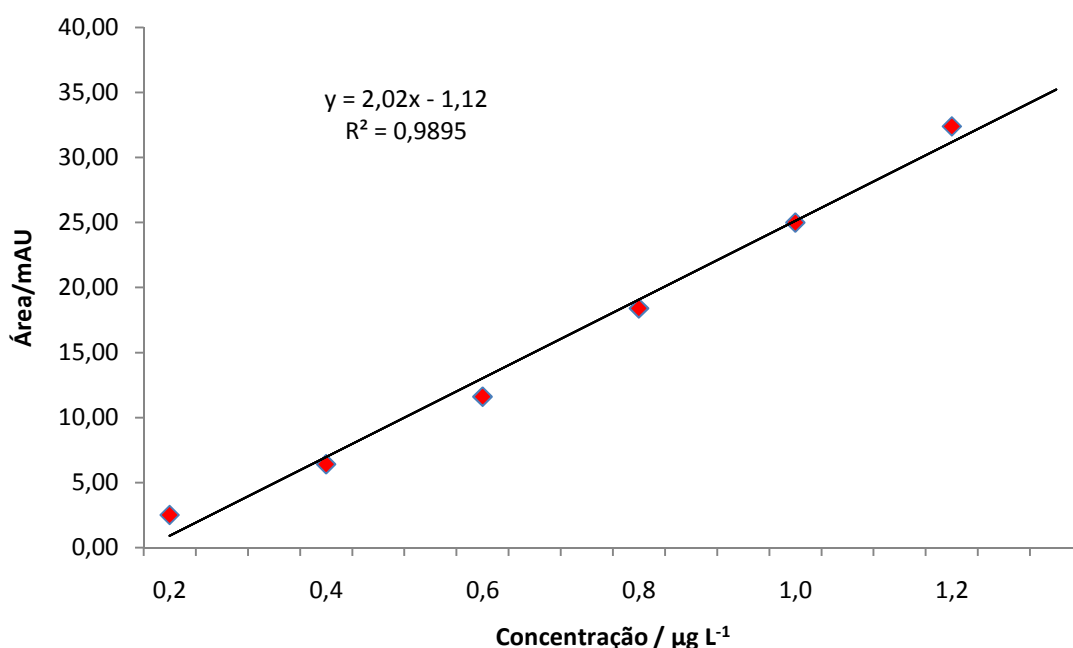


Figura 18 – Linearidade do método para análise da nimesulida de 0,2 a 1,2 µg L⁻¹.

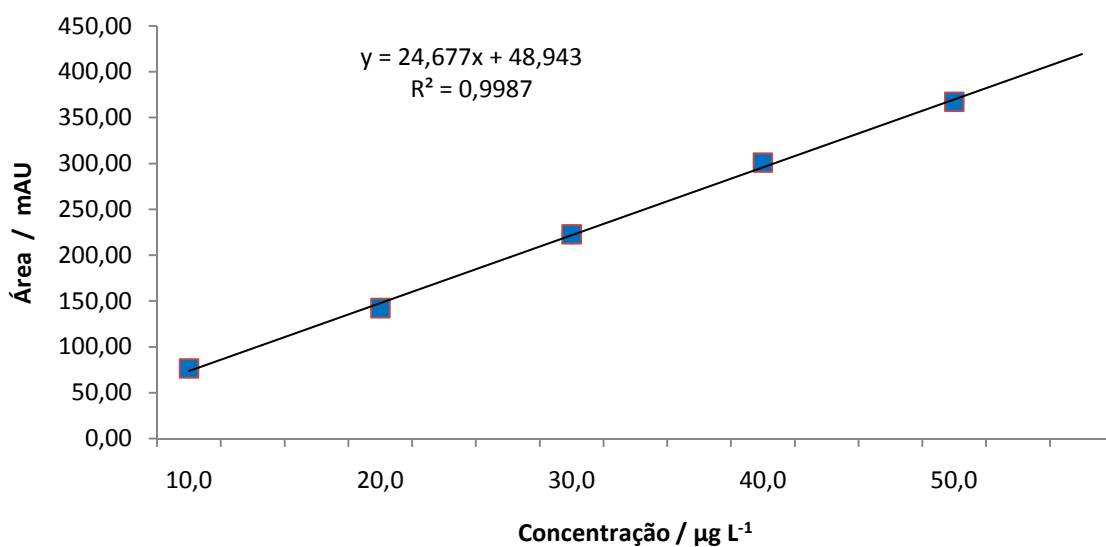


Figura 18 – Linearidade do método para análise da nimesulida de 10 a 50 µg L⁻¹.

Da mesma forma como foi feito para o diclofenaco e para a nimesulida, foram construídas duas curvas para o fármaco paracetamol, sendo a primeira com soluções de concentrações baixas de 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2,0 e 2,4 µg L⁻¹, Figura 20, e

para a curva de valores considerados altos foram 15,0; 30,0; 45,0; 60,0 e 75,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, Figura 21.

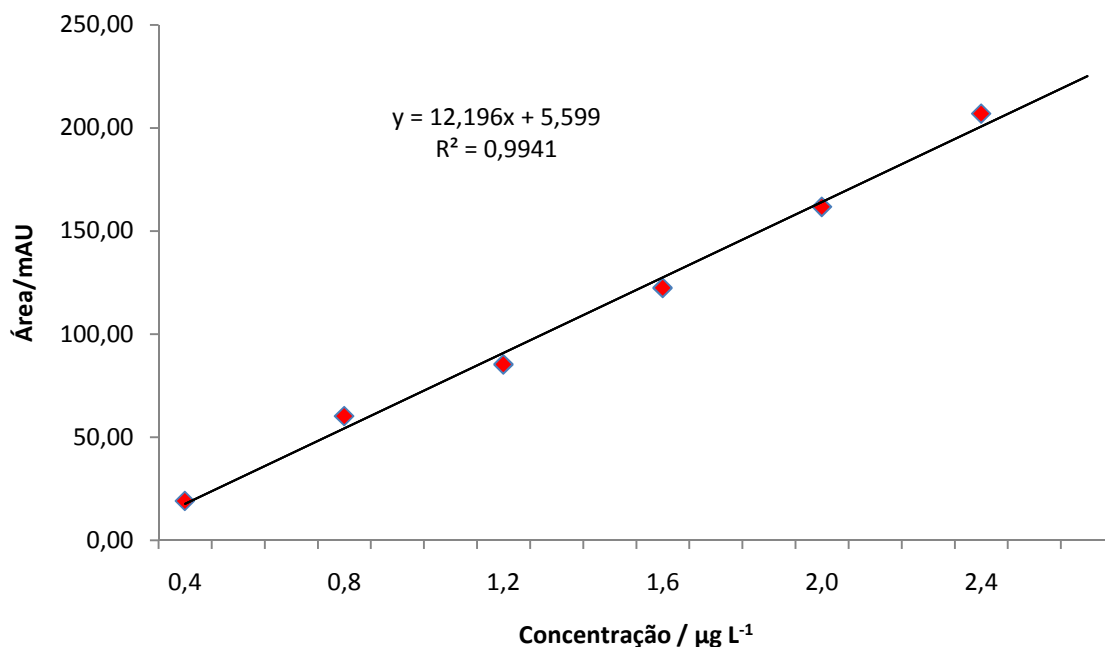


Figura 20 – Linearidade do método para análise do paracetamol de 0,4 a 2,4 $\mu\text{g L}^{-1}$.

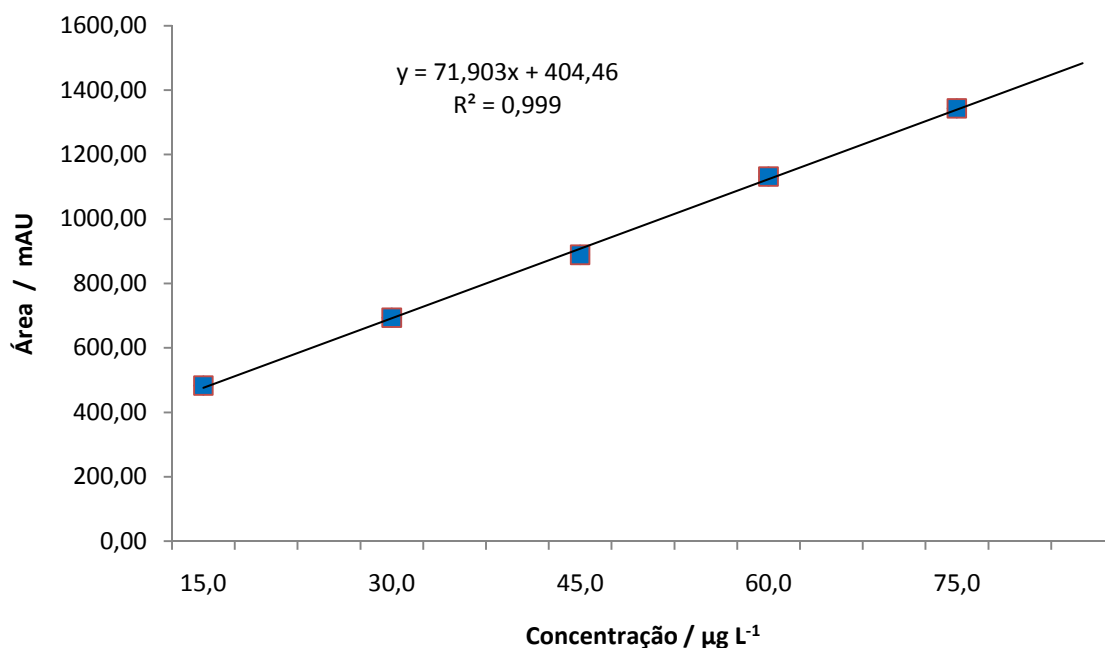


Figura 21 – Linearidade do método para análise do paracetamol de 15 a 75 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Segundo a norma DOQ-CGCRE-008, do Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO)⁴¹, os valores obtidos de linearidades e as curvas analíticas dos

fármacos diclofenaco, nimesulida e paracetamol apresentaram LIQ com desvio de até 20% quando se compara com a concentração nominal e para as outras soluções de diferentes concentrações, observou-se desvio de até 15% em relação à concentração nominal. Observa-se também que os coeficientes de correlação linear apresentaram valores superiores a 0,98, o que os estão dentro dos parâmetros aceitáveis para a validação do método, ou seja, os resultados de linearidade de resposta encontrados servem para a determinação da concentração dos fármacos em estudo em amostras de águas, basta que se tenha uma área determinada no tempo de retenção de cada fármaco junto com a equação da reta obtida, para que se determine a concentração dos fármacos estudados.

5.2.5. Precisão e Exatidão

Para determinar a precisão e a exatidão do método proposto, Tabelas de 7 a 12, para cada fármaco foram fortificadas amostras isentas do analito abrangendo as concentrações consideradas baixas e as consideradas altas, sendo preparadas cinco amostras para cada concentração, estas análises foram feitas em dois dias diferentes.

Tabela 7 – Precisão e Exatidão do método no primeiro dia de análise do diclofenaco

μgL^{-1}	DPR (%)	Exatidão (%)
0,5	6,75	96,80
1,1	3,43	97,56
10	2,45	100,45
30	0,56	104,56
50	2,33	98,78

Tabela 8 – Precisão e Exatidão do método no segundo dia de análise do diclofenaco

μgL^{-1}	DPR (%)	Exatidão (%)
0,5	1,65	99,76
1,1	1,18	104,23
10	3,13	101,20
30	4,76	105,64
50	4,14	96,54

Tabela 9 – Precisão e Exatidão do método no primeiro dia de análise do nimesulida

μgL^{-1}	DPR (%)	Exatidão (%)
0,2	0,58	88,90
1,2	1,15	87,14
10	1,18	89,43
30	3,24	103,34
50	3,22	116,67

Tabela 10 – Precisão e Exatidão do método no segundo dia de análise do nimesulida

μgL^{-1}	DPR (%)	Exatidão (%)
0,2	0,76	114,34
1,2	6,69	103,18
10	4,45	112,76
30	0,67	99,38
50	2,25	99,45

Tabela 11 – Precisão e Exatidão do método no primeiro dia de análise do paracetamol

μgL^{-1}	DPR (%)	Exatidão (%)
0,4	3,45	93,68
2,4	4,56	97,14
15	6,67	96,56
45	3,18	100,30
75	2,34	101,40

Tabela 12 – Precisão e Exatidão do método no segundo dia de análise do paracetamol

μgL^{-1}	DPR (%)	Exatidão (%)
0,4	2,56	89,14
2,4	4,46	103,14
15	4,70	97,70
45	2,19	101,90
75	0,89	98,45

Observa-se nas Tabelas de 7 a 12 que os valores dos desvios padrão relativos (DPR) para diferentes concentrações dos fármacos apresentaram valores inferiores a 15%, o que é aceitável para validação de métodos analíticos, segundo a

Resolução DOQ-CGCRE-008 do INMETRO. Os valores de exatidão encontrados encontram-se na faixa de 80 a 120% o que os tornam aceitáveis de acordo com a resolução do INMETRO. Optou-se por calcular valores de DPR e Exatidão interdias, e a Tabela 13 apresenta estes valores.

Tabela 13 – Precisão e Exatidão interdias do método para os fármacos

Fármaco	DPR (%)	Exatidão (%)
Diclofenaco	3,03	100,55
Nimesulida	2,43	101,46
Paracetamol	3,50	97,94

5.2.6. Recuperação

Afim de testar a recuperação do método de extração (SPE), preparou-se diferentes soluções de concentrações diferentes dos fármacos, sendo a primeira de baixa concentração, a segunda de média concentração e a terceira com a foram submetidas a extração em fase sólida e em seguida submetidas a análise utilizando o HPLC/DAD. Para comparação, soluções com a mesma concentrações dos fármacos foram analisadas diretamente no HPLC/DAD sem que fossem submetidas a extração em fase sólida. Todos os dados obtidos tanto para os extratos submetidos a SPE quanto para as análises feitas diretamente no HPLC/DAD apresentaram-se valores precisos e exatos. Para obter valores de recuperação os cálculos feitos foram feitos comparando as áreas dos picos cromatográficos das amostras sem que fosse feita a extração e os das amostras após submetidos a SPE.

Valores de recuperação do método proposto são apresentados nas Tabelas a de 14 a 16.

Tabela 14 – Recuperação do método SPE para o diclofenaco

Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)
0,10	96,70
0,25	95,48
0,50	95,56
1,0	97,80
2,0	104,20

Tabela 15 – Recuperação do método SPE para o nimesulida

Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)
0,10	95,80
0,25	108,45
0,50	97,90
0,80	101,40
1,0	99,80

Tabela 16 – Recuperação do método SPE para o paracetamol

Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)
0,10	98,60
0,25	87,50
0,50	95,66
0,80	93,40
1,0	90,70

O método validado foi aplicado nas amostras coletadas de água dos córregos da cidade de São Carlos (SP), nos pontos de 1 a 5, Tabela 3, afim de se determinar os fármacos diclofenaco, nimesulida e paracetamol.

5.3. Análise das amostras de água dos córregos da cidade de São Carlos (SP)

Foram feitas duas coletas em períodos distintos: sendo uma após um longo período de estiagem (agosto/setembro-2010) e outra depois de um período chuvoso (fevereiro/março-2011) de acordo com dados das Tabela 17 e 18 que demonstram os índices pluviométricos dos períodos de coletas das amostras. As coletas foram realizadas em dois períodos durante o dia, um no período da manhã e outro no período da tarde, já que nestes dois períodos há uma maior probabilidade de lançamento clandestino de esgoto sanitário nos córregos da cidade. Os pontos de coletas escolhidos estão localizados em área onde há uma maior densidade populacional.

Tabela 17 – Índice pluviométrico dos meses de agosto e setembro de 2010 (Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas, 2010)

Semana	Precipitação (mm)	Armazenamento (mm)	Evapotranspiração real (mm)
02/08/2010 a 08/08/2010	6,0	23	9
09/08/2010 a 15/08/2010	0,0	20	3
16/08/2010 a 22/08/2010	0,0	17	3
23/08/2010 a 29/08/2010	0,0	14	3
30/08/2010 a 05/09/2010	0,0	12	2
06/09/2010 a 12/09/2010	9,2	11	10
13/09/2010 a 19/09/2010	0,0	8	3
Total de precipitação	15,2		

Tabela 18 - Índice pluviométrico dos meses de fevereiro e março de 2011 (Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas, 2010)

Semana	Precipitação (mm)	Armazenamento (mm)	Evapotranspiração real (mm)
07/02/2011 a 13/02/2011	27,2	96	32
14/02/2011 a 20/02/2011	56,3	100	31
21/02/2011 a 27/02/2011	134,4	100	31
28/02/2011 a 06/03/2011	150,4	100	23
07/03/2011 a 13/03/2011	74,9	100	23
14/03/2011 a 20/03/2011	4,4	81	24
21/03/2011 a 27/03/2011	2,4	65	18
Total de precipitação	450		

Observa-se por meio dos índices pluviométricos que o total de precipitação nos meses de fevereiro e março de 2011 foi de 450mm, este valor é muito maior em relação ao acúmulo de chuva nos meses de agosto e setembro de 2010 que apresentou um acúmulo na precipitação de 15,2mm. Esta diferença de precipitação entre os períodos de coleta considerados na análise das amostras, já que o comportamento dos corpos hídricos muda de acordo com o volume de precipitação ocorrido no período de estudo.

Os córregos da cidade de São Carlos são classificados como de classe 4 de acordo com o Decreto nº 10.755/77 do estado de São Paulo, que classifica os corpos de água receptores na classificação prevista no Decreto nº 8.468/76⁴³ (Rio Monjolinho desde a confluência com o Córrego do Gregório até a confluência com o Ribeirão Jacaré-Guaçu, no Município de São Carlos). Já a resolução do CONAMA nº 357/05⁴², estabelece para a classe 4 valores acima de 2,0mgL⁻¹ de oxigênio dissolvido (OD) como aceitáveis, além de pH entre 6,0 e 9,0. Os valores de oxigênio dissolvido (OD) e o pH das amostras estão apresentados nas Tabelas de 19 e 20.

Tabela 19 – Oxigênio dissolvido, temperatura e pH das amostras coletadas no mês de setembro de 2010.

Pontos	pH	Temperatura (°C)	Oxigênio Dissolvido (mg.L ⁻¹)
Ponto 1	6,82	21,4	9,81
Ponto 2	6,95	22,4	6,50
Ponto 3	8,11	20,8	8,62
Ponto 4	7,34	21,5	7,42
Ponto 5	7,39	21,6	7,10

Tabela 20 - Oxigênio dissolvido, temperatura e pH das amostras coletadas no mês de março de 2011.

Pontos	pH	Temperatura (°C)	Oxigênio Dissolvido (mg.L ⁻¹)
Ponto 1	6,80	21,9	5,67
Ponto 2	6,87	20,9	6,45
Ponto 3	7,68	21,2	6,30
Ponto 4	7,25	21,8	7,61
Ponto 5	7,38	21,6	8,73

Observa-se que o pH das amostras nos pontos selecionados ficaram na faixa de 6 a 9 o que obedece as Resolução CONAMA nº 357/05 para o tipo de classe que encontram-se os córregos da cidade de São Carlos. Os valores de oxigênio dissolvido (OD) ficaram acima de $2,0\text{mgL}^{-1}$, valor mínimo aceitáveis pelo Decreto nº 8.468/76 do estado de São Paulo e Resolução CONAMA nº 357/05.

Não foi observada a presença dos fármacos diclofenaco, nimesulida e paracetamol nas amostras de água coletadas dos córregos da cidade de São Carlos até o limite de detecção do método utilizando HPLC/DAD. Em outros trabalhos feitos anteriormente não foi possível determinar tais fármacos nos limites de detecção propostos por eles^{7,19,32}.

Para que fosse feito o controle de qualidade (CQ) de amostras, algumas delas escolhidas aleatoriamente e fortificadas nas concentrações 0,5; 1,1;10; 30 e $50\ \mu\text{g L}^{-1}$ para o diclofenaco, 0,2; 0,4; 1,0; 10 e $50\ \mu\text{g L}^{-1}$ para a nimesulida e 0,4; 0,8; 1,6; 45 e $75\ \mu\text{g L}^{-1}$ para o paracetamol.

Os cromatogramas obtidos após a análise destas amostras fortificadas são apresentados pelas Figuras de 22 a 24.

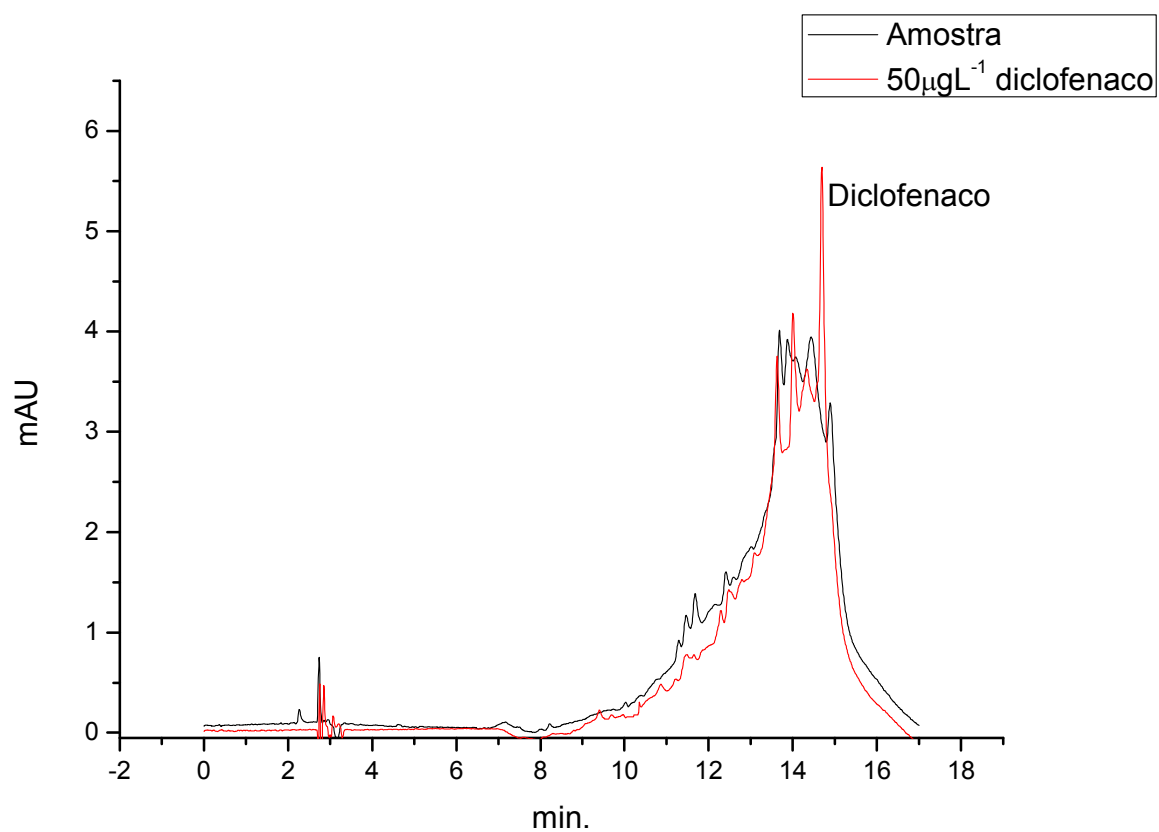


Figura 22 – Amostra de água da coleta de março fortificada com diclofenaco.

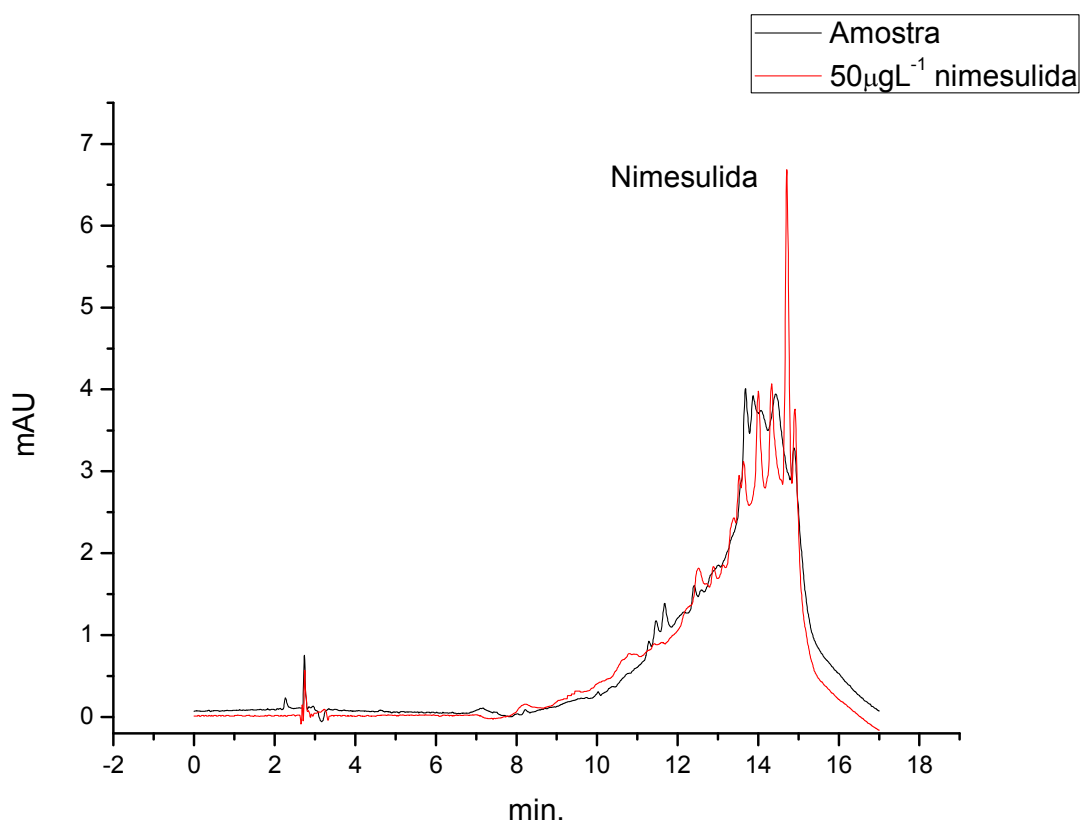


Figura 23 – Amostra de água da coleta de março fortificada com nimesulida.

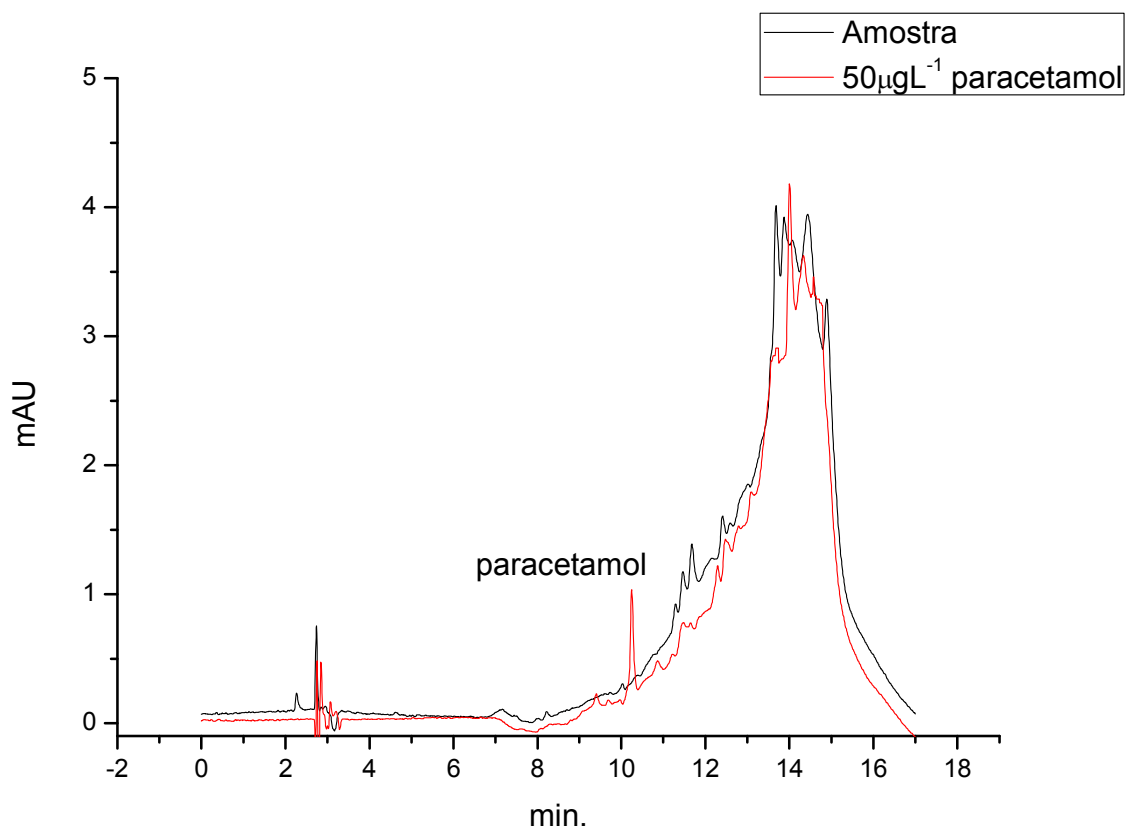


Figura 24 – Amostra de água da coleta de março fortificada com paracetamol.

Como pode ser observado nos cromatogramas apresentados nas Figuras de 22 a 24, após feito o controle de qualidade nas amostras coletadas no mês de março, só é possível a identificação dos sinais dos fármacos após a fortificação da amostra o que justifica a ausência dos três fármacos nas amostras estudadas. Desta forma não é possível estabelecer uma relação entre os dois períodos amostrados. Segundo o método proposto, não foi possível estabelecer uma relação entre o período de estiagem e outro após um longo período de chuvas. Nem ao menos pode-se estabelecer uma relação entre os períodos da manhã e da tarde dentro do mesmo dia, pois nenhuma das amostras continham os fármacos estudados de acordo com o método empregado neste estudo como observado após a realização do controle de qualidade (CQ) em algumas amostras

escolhidas aleatoriamente entre as com maiores chances de encontrar os resíduos dos fármacos estudados.

6. TRABALHOS FUTUROS

Como trabalho futuro desta pesquisa, deverá ser feito a análise das amostras coletadas, utilizando HPLC/MS, já que esta técnica apresenta limite de detecção mais baixo se comparado com o HPLC/DAD, o que possibilitaria analisar amostras que contenham baixas concentrações que podem atingir valores na escala de ngL^{-1} , o que provavelmente é o caso dos pontos amostrados neste estudo. Além destas análises deverão ser feitas modificações no método de extração, como por exemplo, a diminuição do volume de solvente utilizado nas etapas de condicionamento e eluição das amostras, bem como a mudança do tipo do solvente utilizado visando os princípios da Química Verde e o uso de solventes considerados menos tóxicos ao meio ambiente.

7. CONCLUSÃO

O método foi validado de acordo com a norma DOQ-CGCRE-008, do Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO) conseguindo-se limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) baixos e possíveis de ser usados em amostras ambientais. O método mostrou-se seletivo frente à interferentes que possam estar presente em amostras ambientais. Os valores dos coeficientes de correlação lineares (R^2) apresentaram valores bem próximo de uma unidade, o que demonstra que o método é capaz de comportar-se linear em diferentes faixas de concentração. Com valores de exatidão variando entre 97,94 e 101,46% com desvios padrões relativos (DPR) abaixo de 15% mostrou que o

método pode ser considerado preciso e exato. Porém nas análises das amostras de água dos córregos da cidade de São Carlos feitas utilizando HPLC/DAD, não indicaram a presença dos fármacos diclofenaco, nimesulida e paracetamol até o limite de detecção do método desenvolvido, validado e empregado para análise dos referidos fármacos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. TUNDISI, J. G. **Água no século XXI: enfrentando a escassez**. e. São Carlos: Rima, 2005.p.248
2. BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, v. 26, p. 523-530, 2003.
3. HERNÁNDEZ, F.; SANCHO, J.V.; IBÁÑEZ, M.; GUERRERO, C. Antibiotic residue determination in environmental waters by LC-MS. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, p. 466-485, 2007.
4. RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; DE ALDA, M.J.L.; BARCELÓ, D. Advantages and limitations of on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography–mass spectrometry technologies versus biosensors for monitoring of emerging contaminants in water. **Journal of Chromatography A**, v. 1152, p. 97-115, 2007.
5. TERNES, T. A. Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 20, p. 419-434, 2001.
6. CASTIGLIONI, S.; FANELLI, R.; CALAMARI, D.; BAGNATI, R.; ZUCCATO, E. Methodological approaches for studying pharmaceuticals in the environment by comparing predicted and measured concentrations in River Po, Italy. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 39, p. 25-32, 2004.
7. HALLING-SORENSEN, B.; NIELSEN, S.N.; LANZKY, P.F.; INGERSLEV, F.; LIITZHOFL, H.C.H.; JORGENSEN, S.E. Occurrence, Fate and Effects of Pharmaceutical Substances in the Environment - A Review. **Chemosphere**, v. 36, p. 357-393, 1998.
8. HILTON, M. J.; THOMAS, K.V. Determination of selected human pharmaceutical compounds in effluent and surface water samples by high-performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1015, p. 129-141, 2003.
9. HEBERER, T. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. **Toxicology Letters**, v. 131, p. 5-17, 2002.
10. BOCK, L.; TARANTINO, M. Atração: o brasileiro exagera nos remédios, consumido-os sem consultar o médico e colocando sua saúde em risco. **Revista Isto é**, p. 80-85., 2001.
11. RAIMUNDO, C. C. M. **Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos nas águas superficiais da bacia do rio Atibaia**. 2007. 126 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas 2007.

12. KOT-WASIK, A.; DEBSKA, J.; NAMIESNIK, J. Analytical techniques in studies of the environmental fate of pharmaceuticals and personal-care products. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, p. 557-568, 2007.
13. SUCHARA, E. A. **Desenvolvimento de metodologias analíticas para determinação de fármacos em fluidos biológicos e amostras ambientais por cromatografia líquida e gasosa.**2007. 145 f. Tese (Doutorado em Química) - Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.
14. BOUND, J. P.; VOULVOULIS, N. Pharmaceuticals in the aquatic environment - a comparison of risk assessment strategies. **Chemosphere**, v. 56, p. 1143 -1155, 2006
15. MIAO, X.; KOENIG, B.G.; METCALFE, C.D. Analysis of acidic drugs in the effluents of sewage treatment plants using liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 952, p. 139-147, 2002
16. STUMPF, M.; TERNESA, T.A.; WILKENA, R.; RODRIGUES, S.V.; BAUMANN, W. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **The Science of the Total Environment**, v. 225, p. 135-141, 1999.
17. BOYD, G. R.; PALMER, J.M.; ZHANG, S.; GRIMM, D.A. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and endocrine disrupting chemicals (EDCs) in stormwater canals and Bayou St. John in New Orleans, Louisiana, USA. **Science of the Total Environment**, v. 333, p. 137-148, 2004.
18. HIRSCHA, R.; TERNESA, T.; HABERER, K.; KRATZ, K. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. **The Science of the Total Environment**, v. 225, p. 109-118, 1999.
19. GHISELLI, G. **Avaliação da Qualidade das Águas Destinadas ao Abastecimento Público na Região de Campinas: Ocorrência e Determinação dos Interferentes Endócrinos (IE) e Produtos Farmacêuticos e de Higiene Pessoal (PFHP).**2006. 190 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.
20. WEIGEL, S.; KALLENBORN, R.; HÜHNERFUSS, H. Simultaneous solid-phase extraction of acidic, neutral and basic pharmaceuticals from aqueous samples at ambient (neutral) pH and their determination by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1023, p. 183-195, 2004.
21. THOMAS, K. V.; HILTON, M.J. The occurrence of selected human pharmaceutical compounds in UK estuaries. **Marine Pollution Bulletin**, v. 49, p. 436-444, 2004.
22. LÖFFLER, D.; TERNESA, T.A. Determination of acidic pharmaceuticals, antibiotics and ivermectin in river sediment using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1021, p. 133-144, 2003.

23. MULLER, J. J. A. Disponível em: <www.rivn.nl/bibliotheek/rapporten> . Acesso em: 10 maio 2010.
24. GÓMEZ, M. J.; BUENO, M.J.M.; LACORTE, S.; FERNÁNDEZ-ALBA, A.R.; AGÜERA, A. Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. **Chemosphere**, v. 66, p. 993-1002, 2007.
25. GÓMEZ, M. J.; AGÜERA, A.; MEZCUA, M.; HURTADO, J.; MOCHOLÍ, F.; FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. Simultaneous analysis of neutral and acidic pharmaceuticals as well as related compounds by gas chromatography–tandem mass spectrometry in wastewater. **Talanta**, v. 73, p. 314-320, 2007.
26. TAUXE-WUERSCH, A.; DE ALENCASTRO, L.F.; GRANDJEAN, D.; TARRADELLAS, J. Occurrence of several acidic drugs in sewage treatment plants in Switzerland and risk assessment. **Water Research**, v. 39, p. 1761-1772, 2005.
27. TRENHOLM, R. A.; VANDERFORD, B.J.; HOLADY, J.C.; REXING, D.J.; SNYDER, S.A. Broad range analysis of endocrine disruptors and pharmaceuticals using gas chromatography and liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Chemosphere**, v. 65, p. 1990-1998, 2006.
28. NEBOT, C.; GIBB, S.W.; BOYD, K.G. Quantification of human pharmaceuticals in water samples by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 598, p. 87-94, 2007.
29. PAILLER, J.-Y. A. K., L. PFISTER, L. HOFFMANN, C. GUIGNARD. Solid phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of sulfonamides, tetracyclines, analgesics and hormones in surface water and wastewater in Luxembourg. **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 4736–4743, 2009
30. ZGOŁA-GRZES´KOWIAK, A. Application of DLLME to Isolation and Concentration of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Environmental Water Samples. **Chromatographia**, v. 72, p. 671-678, 2010.
31. PETROVIC, M.; GONZALEZ, S.; BARCELÓ, D. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, p. 685-698, 2003.
32. AGUIAR, F. A. **Caracterização das propriedades do estado sólido do diclofenaco de sódio e avaliação destas propriedades no perfil in vitro de dissolução e no efeito farmacológico.** 2009. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP), Universidade de São Paulo, 2009.
33. BARRIENTOS-ASTIGARRAGA, R. E.; VANNUCHI, Y.B.; SUCUPIRA, M.; MORENO, R.A.; MUSCARÁ, M.N.; DE NUCCI, G. Quantification of nimesulide in human plasma by high-performance liquid chromatography/tandem mass

spectrometry. Application to bioequivalence studies. **Journal of mass spectrometry**, v. 36, p. 1281-1286, 2001.

34. DA CUNHA, A. C. B. **Desenvolvimento de procedimento analítico para determinação de fármacos e pesticidas em amostra aquosas ambientais** 2005. 111 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

35. QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C.H.; JARDIM, C.S.F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, p. 68-76, 2001.

36. BUCHBERGER, W. W. Novel analytical procedures for screening of drug residues in water, waste water, sediment and sludge. **Analytica Chimica Acta**, v. 593, p. 129-139, 2007.

37. VERBINNEN, R. T. **Estabelecimento de condições analíticas para determinação de hormônios estrógenos em água potável distribuída na cidade de São Luís-Ma.**2009. 95 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal do Maranhão, São Luís - MA, 2009.

38. CAMEL, V. Solid phase extraction of trace elements. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 58, p. 1177-1233, 2003.

39. LANÇAS, F. M. **Extração em fase sólida (SPE)**. São Carlos: RiMa, 2004. v.1.

40. SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. **Practical HPLC method development**. Nova York: John Wiley & Sons, 1997.p.10

41. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). **Orientação sobre validação de métodos analíticos (DOQ-CGCRE-008)**. Revisão 3. Brasília, 2010.

42. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE-CONAMA, **Decreto resolução Conama**, 357, Março, 2005

43. DEPARTAMENTO DE ÁGUAS E ENERGIA ELÉTRICA DO ESTADO DE SÃO PAULO, **Decreto 8.468**, Setembro, 1976

44. ALBERGUINI, L. B. A.; SILVA, L.C.; REZENDE, M.O.O. Laboratório de resíduos químicos do campus USP-São Carlos – resultados da experiência pioneira em gestão e gerenciamento de resíduos químicos em um Campus Universitário. **Química Nova**, v. 26, p. 291-295, 2003.

45. CASS, Q. B.; DEGANI, A.L.G. Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação. São Carlos: EdUFSCar, 2001.p.1-30