Lucas Sponton de Carvalho

Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para avaliação da remoção de sulfonamidas no tratamento de águas residuárias em reatores biológicos de leito fixo

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em ciências

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Álvaro José dos Santos Neto

São Carlos

2013

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

AGRADECIMENTOS

Primeiro a Deus, por me guiar e dar força nos momentos difíceis;

A minha família, por tudo que fizeram e fazem por mim até agora;

A minha namorada, Amanda: Meu amor, melhor amiga e fonte de inspiração. Por tolerar meus devaneios e loucuras e por me entender, aceitar e apoiar;

Ao meu orientador, professor Álvaro, pela sabedoria, amizade, conhecimento, compreensão e conselhos transmitidos durante esses mais de 3 anos;

Aos membros da banca pelas valiosas contribuições;

A Universidade de São Paulo e ao Instituto de Química de São Carlos pelo investimento (muitas vezes não reconhecido) na minha formação e por possibilitar que ela se estendesse a territórios além dos limites da sala de aula;

Aos professores Fernando Lanças e Marcelo Zaiat por fornecerem a estrutura necessária para o trabalho fosse plenamente desenvolvido;

Aos membros do Grupo de Cromatografia pela amizade conquistada durante os anos de trabalho. Não citarei nomes para não ser injusto e esquecer alguém;

Ao Guilherme, Maura, Rodrigo e Adriel pelas várias e valiosas horas de trabalho em conjunto;

Aos técnicos do laboratório, Guilherme e Elaine, por trabalharem brilhantemente pelo bom funcionamento do grupo;

A todos os amigos do IQSC pelo companheirismo durante os anos de graduação e mestrado.

A República Irmãos Metralha pela experiência e aprendizado gerados durante todos os anos de convívio;

A todos os meus amigos do CAASO, conquistados pelo trabalho em conjunto ou pelas conversas na arquibancada;

Aos meus amigos de Promissão, por entenderem e aceitarem a minha ausência nos momentos importantes;

A UCB Saúde Animal pela compreensão e profissionalismo e, em especial, ao Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento pelo aprendizado e amizade;

A CAPES, FAPESP (processo 2010/19910-9) e CNPq (processo 485370/2011-5) pelo apoio financeiro;

A todos que, direta ou indiretamente, me auxiliaram a seguir sempre em frente.

Com certeza não conseguiria sem todos vocês!

Obrigado!

“O único lugar em que sucesso vem
antes de trabalho é no dicionário”

RESUMO

A presença de antibióticos no ambiente evidencia o problema do descarte inadequado de resíduos farmacêuticos e da ineficiência dos atuais sistemas de tratamento de resíduos. Como consequência a essa contaminação há a possibilidade de resistência microbiana e de outros efeitos nocivos, ainda não completamente compreendidos, sobre a fauna e flora aquática. O presente trabalho teve como um dos objetivos desenvolver métodos de preparo de amostra e análise para avaliar o potencial de um reator anaeróbio de leito fixo para a remoção de sulfonamidas de matrizes complexas, além de investigar possíveis resíduos dessa classe em diversos compartimentos ambientais da cidade de São Carlos. Para isso, métodos utilizando extração em fase sólida (SPE) e cromatografia líquida (LC) foram desenvolvidos em associação à análise por espectrometria de massas. Os resultados mostraram que o reator utilizado consegue remover satisfatoriamente o composto investigado, podendo ser, futuramente, uma alternativa aos tratamentos convencionais. Tais resultados foram obtidos a partir do desenvolvimento e validação de um método utilizando detecção por um analisador híbrido do tipo quadrupolo-tempo de voo (SPE-LC-QTOF). Outro método, baseado em SPE-LC-QTRAP (analisador híbrido quadrupolo-aprisionador de íons linear), foi validado visando mostrar que existe contaminação por sulfonamidas e trimetoprima em águas de córregos coletadas em algumas regiões da cidade. Tal objetivo foi atingindo, permitindo inclusive a comparação entre as figuras de mérito obtidas durante a validação dos métodos, que indicou que os analisadores (e os sistemas utilizados, em geral) possuem diferenças significativas que influem em parâmetros como o efeito de matriz, os limites de quantificação e a sensibilidade. Paralelamente aos métodos convencionais, alternativas de preparo e análise que reduziam a necessidade de grandes volumes de amostra e solventes também foram desenvolvidos. A associação de técnicas miniaturizadas de preparo de amostra e análise permitiu que limites de detecção comparáveis aos dos métodos utilizando SPE fossem atingidos, utilizando, inclusive, o analisador do tipo tempo de voo. Dessa forma, um novo escopo de aplicações usufruindo das características deste último analisador poderá ser desenvolvido a partir da melhor pré-concentração proporcionada pelas estratégias de miniaturização estudadas.

ABSTRACT

The presence of antibiotics in the environment demonstrates the problem of improper drug disposal and inefficiency of the current water treatment systems. As a result of this contamination, there is the possibility of microbial resistance and other harmful effects, not totally understood, on the aquatic flora and fauna. The present study aimed to develop methods for sample preparation and analysis in order to evaluate the potential of an anaerobic fixed bed reactor for removing sulfonamides from complex matrices and, in addition, to investigate the presence of this class of contaminants in various environmental compartments of São Carlos. For this, methods using solid phase extraction (SPE) and liquid chromatography (LC), were developed in association with the analysis by mass spectrometry. The results showed that the reactor used can satisfactorily remove the compound investigated and may be, in future, an alternative to conventional treatments. These results were obtained from the development and validation of a method based on solid phase extraction associated with liquid chromatography coupled to mass spectrometry using a hybrid quadrupole-time of flight (SPE-LC-QTOF) analyzer. Another method that was also developed and validated, based on SPE-LC-QTRAP (hybrid quadrupole-linear ion trap), was useful to show that there is contamination by sulfonamides and trimethoprim in water collected from rivers in some areas of the town. This objective was achieved, inclusive allowing the comparison between the figures of merit obtained during the methods validation, which indicated that the analyzers (and the systems used, in general) have significant differences which that affect parameters as matrix effect and quantification limits.

In parallel with the conventional methods, alternatives of sample preparation and analysis that reduced the need of large volumes of sample and solvent were also developed.

The association of miniaturized techniques of sample preparation and analysis allowed detection limits comparable to that of methods using SPE, even using small volumes of sample and solvent and a less sensitive mass analyzer. Thus, a new scope of applications, taking advantage of the characteristics of the QTOF, can be developed from the higher pre-concentration provided by the strategies studied in this work.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Alguns possíveis caminhos de entrada dos fármacos no ambiente.....	18
Figura 2 – Levantamento bibliográfico realizado em 08/10/2013 na base de dados <i>Scopus</i> utilizando-se as palavras-chave <i>pharmaceuticals</i> e <i>environment</i> no título dos trabalhos.....	19
Figura 3 – Estrutura geral das sulfonamidas com atividade antimicrobiana.....	21
Figura 4 – Síntese de ácido fólico bacteriana, com representação de mecanismo competitivo de inibição de sulfonamidas e trimetoprima.....	23
Figura 5 – Diagrama de blocos ilustrando um sistema de cromatografia líquida convencional	25
Figura 6 – Exemplo da evolução da técnica de cromatografia líquida através das décadas, refletida no ganho em eficiência e produtividade das análises.....	27
Figura 7 – Fases estacionárias comumente empregadas em cromatografia líquida.	28
Figura 8 – Diagrama de blocos ilustrando a estrutura básica de um espectrômetro de massas.	29
Figura 9 – Representação de uma fonte de ionização por <i>electrospray</i>	30
Figura 10 – Ilustração simplificada de ionização por <i>electrospray</i>	31
Figura 11 – Representação de uma fonte de Ionização Química a Pressão Atmosférica	32
Figura 12 – Ilustração de um quadrupolo utilizado em MS	34
Figura 13 – Analisador por tempo de voo com entrada ortogonal dos íons a serem pulsados e com reflexão dos íons durante o voo.	35
Figura 14 – (a) Ion trap tridimensional (3D) (b) Ion trap linear (2D).....	36
Figura 15 – Princípio de funcionamento de analisadores sequenciais MS/MS (tipo sequencial no espaço).....	38
Figura 16 – Ganhos em detectabilidade em análises MS/MS	39
Figura 17 – Demonstração das etapas de extração por Extração em Fase Sólida. A amostra (a) é passada através da fase estacionária (c) previamente condicionada (b). Em seguida o cartucho é lavado (d) para eliminar os interferentes e os analitos são eluídos (e) com um solvente orgânico	41
Figura 18 – Formatos utilizados em SPE.....	42
Figura 19 – Modos de operação empregados em SPE.....	43
Figura 20 – (a) Modo de carregamento (b) Modo de eluição e análise	44
Figura 21 – Dispositivo comercial utilizado para a microextração por sorbente empacotado.	46
Figura 22 – Variação constante entre as réplicas de todos os pontos de uma curva analítica, exemplo de comportamento homocedástico	51
Figura 23 – Variação tendenciosa entre as réplicas de todos os pontos de uma curva analítica, exemplo de comportamento heterocedástico.....	51
Figura 24 – Esquema da coluna utilizada para a extração <i>online</i> . (a) Uniões utilizadas para conectar a coluna com o sistema cromatográfico, (b) Tela para retenção de partículas, (c) Tubulação utilizada para preenchimento com o leito particulado, (d) Ferrolho para a fixação e vedação da tubulação	68
Figura 25 – (a) Avaliação do fator de retenção (b) Avaliação da dessorção dos compostos..	70
Figura 26 – Biorreator utilizado no estudo.....	71

Figura 27 – Coletas realizadas na cidade de São Carlos	72
Figura 28 – Comparação entre os extratos dos brancos após o procedimento de extração utilizando três sorventes diferentes	79
Figura 29 – Influência do tamanho da partícula na limpeza do extrato	80
Figura 30 – Comparação da limpeza do extrato quando com e sem a fase HR-XA	82
Figura 31 – Avaliação da queda da concentração de SMX em reator RAHLF na concentração nominal inicial de alimentação de $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$	90
Figura 32 – Avaliação da queda da concentração de SMX em reator RAHLF na concentração nominal inicial de alimentação de $20,0 \mu\text{g L}^{-1}$	91
Figura 33 – Avaliação da queda da concentração de SMX em reator RAHLF na concentração nominal inicial de alimentação de $40,0 \mu\text{g L}^{-1}$	91
Figura 34 – Cromatogramas sobrepostos ilustrando os ganhos em detectabilidade do sistema capilar com detecção por UV. Do menor ao maior tempo de retenção: SCT, SDZ, STZ, SMR, SMT, SCZ, SMX e SDX.....	96
Figura 35 – Comparação entre curvas de van Deemter do sistema convencional e capilar	97
Figura 36 – Comparação entre sistemas de extração <i>online</i> . Do menor ao maior tempo de retenção: STZ, SMR, SMT, SCZ, SMX e SDX.	99
Figura 37 – Curva gerada para o sistema com injeção em <i>column switching</i>	100
Figura 38 – Curva gerada para o sistema com injeção direta.....	100
Figura 39 – Dispersão dos picos cromatográficos. Do menor para o maior tempo de retenção: SDZ+STZ+SMR, SMR, SMT, SCZ e SMX	101
Figura 40 – Fatores de retenção utilizando-se a pré-coluna com o sorvente Phenomenex Strata-X	102
Figura 41 – Avaliação da perda por dessorção da sulfacetamida durante a passagem da fase móvel na vazão de $30 \mu\text{L}.\text{min}^{-1}$	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais características de alguns analisadores de massa ^{50, 51, 56}	36
Tabela 2 – Comparação entre técnicas de preparo de amostra.....	46
Tabela 3 – Definições propostas por Chervet e Saito para classificar as escalas cromatográficas.....	47
Tabela 4 – Compostos utilizados durante o estudo. O pK_{a1} refere-se à protonação do grupamento amina ligado ao grupamento benzênico, enquanto o pK_{a2} refere-se à desprotonação da amida sulfônica (continua)	58
Tabela 5 – Fases extratoras utilizadas no estudo (continua)	60
Tabela 6 – Instrumentos, consumíveis e parâmetros cromatográficos principais utilizados durante o estudo	62
Tabela 7 – Instrumentos e parâmetros principais utilizados durante o estudo.....	63
Tabela 8 – Composição do esgoto sintético utilizado no estudo.....	65
Tabela 9 – Parâmetros avaliados na avaliação da robustez do método SPE-LC-QTOF	67
Tabela 10 – Parâmetros avaliados na avaliação da robustez do método SPE-LC-QTRAP.....	67
Tabela 11 – Gradientes de eluição nos sistemas de cromatografia líquida utilizados	74
Tabela 12 – Principais parâmetros utilizados para a análise por LC-MS/MS no sistema QTRAP (continua)	75
Tabela 13 – Método de extração preliminar	77
Tabela 14 – Recuperações de sulfonamidas (%) em sorventes utilizados em SPE.....	78
Tabela 15 – Valores de recuperação (%) na presença da matriz.	78
Tabela 16 – Valores de recuperação (%) quando se utilizam tamanhos de partícula distintos	80
Tabela 17 – Recuperação (%) dos analitos quando dois cartuchos são utilizados em sequência	81
Tabela 18 – Efeito de adição de reagentes ácidos e básicos no solvente de eluição na recuperação dos compostos de interesse	83
Tabela 19 – Variáveis físicas envolvidas no planejamento experimental.....	83
Tabela 20 – Variáveis químicas envolvidas no planejamento experimental	83
Tabela 21 – Método SPE desenvolvido	84
Tabela 22 – Resultados referentes ao estudo da linearidade do método SPE-LC-QTOF.....	85
Tabela 23 – Outras figuras de mérito avaliadas na validação do método SPE-LC-QTOF.....	85
Tabela 24 – Fatores que afetam a robustez do método SPE-LC-QTOF	86
Tabela 25 - Resultados referentes ao estudo da linearidade do método SPE-LC-QTRAP.....	87
Tabela 26 – Outras figuras de mérito avaliadas na validação da método SPE-LC-QTRAP. ..	88
Tabela 27 – Fatores que afetam a robustez do método SPE-LC-QTRAP	89
Tabela 28 – Compostos encontrados em rios da cidade ($ng\ L^{-1}$).....	92
Tabela 29 – Método preliminar para a MEPS utilizando Phenomenex Strata-XL como fase extratora.....	93
Tabela 30 – Avaliação de parâmetros importantes na MEPS	94
Tabela 31 – Variáveis físicas envolvidas no planejamento experimental.....	94

Tabela 32 – Variáveis químicas envolvidas no planejamento experimental	95
Tabela 33 – Comparação entre os sistemas convencional e capilar utilizando detecção por espectrometria de massas.	98
Tabela 34 – Método CS-cLC.....	103
Tabela 35 – Limites de detecção e quantificação encontrados para o método MEPS-CS-cLC-QTOF	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN – Acetonitrila (*acetonitrile*)

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APCI – Ionização Química à Pressão Atmosférica (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*)

BIN – *Barrel Insert and Needle*

BPL – Boas Práticas de Laboratório

CE – Energia de colisão (*Collision Energy*)

cLC – Cromatografia líquida capilar (*Capillary Liquid Chromatography*)

CS – Comutação de colunas (*Column Switching*)

CXP – Potencial de saída da cela de colisão (*Collision Cell Exit Potential*)

DC – Corrente contínua (*Direct Current*)

DLLME – Microextração líquido-líquido dispersiva (*Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*)

DNA – Ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic Acid*)

EIC – Cromatograma do íon extraído (*Extracted-Ion Chromatogram*)

ESI – Ionização por electrospray (*Electrospray Ionization*)

ETE – Estação de Tratamento de Esgoto

FDA – *Food and Drug Administration*

GC – Cromatografia Gasosa (*Gas Chromatography*)

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*)

ICH – *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

ISO – *International Organization of Standardization*

LD – Limite de detecção

LLE – Extração líquido-líquido (*Liquid-Liquid Extraction*)

LPB – Laboratório de Processos Biológicos

LPME – Microextração em fase líquida (*Liquid-Phase Microextraction*)

LQ – Limite de Quantificação

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MeOH – Metanol

MEPS – Microextração por sorvente empacotado (*Microextraction by packed sorbent*)

MS – Espectrometria de massas (*Mass Spectrometry*)

NATA – *National Association of Testing Authorities*

PS-DVB – Poliestireno-Divinilbenzeno

Q - Quadrupolo

RAHLF – Reator Anaeróbico Horizontal de Leito Fixo

RF – Radiofrequência (*radio frequency*)

RNA – Ácido ribonucleico (*Ribonucleic Acid*)

RSD – Desvio-padrão relativo (*Relative Standard Deviation*)

S/R – Razão Sinal/Ruído (*Signal to noise ratio*)

SBSE – Extração por sorção em barra de agitação (*Stir Bar Sorptive Extraction*)

SCT – Sulfacetamida

SCZ – Sulfacoloropiridazina

SDX – Sulfadimetoxina

SDZ – Sulfadiazina

SE – Solução-Estoque

SI – Solução Intermediária

SIM – Monitoramento de íon selecionado (*Selected Ion Monitoring*)

SMR – Sulfamerazina

SMT – Sulfametazina

SMX – Sulfametoxazol

SMZ – Sulfametizol

SPE – Extração em fase sólida (*Solid Phase Extraction*)

SPME – Microextração em fase sólida (*Solid Phase Microextraction*)

SQN – Sulfaquinoxalina

SRM – Monitoramento de reações selecionadas (*Selected Reaction Monitoring*)

STZ – Sulfatiazol

TMP - Trimetoprima

ToF – Tempo de voo (*Time of Flight*)

UHPLC – Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (*Ultra High Performance Liquid Chromatography*)

UV – Ultraviolet (*Ultravioleta*)

VWSE – Extração por sorção nas paredes do frasco (*Vial Wall Sorptive Extraction*)

SUMÁRIO

1 Introdução.....	17
1.1 Fármacos no ambiente.....	17
1.2 Sulfonamidas	21
1.3 Cromatografia Líquida e Espectrometria de Massas	24
1.4 Preparo de amostras	39
1.5 Miniaturização	45
1.6 Planejamento experimental.....	47
1.7 Validação de métodos analíticos.....	48
2 Objetivos	56
3 Experimental.....	57
3.1 Materiais e instrumentação	57
3.1.1 Padrões analíticos, solventes e reagentes	57
3.1.2 Consumíveis utilizados no preparo de amostra	60
3.1.3 Equipamentos.....	62
3.2 Métodos aplicados.....	64
3.2.1 Comparação entre os sistemas cromatográficos	64
3.2.2 Preparo de amostra	65
3.2.2.1 Métodos off-line	65
3.2.2.1.2 Validação dos métodos analíticos	66
3.2.2.3 Método online	68
3.1.1.3.1 Confecção das colunas de extração	68
3.1.1.2.2 Caracterização da capacidade de extração do sistema <i>online</i>	68
3.1.3. Aplicações.....	70
3.1.3.1 Avaliação da remoção de SMX utilizando um reator de leito fixo	70
3.1.3.2 Aplicações em efluentes reais	71
4 Resultados e discussão	73
4.1 Desenvolvimento dos métodos de análise e detecção	73
4.2 <i>SPE off-line</i>	77
4.2.1 Desenvolvimento.....	77
4.2.2 Validação dos métodos utilizando SPE.....	84

4.2.2.1 Aplicações dos métodos desenvolvidos	89
4.2.2.1.1 Avaliação do potencial do biorreator na remoção de SMX.....	89
4.2.2.1.2 Análise de amostras reais.....	92
4.3 Desenvolvimento da MEPS.....	92
4.4 Miniaturização das condições cromatográficas	95
4.5 SPE <i>online</i>	98
4.5.1 Caracterização das colunas	98
4.5.2 Desenvolvimento do método de análise por SPE <i>online</i>	103
4.6 Associação entre MEPS, SPE <i>online</i> e cromatografia capilar.....	104
5 Conclusões.....	106
6 Referências Bibliográficas	107

1 Introdução

1.1 Fármacos no ambiente

O rápido crescimento populacional e as transformações econômicas ocorridas no fim do século XIX alavancaram o desenvolvimento industrial e introduziram grandes avanços tecnológicos na sociedade, além de profundas reformas político-culturais. O início das linhas de produção possibilitou a redução de custos de produtos que antes eram destinados apenas aos núcleos sociais mais altos, tornando-os acessíveis às classes menos favorecidas.

Nesse contexto, a química tomou posição de destaque no cenário tecnológico global dado a sua presença em todos os produtos e bens de consumo que se tornaram indispensáveis à humanidade. Milhares de toneladas de alimentos, combustíveis, fármacos e outros materiais passaram a ser produzidos diariamente por grandes conglomerados industriais, alavancando também o desenvolvimento científico na busca de processos químicos cada vez mais eficientes e rentáveis.

No entanto, o enorme crescimento da produção e do mercado não foi acompanhado pela criação de políticas de segurança e controle de muitos desses processos e pelo tratamento dos possíveis subprodutos gerados, que muitas vezes são tóxicos e de difícil descarte. A sociedade civil e as autoridades governamentais passaram a atentar-se à forma em que esses resíduos eram tratados, principalmente após grandes desastres¹⁻³ entre as décadas de 60 e 80, que causaram prejuízos sociais, ambientais e financeiros expressivos.

No setor industrial, o ramo farmacêutico destaca-se mundialmente por oferecer medicamentos, cosméticos e produtos de higiene pessoal que estão difundidos e enraizados em todos os núcleos sociais. Esse mercado movimentará em 2014, segundo estimativa da IMS Health Market⁴, mais de 900 bilhões de dólares. Nessa área o Brasil é o sexto colocado no ranking mundial de consumo, com mais de 30 bilhões anuais em receita.

Os fármacos, em sua maioria, estão compreendidos em um grande e variado grupo de compostos orgânicos com mecanismos de ação extremamente complexos no organismo e cuja presença no ambiente em baixíssimas concentrações é constantemente relatada.⁵⁻¹⁰ Tal fato se deve às diversas fontes de contaminação, que a partir de caminhos extremamente complexos acabam por ter o meio aquático como destino final majoritário, como pode ser visto pela Figura 1.

Figura 1 – Alguns possíveis caminhos de entrada dos fármacos no ambiente

Fonte: Adaptado de 7 e 11

Os primeiros trabalhos que apresentaram os fármacos como potenciais contaminantes datam da década de 70, realizados por Garrison¹² na América do Norte e Azarnoff¹³ na Europa. Ambos apontavam a presença de ácido acetilsalicílico e cloro-fenoxi-isobutirato em estações de tratamento de efluentes. Entretanto, o assunto entrou de fato em evidência no meio científico na década de 90, quando alguns trabalhos apresentaram a possibilidade de peixes adquirirem características hermafroditas na presença de compostos estrogênicos mesmo em baixíssimas concentrações. Além disso, outros estudos consideraram a influência de antidepressivos como a fluoxetina também em organismos aquáticos.¹⁴⁻¹⁸ Tais resultados, juntamente com o desenvolvimento de técnicas analíticas com maior poder de detecção, aumentaram significativamente o número de publicações nas décadas posteriores, como é

possível se observar na Figura 2. Atualmente, diversas evidências apontam a influência direta de tais xenobióticos para a formação de resistência em microrganismos¹⁹ e alterações morfo e fisiológicas em espécies aquáticas e terrestres.²⁰

Figura 2 – Levantamento bibliográfico realizado em 08/10/2013 na base de dados *Scopus* utilizando-se as palavras-chave *pharmaceuticals* e *environment* no título dos trabalhos

A maior fonte de resistência microbiana advém dos antibióticos. Tais compostos, que podem ser naturais, sintéticos ou semissintéticos, são utilizados para tratamento ou prevenção de doenças geradas por microrganismos. São fonte de ampla discussão devido à possibilidade de representarem um risco à saúde humana e animal se administrados incorretamente, principalmente pela seleção de cepas imunes à sua ação e por reações alérgicas em humanos e animais.^{21,22} Dentre as diversas classes de antibióticos destacam-se as sulfonamidas, fluoroquinolonas, macrolídeos, penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e aminoglicosídeos.

O monitoramento de contaminantes de uso terapêutico em diversos compartimentos aquáticos não ilustra apenas a problemática do descarte inadequado desses fármacos e

correlatos, mas também a ineficiência das estações de tratamento de efluentes (ETEs) convencionais em removê-los completamente do meio ambiente.

O processo de tratamento, de um modo geral, consiste em uma etapa preliminar de retenção de sólidos grosseiros provenientes do sistema de esgoto e de um sistema responsável pela decomposição biológica da matéria orgânica. O processo biológico convencional utiliza lodo ativado contendo microrganismos aeróbios da biota local, o que gera diferentes perfis de remoção para diversos compostos orgânicos.⁸ Devido a isso, grande parte dos fármacos apresentam comportamentos variados em regiões diferentes do planeta que fazem o mesmo tipo de tratamento ou que possuem variações estruturais simples de suas plantas. Essa constatação foi feita por Le-Minh e colaboradores, em trabalho que avaliava exclusivamente antibióticos. Nele os autores atentam-se à ineficácia de alguns processos comumente utilizados e à inconsistência dos estudos atuais, que impossibilitam uma avaliação exata sobre essa remoção.⁸

Heberer concluiu, após levantamento e análise dos principais meios aquáticos de Berlin, que muitos dos compostos que passavam pelas ETE's são resistentes ao tipo de tratamento local e contaminam o solo e aquíferos subterrâneos.⁹ Em outra revisão, mostrou que alguns grupos de fármacos, como analgésicos e anti-inflamatórios, conseguem ser eficientemente removidos durante o processo de tratamento, embora exceções, como o diclofenaco, possuam degradação efetiva apenas com o auxílio de processos foto-degradativos. Outras classes, como antiepiléticos, também possuem baixas taxas de remoção nos tratamentos convencionais.⁷

Além da relativa ineficiência e da inconsistência dos resultados, os tratamentos comumente empregados geram uma grande quantidade de lodo, que necessita de intervenções adequadas em seu manejo e descarte devido a alguns de seus componentes, que são tóxicos (como metais e patógenos).⁴¹ Por isso, diversas alternativas são estudadas visando suprir essas limitações, destacando-se técnicas que consomem pouco espaço físico e possuem alta eficiência de remoção, como sistemas de filtração com membranas e processos de adsorção por carvão ativado, além de tratamentos químicos, fotoquímicos e foto-oxidativos. Porém, a eficiência de tais técnicas em escalas reais ainda é fruto de discussão, uma vez que existem poucos trabalhos sobre o tema.⁸

Uma alternativa à forma comumente empregada nas ETEs consiste na utilização da biomassa, responsável pela digestão da maioria dos compostos presentes no efluente, de forma fixa. Com essa modificação é possível obter uma maior concentração e retenção celular, que são parâmetros importantíssimos para processos anaeróbicos, além de inibir seu

crescimento, reduzindo a demanda por grandes espaços.⁴¹ Ademais, o equilíbrio entre os microrganismos presentes é favorecido devido à formação espacial das colônias no suporte preexistente. Porém, em comum às outras técnicas de tratamento, a carência de experimentos para comprovar sua eficácia em escalas convencionais ainda é um obstáculo.

1.2 Sulfonamidas

As sulfonamidas destacam-se por serem antimicrobianos utilizados tanto na medicina humana quanto animal. Atuam contra um vasto espectro de bactérias gram-positivas e gram-negativas, além de possuir propriedades antifúngicas, antiprotozoárias e herbicidas quando utilizadas em associação com outros compostos.²¹⁻²⁶ Foram os primeiros compostos utilizados seletivamente como antibacterianos, no início da década de 30. Estima-se que, hoje, 2,3% do consumo mundial de antibióticos (cerca de 16.000 toneladas) seja dessa classe.²⁷

As sulfonamidas que possuem atividade antimicrobiana possuem uma estrutura genérica similar à mostrada na Figura 3. São amidas derivadas de ácidos sulfônicos ligados a um grupamento amino aromático com uma grande variedade de radicais, o que possibilita que a classe possua um amplo espectro de ação.

Figura 3 – Estrutura geral das sulfonamidas com atividade antimicrobiana

São moléculas polares com características anfóteras: o nitrogênio ligado diretamente ao anel benzênico é protonado em meios ácidos (pK_{a1} , entre pH 2 a 3), enquanto o que compõe o grupamento amida desprotona-se entre pH 4,0 e 11 (pK_{a2}).²⁸ Classificam-se como moléculas de baixa massa molecular (geralmente entre 170 e 400 Da) com alta solubilidade em água. Devido a isso, as sulfonamidas são pouco adsorvidas em materiais sólidos, tornando-se altamente dispersas no ambiente aquático, como mostrado em diversos estudos disponíveis na literatura.²⁹ São altamente resistentes a foto e termo degradações, possuindo uma meia-vida média maior que um ano em muitos casos.²⁷

Seu mecanismo de ação baseia-se na inibição competitiva do sítio ativo da enzima dihidropteroato sintetase, que catalisa a conversão de ácido *p*-aminobenzóico em ácido dihidropteróico. Ele, por sua vez, é precursor da síntese de ácido tetrahidrofólico, que é um dos responsáveis pela formação de ácidos nucleicos e, conseqüentemente, do DNA e RNA. Além disso, as sulfonamidas modificam a permeabilidade da parede celular e impedem a entrada de ácido glutâmico, responsável direto pela formação de ácido fólico. As sulfonamidas são comumente associadas com trimetoprima, um antibiótico da classe das pirimetaminas que possui a capacidade de inibir, também por mecanismo competitivo, a síntese do ácido tetrahidrofólico.³⁸ A rota de síntese do ácido, bem como as principais rotas de inibição, são mostradas na Figura 4.

Figura 4 – Síntese de ácido fólico bacteriana, com representação de mecanismo competitivo de inibição de sulfonamidas e trimetoprima

Fonte: Adaptado de 27

Diversos trabalhos apontam a presença de sulfonamidas e seus metabólitos em rios, bacias e outros tipos de águas superficiais e subterrâneas na América, Europa e Ásia, destacando-se, inclusive, a contaminação de águas minerais comerciais.³⁰⁻³⁴ Adicionalmente, altas concentrações em carnes (suína, bovina e aviária) e vegetais (devido, principalmente, à fertilização com esterco) também foram relatadas.³⁵⁻³⁷

Os microrganismos adquirem resistência aos mecanismos de ação das sulfonamidas principalmente pela alteração da seletividade do sítio ativo da enzima dihidropteroato sintetase, impossibilitando a interação seletiva do composto, e pela criação de novas rotas

para a síntese do ácido fólico.²⁷ A presença de microrganismos resistentes pode ser determinada a partir da detecção dos genes que conferem essa característica, que estão distribuídos em organelas móveis, como plasmídeos, transposons e integrons. No caso das sulfonamidas, os genes mais comuns são os *sul1*, *sul2* e *sul3*, que são os responsáveis pela diminuição da afinidade pelo sítio ativo utilizado pelo ácido para-aminobenzóico.^{21,40}

1.3 Cromatografia Líquida e Espectrometria de Massas

O uso da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) associada a Espectrometria de Massas (*Mass Spectroscopy*, MS) tornou-se a forma mais apropriada para separar, detectar e quantificar fármacos em matrizes ambientais.

Os primórdios das análises cromatográficas surgiram na segunda metade do século XIX. Embora não totalmente elucidativas em relação aos mecanismos de separação, estudos realizados por Runge, Goppelsroeder e Reed já aplicavam os conceitos de separação para líquidos, sais, alimentos e corantes.⁴²

No entanto, o crédito pelo “descobrimento” da técnica e pelo seu uso como ferramenta analítica foi dado ao botânico russo Mikhael Semenovitch Tsweet, que a partir dos estudos de Goppelsroeder sobre capilaridade de solventes e de seus conhecimentos sobre processos adsorptivos, desenvolveu um experimento utilizando uma coluna de vidro preenchida com diversos materiais de suporte (como carbonato de cálcio, açúcar pulverizado e inulina) para a separação de pigmentos presentes em plantas. Seu trabalho foi publicado em 1906 em uma revista de botânica alemã e, devido a essas características na obtenção da separação, recebeu o nome de cromatografia, que do grego (*chroma* e *grafein*) significa “escrita em cores”. Outra versão para essa escolha, mais egocêntrica, sugere que o termo é um trocadilho com o seu próprio nome, “LIBET”, que significa “cor” em russo.⁴³

O uso da cromatografia entrou em evidência novamente na década de 30, quando Lederer utilizou de seus princípios para analisar xantofilas presentes em ovos.⁴⁴ No entanto, a potencialidade da técnica não foi seriamente considerada até a década de 40, quando Martin e Synge passaram a estudar exaustivamente sua aplicabilidade, apresentando novas possibilidades de separação e aprofundando seus aspectos teóricos a partir de conceitos já consolidados em processos de destilação.⁴⁵ Introduziram o termo “cromatografia por partição”, obtendo a separação de compostos através de dois líquidos imiscíveis entre si,

sendo o líquido percolado pela coluna chamado de fase móvel e o adsorvido em um suporte chamado de fase estacionária. Partindo do mesmo princípio, Synge obteve bons resultados utilizando vapor como fase móvel, introduzindo a técnica gás-líquido e abrindo portas para o desenvolvimento da cromatografia em fase gasosa (*Gas Chromatography*, GC).^{46, 47} Tais contribuições foram reconhecidas com o prêmio Nobel de Química para ambos em 1952.

O desenvolvimento da técnica, no entanto, esbarrava nas limitações instrumentais da época, passando a ser aperfeiçoada apenas nos anos 60 com empresas como Waters e DuPont, que começaram a produzir e comercializar os primeiros instrumentos.⁴⁷ A entrada de novos concorrentes no mercado acelerou esse desenvolvimento e, conseqüentemente, gerou uma maior fonte de informação e tecnologia, fazendo com que o termo HPLC, antes utilizado em referência às altas pressões utilizadas, passasse a ser usado em referência à alta eficiência de separação. A Figura 5 ilustra, em linhas gerais, o arranjo de um cromatógrafo líquido atual. O sistema de bombeamento envia a fase móvel para dentro do equipamento, passando pelo injetor (que pode ser automático ou manual) e enviando a amostra a ser analisada para a coluna analítica, que geralmente fica alocada dentro de um compartimento que mantém a temperatura controlada.

Figura 5 – Diagrama de blocos ilustrando um sistema de cromatografia líquida convencional

Após o processo de separação cromatográfica os compostos vão para o sistema de detecção, que envia o sinal gerado para um sistema de processamento de dados e convertido na informação desejada. Um HPLC convencional trabalha com uma pressão máxima de 400 bar, o que faz com que o uso de partículas de baixo diâmetro seja limitado a até aproximadamente 2,5 μm . Apesar do indiscutível avanço em comparação com as partículas utilizadas anteriormente (aproximadamente 100 μm), e com o advento de partículas superficialmente porosas, que apresentam ganhos consideráveis em eficiência,^{103, 104} o desenvolvimento de sistemas com capacidade de suportar maiores pressões e com grande redução da dispersão extracoluma dos picos possibilitou o uso de partículas ainda menores, reduzindo o tempo de análise e aumentando consideravelmente a eficiência do processo. Atualmente, os sistemas de Ultra Eficiência (ou *Ultra High Performance Liquid Chromatography*, UHPLC) utilizando partículas até mesmo inferiores a 1,7 μm permitem a redução dos tempos de análise e apresentam ganhos notáveis em eficiência, como mostrado na Figura 6.

Figura 6 – Exemplo da evolução da técnica de cromatografia líquida através das décadas, refletida no ganho em eficiência e produtividade das análises

Fonte: Adaptado de 47

O desenvolvimento da instrumentação também foi acompanhado pela implantação de novos materiais utilizados como fase estacionária. Diferentemente dos primórdios, onde se trabalhava predominantemente em fase normal (ou seja, com a fase estacionária mais polar do que a fase móvel), a cromatografia líquida moderna trabalha preferencialmente em fase reversa, utilizando fases estacionárias quimicamente modificadas. Dentre as principais razões para essa mudança destacam-se:

- Menor toxicidade dos solventes utilizados: a composição dos solventes na fase normal é predominantemente composta por solventes orgânicos, como éter de petróleo e

hexano. De maneira oposta, a água é o solvente mais utilizado em fase reversa e é geralmente associada a metanol (MeOH) e acetonitrila (ACN), o que reduz consideravelmente a exposição do analista a substâncias tóxicas.

- Estabilidade das colunas: a alta polaridade da fase estacionária faz com que as interações com o analito sejam predominantemente adsorptivas, gerando, em muitos casos, ligações irreversíveis. Tal fato reduz o tempo útil da coluna e pode gerar falsos positivos/negativos durante a análise.

- Variedade de fases estacionárias: a possibilidade de sintetizar fases hidrofóbicas quimicamente ligadas propicia um leque maior de combinações e aumenta a seletividade da análise.

- Versatilidade de solventes utilizados: o intervalo de força eluotrópica dos solventes em fase reversa é maior do que os de fase normal, o que faz com que compostos com uma ampla faixa de polaridade consigam ser analisados.⁴⁸

As fases estacionárias mais utilizadas em HPLC em fase reversa são compostas por sílica quimicamente ligada a cadeias alquílicas, como C8 e C18 (Figura 7). Tais estruturas permitem que compostos com uma ampla faixa de polaridade e pK_a sejam analisados simultaneamente utilizando eluição por gradiente de fase móvel.

Figura 7 – Fases estacionárias comumente empregadas em cromatografia líquida.

Fonte: Adaptado de 63

Para análises ambientais, que avaliam matrizes de alta complexidade e cujos compostos de interesse estão presentes em baixíssimas concentrações, a escolha do detector é de suma importância. Por definição, um detector ideal deve possuir alta capacidade de detecção, responder adequadamente aos compostos analisados, possuir uma ampla faixa linear e fornecer informações qualitativas e quantitativas sobre o pico detectado. Tais características,

no entanto, dificilmente são encontradas em um único dispositivo, o que faz com que fatores como especificidade e detectabilidade tornem-se uma limitação.

A espectrometria de massas surgiu como uma alternativa a essa demanda e tornou-se uma ferramenta que ampliou o escopo da cromatografia.

A técnica foi originalmente criada por J. J. Thomson durante seu estudo sobre a natureza de raios catódicos. O instrumento por ele idealizado media a relação carga/massa (z/m) dos componentes do feixe, fornecendo suas cargas individualmente. Desse modo, Thomson obteve a primeira leitura da massa e da carga do elétron, descoberta que lhe rendeu o prêmio Nobel de Física de 1906. Esse trabalho fundamentou os experimentos futuros de Francis Aston, que utilizou os conceitos de Thomson para construir um novo equipamento que conseguia determinar as razões massa/carga de átomos carregados. Com isso, Aston conseguiu detectar a presença de isótopos – fato até então desconhecido – o que lhe concedeu o Nobel de Física de 1922.⁴⁹

A estrutura básica de um Espectrômetro de Massas é mostrada na Figura 8. A amostra, já em fase gasosa, é ionizada para que consiga responder a estímulos magnéticos e elétricos e então enviada para um analisador de massas que, dependendo de suas características, filtra ou separa os íons de interesse e os submete à detecção.

Figura 8 – Diagrama de blocos ilustrando a estrutura básica de um espectrômetro de massas.

Os requisitos para um satisfatório processo de ionização e acoplamento fez com que a cromatografia gasosa fosse a técnica preferencial para associação com a espectrometria de

massas. Dessa forma a HPLC, e todo o seu escopo de aplicações, manteve-se estagnada em relação à hifenização com MS até meados da década de 90, quando técnicas que permitem a ionização à pressão atmosférica (desenvolvidas em meados de 80 e início de 90) ganharam maior popularidade.^{51, 53 54} Dentre elas, destacam-se:

- Ionização por *Electrospray* (*Electrospray Ionization*, ESI): nela, o eluato da coluna cromatográfica adentra ao sistema de ionização através de um capilar que, influenciado por um campo elétrico gerado por uma diferença de potencial em relação a um contra eletrodo, produz um fino spray eletricamente carregado. Paralelamente, um fluxo de gás a alta temperatura auxilia na dessolvatação das gotas eletricamente carregadas (Figura 9) e libera os íons na fase gasosa. Embora não seja um processo totalmente elucidado, observa-se que a diminuição do volume das gotículas superficialmente carregadas faz com que a densidade de carga aumente a um ponto insustentável, causando sua ruptura em volumes menores. Como mostrado na Figura 10, esse processo acontece repetidas vezes até que as moléculas que são liberadas à fase gasosa recebem a carga da própria superfície da gota. Outro mecanismo sugere que o próprio campo gerado e um processo de partição permitam a dessolvatação (evaporação) de moléculas ionizadas a partir da própria superfície da gota devido à forte repulsão eletrônica dentro dela.

Figura 9 – Representação de uma fonte de ionização por *electrospray*

Fonte: Adaptado de 50

Figura 10 – Ilustração simplificada de ionização por *electrospray*

Fonte: Adaptado de 56

- Ionização Química à Pressão Atmosférica (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI*): nela o eluato da coluna cromatográfica passa por um processo de nebulização associado à ação de alta temperatura para transferir os compostos de interesse e os solventes para a fase gasosa. Sequencialmente, uma fonte de descarga de elétrons (chamada de *corona needle*, ou agulha corona) ioniza predominantemente as moléculas previamente evaporadas da fase móvel, devido a sua maior quantidade no meio. As moléculas ionizadas do solvente então reagem com os analitos de interesse e, conseqüentemente, os ionizam. A Figura 11 ilustra uma fonte de APCI.

Figura 11 – Representação de uma fonte de Ionização Química a Pressão Atmosférica

Fonte: Adaptado de 50

Como é possível se observar nas Figuras 9 e 11, as moléculas ionizadas passam por antecâmaras que reduzem progressivamente a pressão ambiente, removendo gotículas e outros compostos não ionizados, até a entrada do analisador.

Existem diversos analisadores de massa disponíveis, cada um com características que os distinguem e os tornam apropriados para uma série de aplicações. As principais características que devem ser levadas em consideração para a escolha apropriada de um analisador são:

- Faixa de massa/carga: O intervalo de m/z possível de ser analisado.
- Poder de resolução: Capacidade em distinguir íons de m/z próximas. Analisadores com alto poder de resolução são úteis principalmente para auxiliar na identificação da fórmula molecular. A equação que determina o poder de resolução de massas é dada por:

$$RP = m/\Delta m \quad (\text{Equação 1})$$

Onde m é a massa do composto de maior massa molecular e ΔM a diferença de massa entre os vizinhos. Assume-se que instrumentos de alta resolução devem possuir valores de RP maiores que 10.000. Entretanto, alguns instrumentos podem atingir valores superiores a 1.000.000.

- Faixa dinâmica linear: Faixa em que a concentração do composto de interesse consegue ser medida linearmente.

Dentre os analisadores disponíveis comercialmente, destacam-se:

- Quadrupolo: é o analisador mais utilizado devido ao seu relativo baixo custo. É formado por quatro hastes colocadas paralelamente entre si e cuja separação das m/z é obtida quando os íons adquirem uma trajetória estável através desse caminho dentre elas. Isso é possível pela ação de um campo elétrico oscilante, que é produzido por potenciais elétricos de corrente contínua (*Direct Current*, DC) e de radiofrequência (RF) ortogonais entre si, como mostrado na Figura 12. Razões m/z específicas são estabilizadas apenas com certas DC/RF, tornando-se capazes de atravessar longitudinalmente o quadrupolo. Ao mesmo tempo, todos os outros íons com m/z distintas daquela pré-selecionada não conseguem estabelecer uma trajetória estável, sendo removidos (filtrados) ao longo dessa travessia. Quando apenas uma razão DC/RF (ou pequeno conjunto selecionado de razões DC/RF) é aplicada durante toda a análise, diz-se que o equipamento opera no modo de monitoramento de íon selecionado - SIM (*Selected Ion Monitoring*). Outra opção de uso é o modo de varredura (scan), no qual a razão DC/RF é variada repetidamente no tempo, em uma faixa de valores, permitindo a estabilização sequencial e consequente mensuração de íons com diferentes m/z dentro de um intervalo. Por outro lado, quando o instrumento é operado apenas com o potencial de radiofrequência ativado, uma ampla faixa de íons com diferentes m/z são estabilizados simultaneamente, podendo atravessar longitudinalmente o quadrupolo. Nesse último modo o instrumento deixa de operar como um filtro de íons, funcionando como um guia para a condução simultânea de íons com diferentes m/z .

Figura 12 – Ilustração de um quadrupolo utilizado em MS

Fonte: Adaptado de 52

- Tempo de voo (*Time of Flight*, ToF): nesse tipo de analisador os íons de diferentes m/z são submetidos a um pulso inicial de aceleração e separados pelo tempo que levam para atravessar um tubo no vácuo, que está livre de influências eletromagnéticas. Quanto maior a m/z do íon analisado, maior o tempo para ele percorrer toda a distância de voo. A resolução do instrumento aumenta com o caminho disponível, uma vez que os íons levarão mais tempo para atravessá-lo e isso acentua as diferenças de m/z . Por isso, muitos instrumentos utilizam lentes para reflexão, que aumentam o caminho dos íons e contribuem para reduzir as diferenças de tempo que podem ocorrer quando íons de mesma m/z atingem o tubo com valores de energia cinética diferentes entre si (Figura 13). Isso acontece devido ao pulso que inicia o processo do ToF, que pode atingir moléculas de mesma m/z de maneira assimétrica.

Figura 13 – Analisador por tempo de voo com entrada ortogonal dos íons a serem pulsados e com reflexão dos íons durante o voo.

Fonte: Adaptado de 50

- (Quadrupolo) *Ion Trap*: esse analisador funciona como um aprisionador tridimensional de íons (3D) com princípios similares ao quadrupolo. Ele é composto por três eletrodos que são submetidos à ação de potenciais elétricos contínuos e de radiofrequência. A função dos potenciais é estabilizar e aprisionar íons, além de permitir que eles sejam, em função de suas m/z , ejetados para detecção ou isolados seletivamente para subsequente fragmentação (Figura 14.a). Visando mitigar o efeito de desestabilização devido à repulsão dos íons de mesma carga confinados em um espaço pequeno, versões lineares (2D) desse analisador estão disponíveis comercialmente, podendo atuar tanto no modo *ion trap* quanto no modo quadrupolar convencional (Figura 14.b.).

Figura 14 – (a) Ion trap tridimensional (3D)

(b) Ion trap linear (2D)

Fonte: Adaptado de 50

As principais características dos analisadores de massa mais comuns são mostradas na Tabela 1.

Tabela 1 – Principais características de alguns analisadores de massa^{50, 51, 56}

Parâmetros	Quadrupolo	<i>Ion Trap</i>	<i>Ion Trap</i> linear	TOF
Faixa de massas (Da)	4.000	4.000	4.000	Virtualmente Ilimitada
Poder de Resolução	4.000	1.000 a 10.000	1.000 a 10.000	> 10.000
Faixa dinâmica	10^7	10^2 a 10^5	10^2 a 10^5	10^2 a 10^6
Custo	\$	\$	\$\$	\$\$\$

Apesar dos ganhos expressivos em detectabilidade advindos da hifenização entre LC e MS, o uso de apenas um analisador de massas não soluciona problemas básicos, tais como:

- Baixa informação estrutural gerada pelas formas de ionização brandas da cromatografia líquida;
- A ausência da informação em relação à massa exata no caso do uso de analisadores de baixa resolução dificulta a qualificação do composto de interesse, uma vez que diversos íons interferentes podem ter a mesma relação m/z em uma amostra complexa;
- O ruído da linha de base (*background*) diminui significativamente a detectabilidade do instrumento quando apenas um analisador é utilizado, uma vez que interferentes com uma mesma m/z podem ser selecionados (quando se trata de um analisador do tipo quadrupolo ou

ion trap realizando uma análise no modo SIM) ou enviados para detecção (no caso de analisadores do tipo ToF ou analisadores operando no modo de radiofrequência).

Visando sanar essas deficiências, a utilização de analisadores de massa em sequência (chamados de *tandem* ou MS/MS) tornou-se uma importante ferramenta tanto para a análise de compostos em baixas concentrações quanto para aumento da seletividade na identificação. O princípio de operação de um instrumento de MS/MS é apresentado na Figura 15: após a ionização, íons de uma mesma m/z são selecionados pelo primeiro analisador (geralmente de baixa resolução) e submetidos à fragmentação em uma célula apropriada, geralmente por meio da colisão com um gás inerte (e.g. N₂ ou Ar). Os novos compostos, resultantes desse processo, são chamados de íons-produto, ou seja, são provenientes da fragmentação específica do íon do composto original. Após esse processo, um segundo analisador de massas permite a análise do que é formado, realizando o monitoramento seletivo de fragmentos de interesse ou simplesmente avaliando tudo o que foi gerado pelo processo. Em um analisador *ion trap*, todas essas etapas (isolamento, fragmentação e análise dos produtos) ocorrem no mesmo compartimento, sendo sequenciais no tempo. No caso de analisadores sequenciais no espaço, como triplo-quadrupolos, um primeiro quadrupolo (analisador 1) é responsável pelo isolamento. Na sequência ocorre a fragmentação por colisões, geralmente em um segundo quadrupolo que opera em modo RF (modo de transmissão de íons), enquanto um terceiro analisador também quadrupolar (quadrupolo 3) permite a análise do que é produzido na fragmentação. Atualmente existem diversos instrumentos híbridos para MS/MS, de maneira que operações sequenciais no tempo e no espaço podem ocorrer em um mesmo equipamento, bem como a associação sequencial de analisadores de baixa e alta resolução.

Figura 15 – Princípio de funcionamento de analisadores sequenciais MS/MS (tipo sequencial no espaço)

Fonte: Adaptado de 50

No caso de análises ambientais, onde se deseja a confirmação inequívoca dos compostos-alvo, a análise sequencial com um quadrupolo (ou *ion trap* linear) como segundo analisador é recomendada, principalmente pela capacidade em monitorar íons-produto que são específicos do íon precursor. Esse modo, conhecido como SRM (*Selected Reaction Monitoring*), é o mais utilizado, pois consegue qualificar com grande segurança o composto encontrado.

Em contrapartida, o analisador por tempo-de-voo é mais recomendado para análises que requeiram confirmações exatas de m/z , auxiliando no processo de elucidação estrutural, ou para estudos de compostos com alta massa molecular. Apesar de diversos íons serem perdidos durante o processo de análise por MS/MS, a redução significativa do ruído de fundo faz com que a detectabilidade aumente consideravelmente, uma vez que apenas íons específicos atingem a detecção. A visualização gráfica desse efeito é mostrada na Figura 16. Dessa forma, como os analisadores do ToF não possuem essa característica filtrante, seu uso em análises ambientais pode se tornar limitado.

Figura 16 – Ganhos em detectabilidade em análises MS/MS

Fonte: Adaptado de 55

1.4 Preparo de amostras

Apesar das melhorias em detectabilidade fornecidas pelo uso de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, as condições em que os fármacos são encontrados no ambiente exigem que uma série de etapas de preparo da amostra para a análise cromatográfica propriamente dita sejam realizadas. Dentre elas destacam-se a extração, a concentração dos analitos e a limpeza da amostra, uma vez que ela geralmente é complexa e contém o fármaco em baixas concentrações.^{57,58}

Um processamento inadequado no preparo de amostras pode gerar imprecisões que afetam substancialmente o processo analítico. A técnica de extração mais utilizada na aurora das análises ambientais, na década de 70, foi a Extração Líquido-Líquido (*Liquid-Liquid Extraction*, LLE)^{13, 58}, que se baseia na solubilidade relativa (partição) de um determinado composto em dois meios imiscíveis, geralmente água e um solvente orgânico.⁵⁹ No caso de uma amostra ambiental aquosa, há a transição dos analitos de interesse para a fase orgânica, enquanto a maioria dos interferentes idealmente se mantém na fase original. Tal técnica, no entanto, apresenta baixa reprodutibilidade, é extremamente laboriosa, onerosa em função do

grande volume de consumíveis utilizados, expõe o operador a solventes que podem possuir alta toxicidade e não consegue extrair satisfatoriamente analitos com alta polaridade, caso de grande parte dos compostos que necessitam de análise, uma vez que a afinidade pela fase orgânica é limitada.

A Extração em Fase Sólida (*Solid Phase Extraction*, SPE) surgiu no fim da década de 70 para solucionar os problemas decorrentes da LLE.^{57, 58, 59} O formato original da técnica utiliza dos mesmos princípios aplicados na cromatografia líquida clássica, como pode ser visto na Figura 17, e também é classificada em fase normal e reversa. Nela, um cartucho preenchido com o sorvente de extração é condicionado para receber a amostra contendo os analitos de interesse. Enquanto tais compostos são retidos devido a suas interações com a fase estacionária, os outros interferentes presentes são, em sua maioria, eliminados. Após essa etapa, o cartucho é lavado para remover interferentes que eventualmente ficaram retidos e é seco para remover o restante da matriz e do solvente de lavagem. Por fim, um solvente com força eluotrópica apropriada é passado através da fase para remover os analitos, propiciando simultaneamente a concentração de tais compostos e a limpeza do extrato que será submetido à análise. É comum, após esse procedimento, que o extrato passe por um processo de secagem utilizando um gás inerte para aumentar ainda mais a concentração no meio e para que seja ressuspenso em um solvente mais apropriado para a análise.

Figura 17 – Demonstração das etapas de extração por Extração em Fase Sólida. A amostra (a) é passada através da fase estacionária (c) previamente condicionada (b). Em seguida o cartucho é lavado (d) para eliminar os interferentes e os analitos são eluidos (e) com um solvente orgânico

Diversos sorventes podem ser utilizados a partir das características estruturais dos compostos que devem ser extraídos, sendo sua seleção correta fundamental para o sucesso da análise. Preliminarmente, a SPE surgiu como uma alternativa mais limpa e barata em relação a LLE para a análise de compostos que não possuam polaridade elevada, como os pesticidas. Dessa forma, fases extratoras quimicamente modificadas com cadeias alquílicas (fase reversa) eram preferíveis, pois interagiam satisfatoriamente com os compostos de interesse. Tal fato fez com que a técnica se mantivesse estabilizada em termos de desenvolvimentos inovadores até os anos 90, quando o aumento da demanda por análises de compostos com alta polaridade fez com que novas fases extratoras fossem pesquisadas e aplicadas visando-se obter maior seletividade, limpeza e praticidade.⁶² Dentre as fases desenvolvidas destacam-se as poliméricas derivadas, por exemplo, de poliestireno e divinilbenzeno (PS-DVB), pois podem atuar numa ampla faixa de pH (1 – 13) e são muito versáteis devido à sua estrutura.

Além das fases poliméricas, outros compostos possuem aplicabilidade em SPE, como nanotubos de carbono, fases com imunoafinidade e polímeros molecularmente impressos. No entanto, ainda carecem de pesquisa, possuindo custo elevado e nem sempre levando a resultados satisfatórios.⁶⁰⁻⁶²

A SPE também é encontrada em outros formatos, como cartuchos com outras dimensões, discos e placas com 96 poços (Figura 18). Essas variações requerem modificações no tamanho das partículas, no volume da fase extratora, da amostra aplicada e alguns requerimentos instrumentais adicionais. De uma maneira geral, todos os formatos citados costumam usar uma pressão negativa (em relação à atmosférica) para auxiliar na passagem dos solventes e da amostra, além de recipientes apropriados para coletar os extratos obtidos.

Figura 18 – Formatos utilizados em SPE.

Fonte: 63

A classificação da SPE não se restringe apenas ao tipo de fase extratora e ao formato do suporte. O desenvolvimento da técnica propiciou que novas associações fossem feitas, permitindo, inclusive, que o preparo de amostra seja incorporado ao processo de análise. Assume-se que existam basicamente quatro modos de operação, ilustrados pela Figura 19.

Figura 19 – Modos de operação empregados em SPE

Fonte: 63

O modo *off-line* é aquele em que todo o processo de extração, bem como a alocação do extrato para a análise, é feito pelo analista. É o modo mais laborioso e o que, conseqüentemente, gera a maior possibilidade de erros durante o processo devido a grande intervenção humana.

No modo *at-line* essa intervenção é reduzida pelo uso de processos automatizados, diminuindo consideravelmente as fontes de erro durante o preparo da amostra. A transmissão para o instrumento de análise, no entanto, é similar ao modo *off-line* ou necessita de uma interface entre o sistema de preparo e o cromatógrafo. Existem alguns instrumentos disponíveis no mercado como o AspectTM, da Gilson, e o Rapid Trace[®], da Biotage, mas o custo elevado limita sua aplicabilidade em ensaios de rotina.

Sistemas *in-line* não possuem muitas aplicações em análises ambientais devido às dificuldades inerentes da técnica, como entupimentos e perda de eficiência. Nele, o sistema de preparo da amostra está inserido internamente no sistema de análise.

O modo *online* é o único em que o preparo pode ser completamente automatizado e alinhado ao sistema de análise sem a intervenção humana ou auxílio de interfaces entre as duas etapas, como no modo *at-line*. Nele, o preparo e a análise estão diretamente conectados,

permitindo que a eluição dos analitos do meio de extração seja feita em linha à análise cromatográfica. Possui grandes vantagens, uma vez que se torna extremamente reprodutível se utilizado adequadamente e livre de erros do analista. Adicionalmente, o uso de instrumentos comerciais como o SparkHolland e AspecXL aumentam a produtividade do laboratório, uma vez que possibilitam fazer a análise de um extrato enquanto outra amostra é processada.

O preço elevado desses instrumentos, no entanto, fez com que outra forma *online* ganhasse destaque. O modo de injeção direta utilizando duas colunas acopladas por meio de uma válvula, ou *column switching* (CS), apresenta praticamente as mesmas vantagens dos equipamentos automatizados comerciais, porém com custos drasticamente reduzidos, uma vez que utiliza o próprio equipamento de análise cromatográfica para a extração. Nesse arranjo é possível que se façam injeções de grandes volumes de amostra sem gerar alargamentos na banda cromatográfica, prejudicar a coluna analítica pela saturação da fase estacionária ou contaminar o sistema com matrizes complexas.

O funcionamento do sistema online utilizando *column switching* é mostrado na Figura 20. Nela, a amostra é lançada ao sistema pelo próprio injetor do equipamento utilizando um sistema de bombeamento independente conectado à coluna de extração, enquanto as bombas do próprio sistema enviam fase móvel à coluna analítica (Figura 20.a). Após um determinado tempo de carregamento ocorre um giro da válvula, presente no sistema, que modifica o caminho dos solventes e permite a eluição dos compostos da primeira coluna com a própria fase móvel, enviando-os à coluna analítica (Figura 20.b) e propiciando a separação.

Figura 20 – (a) Modo de carregamento

(b) Modo de eluição e análise

A técnica de *column switching* é amplamente utilizada para análises biológicas, pois permite um maior uso de amostra e é versátil em relação às fases extratoras.^{64,65} Adicionalmente, a redução do manuseio devido a injeção direta minimiza o uso de solventes durante a realização do preparo da amostra, tornando essa variação da técnica ainda mais limpa se comparada aos modos convencionais.

1.5 Miniaturização

A miniaturização do manuseio, bem como a redução do uso de solventes e componentes com potencial toxicidade ganhou destaque a partir do advento da Química Verde, termo introduzido por Anastas em 1991 que apontou novas condutas e princípios que deveriam ser adotados para alterar o paradigma da época, reduzindo os danos causados ao ambiente e tornando os processos químicos mais limpos e eficientes.⁶⁶ A partir de soluções simples, como o enfoque pela prevenção, a diminuição do uso de solventes, o aproveitamento de substâncias recicladas e o aumento da eficiência de catalisadores em processos, mostrou-se que é possível reduzir a quantidade de resíduos tóxicos no ambiente e obter melhorias econômicas, uma vez que a utilização de processos mais limpos e eficientes reduz gastos com reagentes, indenizações, remediações e aumenta a produtividade.⁶⁷

As análises químicas também seguiram essa tendência e passaram a buscar alternativas mais limpas e eficientes, posto que as técnicas clássicas, desde a coleta e preparo da amostra à análise propriamente dita, geram uma grande quantidade de resíduos.

Dessa maneira, a Química Analítica Verde ganhou espaço e as técnicas ditas miniaturizadas destacaram-se, pois reduzem significativamente os volumes de solventes, fase estacionária e amostra, diminuindo o processo analítico como um todo.^{68, 69} A maioria das miniaturizações caminhou no sentido das próprias técnicas clássicas, como a Microextração em Fase Sólida (*Solid Phase Microextraction*, SPME) e a Microextração em Fase Líquida (*Liquid Phase Microextraction*, LPME), embora possuam diferenças significativas em relação às originais. Outras, como a DLLME (*Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*), SBSE (*Stir Bar Sorptive Extraction*), VWSE (*Vial Wall Sorptive Extraction*) e as extrações com membrana utilizam conceitos oriundos das próprias miniaturizações diretas citadas anteriormente, com pequenas modificações no formato ou na forma de operação.^{70 - 76}

A Microextração por Sorvente Empacotado, adaptação do termo em inglês *Microextraction by Packed Sorbent* (MEPS, Figura 21), utiliza os mesmos conceitos e

princípios da SPE convencional e é considerada a sua miniaturização direta, embora possua características diferenciadas em relação à original. Nela, o material sorvente é alocado na base da agulha de uma seringa de injeção ou em seu próprio interior, permitindo o melhor manuseio de pequenos volumes de amostra.^{77, 78} As maiores vantagens da MEPS em relação às técnicas clássicas estão na capacidade em eluir todos os compostos de interesse utilizando baixíssimos volumes de solvente, gerando um alto fator de concentração se comparado com as outras técnicas miniaturizadas; sua capacidade exaustiva e a possibilidade de reutilização do dispositivo de extração. A passagem da amostra e dos solventes pela fase estacionária é feita a partir de ciclos de amostragem, que propiciam a sorção e seguida liberação dos analitos.

Figura 21 – Dispositivo comercial utilizado para a microextração por sorbente empacotado

Fonte: 119

A Tabela 2 mostra comparações entre diversas técnicas de extração. É possível observar-se a potencialidade do MEPS em relação à recuperação (comparável apenas a SPE), possibilidade de reutilização e economia de solventes e amostras.

Tabela 2 – Comparação entre técnicas de preparo de amostra

Técnica	SPE ⁵⁷	MEPS ⁷⁷	SPME ⁷⁰	SBSE ⁷⁴	LPME ⁷¹
Solvente (mL)	1 – 10	0,01-1	Não utiliza	Não utiliza	0,02-0,05
Fase extratora (mg)	100-500	2-5	10-30	20-50	Não utiliza
Amostra (mL)	100-1000	0,01-1	15-100	15-100	15-100
Análise	LC ou GC	LC ou GC	LC ou GC**	LC ou GC**	LC ou GC
Recuperação (%)*	80-100	80-100	5-20	5-60	5-30
Precisão	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta
Tempo (min)	5-20	5-20	40-60	40-60	60-240

* Valores referentes a recuperações absolutas

** A análise por LC necessita de eluição em solvente apropriado para análise, enquanto que em GC pode ocorrer de maneira direta

Apesar de não ser um conceito novo em separações, a miniaturização dos sistemas cromatográficos vem ganhando destaque no cenário científico por utilizar menores quantidades de solventes e obter melhoras consideráveis em algumas características do seu desempenho. Várias definições são utilizadas para as escalas cromatográficas, como as de Chervet⁷⁹ e Saito⁸⁰, por exemplo, que as classificaram pela vazão da fase móvel e pelo diâmetro interno das colunas, respectivamente, como visto na Tabela 3. Avanços recentes na instrumentação analítica e no uso de colunas com partículas menores que 3 µm fizeram da cromatografia capilar (*Capillary Liquid Chromatography*, cLC) uma técnica bem utilizada, pois consegue manter razoavelmente a reprodutibilidade e os níveis de eficiência das colunas utilizadas em escala convencional.⁸¹⁻⁸⁶ Além disso, apresenta ganhos em relação ao sinal analítico quando utilizam detectores sensíveis à concentração, uma vez que há menor diluição dos analitos na fase móvel.

Tabela 3 – Definições propostas por Chervet e Saito para classificar as escalas cromatográficas

Nomenclatura	Chervet ⁷⁹	Saito ⁸⁰
Classificação	Vazão	Diâmetro
HPLC convencional	0,5 – 2 mL min ⁻¹	2 – 5 mm
HPLC microbore	100 – 500 µL min ⁻¹	< 2 mm
Micro HPLC	10 – 100 µL min ⁻¹	0,5 – 1 mm
HPLC capilar	1 – 10 µL min ⁻¹	0,1 – 0,5 mm
Nano HPLC	10 – 1000 nL min ⁻¹	0,01 – 0,1 mm

Todo o sistema que compõe um equipamento de LC capilar deve ser redimensionado de maneira que se elimine ao máximo os volumes extra coluna. Esse fator, aliado a técnicas de focalização como *column switching*, permite que ótimos limites de detecção e quantificação sejam atingidos.

1.6 Planejamento experimental

Um método de preparo de amostra necessita, quase que obrigatoriamente, passar por uma série de ajustes durante o seu desenvolvimento. Parâmetros como a fase extratora e o solvente de eluição, por exemplo, influem significativamente no resultado final de um estudo, fazendo ou não com que o objetivo do trabalho seja atingido.

No entanto, a influência da interação entre dois ou mais parâmetros pode não ser avaliada se o desenvolvimento de um método analítico for feito de modo univariado. Em muitos casos essa interação é significativa e pode reduzir a eficiência do processo se não for levada em consideração. Dessa forma, recomenda-se alterar todos os parâmetros relevantes do método simultaneamente, possibilitando promover melhorias em todas as etapas do método com um número reduzido de experimentos.⁸⁷

O planejamento fatorial é um dos modos mais utilizados para otimização multivariada devido a sua praticidade. Nele, os parâmetros (k) são avaliados em 2 níveis distintos em uma matriz que distribui todos os experimentos possíveis de forma aleatória. Apesar de existirem métodos mais complexos para esse tipo de avaliação, que inserem mais níveis de avaliação para os parâmetros estudados, o planejamento fatorial fornece uma estimativa simples e é amplamente utilizado no preparo de amostra tanto no modo completo (2^k) quanto no fracionário (2^{k-1}), que é aplicado quando um número grande de variáveis precisam ser estudados.⁸⁷

1.7 Validação de métodos analíticos

A qualidade de um método analítico é comprovada pela avaliação de uma série de parâmetros, ou figuras de mérito, que são estabelecidos por guias ou regulamentações fornecidas por agências de controle. O conjunto desses parâmetros avaliados compõe o processo de validação de uma metodologia. No Brasil, os principais órgãos reguladores são a ANVISA¹⁰⁹ (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o MAPA¹¹⁰ (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), além do INMETRO¹¹¹ (Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia), que é o órgão responsável pela acreditação dos laboratórios em normas ISO (*International Organization for Standardization*) e BPL (Boas Práticas de Laboratório). Internacionalmente, destacam-se os guias do *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*¹¹² (ICH) em todo o mundo, a Eurachem¹¹³ na União Européia, a *Food and Drug Administration*¹¹⁴ (FDA) nos Estados Unidos e a *National Association of Testing Authorities*¹¹⁵ (NATA) na Oceania.

Apesar dos guias divergirem entre si no que se refere à aplicação dos testes necessários durante a validação de um método analítico, todos determinam que praticamente

as mesmas figuras de mérito sejam avaliadas de modo a se assegurar que ele seja reprodutível, exato e que, em última instância, possa ser aplicado com confiança em ensaios de rotina.

Os mais importantes parâmetros, bem como suas formas de avaliação, são:

- Linearidade e faixa linear: capacidade em demonstrar que os resultados obtidos respondem satisfatoriamente a um modelo matemático definido experimentalmente para uma faixa de concentração. Tais modelos geralmente são construídos por regressões lineares obtidas pelo método dos mínimos quadrados, embora alguns estudos requeiram desenvolvimentos mais complexos.⁸⁸ Esse modelo é gerado empiricamente, a partir da obtenção de uma curva analítica com cinco ou seis pontos de concentrações distintas e com réplicas independentes entre si. Para o caso de métodos de análise que façam preparo de amostra, as curvas devem ser obtidas de três maneiras distintas, conforme mostrado a seguir:

- pela injeção do padrão nas concentrações em que os analitos estarão após o processo de extração: análise do padrão isento da presença da matriz (A);
- utilizando matriz (branco) fortificada com concentrações do padrão e submetidas ao processo de preparo: matriz fortificada previamente à extração (B);
- fortificando o extrato (branco) da matriz isenta dos analitos: extrato fortificado após o preparo do branco (C).

Essa forma de construção das curvas analíticas possibilita que parâmetros como recuperação, efeito de matriz e eficiência do processo sejam avaliados, conforme será discutido posteriormente.

As perdas pelo processo de extração e a heterogeneidade das matrizes, que contém uma série de interferentes que influenciam no sinal analítico, exigem que as curvas de calibração sejam padronizadas para corrigir esses efeitos e para não influenciarem negativamente na quantificação dos analitos de interesse. A padronização mais utilizada para esse tipo de análise é a interna, que é feita adicionando-se um composto de concentração definida e que preferencialmente não esteja presente na amostra analisada. As curvas são construídas, então, em função da razão dos dois compostos. Assim, é possível ajustar o modelo a possíveis variações nas matrizes que serão analisadas posteriormente, pois a mesma influência ocorrerá tanto para o analito quanto para o padrão.⁸⁹

A avaliação da presença de *outliers*, ou pontos fora da curva, entre as réplicas pode ser feita pelo Teste de Cochran, que avalia se as réplicas possuem homogeneidade ou se existem

pontos cuja variância excede um limite aceitável. A Equação 2 mostra a relação matemática que determina o valor C.⁹¹

$$C = \frac{S^2_{\max}}{\sum_{i=1}^k S^2} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde $S^2_{\max}$ é o maior valor de variância obtida entre os pontos da curva, dividido pela soma de todas as variâncias geradas pelas réplicas dos pontos da curva analítica. Se o valor de C obtido for maior que o tabelado, assume-se que existem *outliers*.

Apesar de muitos guias nacionais e internacionais assumirem que apenas o coeficiente de correlação (r) confirme a linearidade de um método, a avaliação correta dessa figura de mérito exige que uma série de fatores sejam adequadamente estudados.⁸⁸

No caso de métodos que possuam uma faixa linear muito extensa (de até 2 ordens de grandeza de diferença, por exemplo), é importante avaliar se o método responde homogeneamente a baixas e altas concentrações. Se a propagação dos erros entre réplicas de um mesmo ponto de concentração for constante em toda a sua faixa linear, gerando consequentemente uma variância homogênea (conforme mostrado na Figura 22), diz-se que o modelo de regressão apresenta homocedasticidade. Caso os erros apresentem uma tendência durante esse intervalo, diz-se que então que ocorre heterocedasticidade (Figura 23).⁹⁰ Esse comportamento pode aumentar os erros durante a quantificação de um analito e prejudicar a interpretação dos resultados.

Figura 22 – Variação constante entre as réplicas de todos os pontos de uma curva analítica, exemplo de comportamento homocedástico

Fonte: 90

Figura 23 – Variação tendenciosa entre as réplicas de todos os pontos de uma curva analítica, exemplo de comportamento heterocedástico

Fonte: 90

Essa avaliação pode ser feita pelo Teste F (Teste Fisher), que é realizado calculando-se a razão das variâncias das réplicas dos pontos alto e baixo da curva analítica.¹⁰³ O teste mostra se a hipótese nula (ou seja, de que não existe variância significativa) existe ou não nessa faixa linear. Se o valor de F calculado for maior que o tabelado, assume-se que existe heterocedasticidade.

A confirmação da linearidade também é feita pela determinação dos resíduos, que demonstram a diferença entre os valores teórico e experimental e são calculados como mostrado na Equação 3.⁹²

$$RE (\%) = \frac{C_{exp} - C_{teo}}{C_{teo}} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

Nela, o C_{exp} representa a concentração obtida pelo modelo de regressão e C_{teo} os valores teóricos de concentração naquele ponto.

Se a dispersão dos resíduos for aleatória em toda a faixa de concentração, assume-se que não existe heterocedasticidade. Caso esse efeito se comprove (pelo Teste F e pela dispersão tendenciosa dos resíduos) é necessário utilizar um modelo de calibração ponderada. Nele, adiciona-se um peso ao modelo dos mínimos quadrados, como a própria concentração naquele nível da curva ou o sinal analítico obtido. Essa correção altera a inclinação da curva e o intercepto da curva, ajustando-a adequadamente às regiões onde os erros (e consequentemente a variação dos resultados) são mais acentuados. Quanto menor for a soma dos resíduos relativos de todos os pontos da curva analítica, melhor o modelo de regressão desenvolvido, uma vez que ele consegue contornar as faltas de ajuste dentro da faixa linear de concentração.^{88, 90, 91, 92}

- Seletividade: também chamado de especificidade, é a demonstração da capacidade do método em detectar/quantificar apenas os compostos de interesse mesmo na presença de outros componentes, como interferentes e produtos de degradação. O método é dito seletivo quando tais interferentes não são detectados no mesmo tempo de retenção do analito e/ou não são extraídos apropriadamente pelo método de preparo de amostra.
- Sensibilidade: um método é sensível quando é capaz de responder satisfatoriamente a variações sutis de concentração. Assumindo, por exemplo, que duas curvas possuam a mesma faixa linear, aquela que possuir o maior valor de inclinação consegue responder mais satisfatoriamente a pequenas variações dentro dessa faixa.
- Limites de detecção e quantificação (LD e LQ): são as concentrações mínimas em que um composto pode ser detectado e quantificado com precisão adequada. Aceita-se que no LD

e LQ o sinal do analito seja 3 e 10 vezes maior que o ruído da linha de base, respectivamente. Além disso, para o LQ existe a exigência de precisão e exatidão aceitáveis na medida.

- **Precisão:** avalia a concordância dos resultados obtidos em uma série de medidas para um mesmo nível de concentração durante a avaliação do método analítico. É, geralmente, expresso pelo Desvio-Padrão Relativo (*Relative Standard Deviation*, RSD), que é dado pela Equação 4.

$$\text{RSD (\%)} = \frac{S}{X} \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

Onde, S é o desvio padrão e X é a média das replicas avaliadas.

A precisão é avaliada nos modos intra e inter-dias. A primeira é calculada para amostras submetidas à análise em um mesmo dia, utilizando o mesmo equipamento e analista. A segunda, por outro lado, avalia a concordância dos resultados em dias diferentes. Geralmente atribui-se um limite máximo de 15% no desvio padrão relativo tanto para a precisão inter e intra-dias, embora algumas agências tolerem até 20%, principalmente para o valor mais baixo (LQ).

- **Exatidão:** simboliza a proximidade entre valores obtidos experimentalmente ao aplicar o modelo de regressão e suas respectivas concentrações teóricas. Para isso, utilizam-se padrões em concentrações diferentes dos pontos da curva analítica. A Equação 5 mostra a relação utilizada para se determinar a exatidão.

$$E (\%) = \frac{C_{\text{exp}}}{C_{\text{teo}}} \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$

Onde C_{exp} é a concentração obtida experimentalmente pela aplicação do modelo de regressão e C_{teo} a concentração do padrão. Geralmente permite-se uma variação de 20% em torno dos 100% de concordância.

- **Recuperação:** demonstra a capacidade do método de preparo de amostra em extrair os analitos de uma matriz complexa.

- Efeito de matriz e eficiência do processo: o efeito de matriz determina a influência do meio na detecção dos compostos de interesse, sendo a supressão e o aumento do sinal analítico as consequências mais consideráveis. A hipótese mais aceita para o efeito de supressão baseia-se na competição entre os analitos e os componentes da matriz durante o processo de ionização. Como esse processo já gera perdas das moléculas-alvo naturalmente, a presença de interferentes torna essa redução ainda mais acentuada.^{105, 106}

De acordo com Matuszewski,⁹³ os parâmetros de recuperação e efeito de matriz podem ser obtidos pelas equações 6, 7 e 8.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{A}{B} \times 100 \quad (\text{Equação 6})$$

$$\text{Efeito de matriz (\%)} = \frac{B}{C} \times 100 \quad (\text{Equação 7})$$

$$\text{Eficiência do processo (\%)} = \frac{A}{C} \times 100 \quad (\text{Equação 8})$$

Sendo A, B e C a resposta do padrão isento de matriz e o adicionado antes e depois do procedimento de extração, respectivamente. A descrição detalhada da forma com que as amostras são preparadas foi discutida na linearidade.

Espera-se que um método de preparo de amostras ideal consiga extrair (ou recuperar) 100% dos compostos de interesse e obtenha um efeito de limpeza que elimine totalmente as interferências da matriz sobre o processo de detecção. Dessa maneira, a eficiência total do processo (que nada mais é do que o produto dos dois primeiros termos) também atinge o nível de 100%.

- Robustez: mostra a capacidade do método em fornecer os resultados adequadamente mesmo quando a análise é feita em outro laboratório e/ou pequenas variações são introduzidas. O teste de Youden é o mais utilizado para esse tipo de estudo, uma vez que consegue avaliar uma série de parâmetros importantes para a análise em um número reduzido de experimentos, incluindo todas as etapas do processo (como o preparo da amostra, a separação cromatográfica e a detecção por espectrometria de massas). Nele, sete parâmetros

são avaliados em oito experimentos, formando um planejamento experimental fracionário do tipo 2^{7-4} . O efeito de cada parâmetro é avaliado como na Equação 9.

$$Efeito = \frac{\sum Exp.nível\ 1 - \sum Exp.nível\ 2}{4} \quad (\text{Equação 9})$$

O parâmetro é significativo e exerce uma influência razoável sobre o método se o seu efeito for superior ao desvio-padrão de todos os efeitos combinados. Essa estimativa é dada pela Equação 10.^{91, 94}

$$S_{efeitos} = \pm \sqrt{2 \times \frac{\sum (Efeito)^2}{7}} \quad (\text{Equação 10})$$

2 Objetivos

- Desenvolver e validar métodos de preparo de amostra e análise utilizando-se SPE-LC-MS para a avaliação da remoção de sulfonamidas em águas submetidas a tratamento por um biorreator anaeróbio de leito fixo.
- Comparar o uso de analisadores do tipo triplo quadrupolo e QToF em análises ambientais a partir da avaliação das principais figuras de mérito obtidas durante a etapa de validação.
- Avaliar a aplicabilidade dos métodos desenvolvidos na determinação de sulfonamidas e trimetoprima em águas superficiais da cidade de São Carlos.
- Desenvolver métodos baseados em técnicas miniaturizadas de preparo de amostra e análise, como cLC, MEPS e SPE *online*, avaliando-se suas aplicações, vantagens e desvantagens em análises ambientais.
- Elaborar novas associações entre técnicas de preparo de amostra e análise miniaturizadas visando atingir limites de detecção e quantificação aplicáveis para o escopo ambiental.

3 Experimental

3.1 Materiais e instrumentação

3.1.1 Padrões analíticos, solventes e reagentes

A estrutura de todos os compostos utilizados no estudo e suas propriedades físico-químicas principais são apresentadas na Tabela 4. Os isótopos sulfadiazina-(fenil- $^{13}\text{C}_6$), sulfametoxazol-(fenil $^{13}\text{C}_6$) e trimetoprima- d_9 foram utilizados para padronização interna dos compostos analisados, uma vez que sua presença no ambiente é inexpressiva se comparado com suas formas mais abundantes. Soluções-Estoque (SE) de cada composto foram preparadas pela diluição dos padrões analíticos em ACN 0,1% ácido fosfórico (em volume), de modo que ficassem em concentrações próximas a 1 mg.mL^{-1} e pudessem ser mantidas a -4°C durante todo o estudo. Visando reduzir o manuseio das SE, Soluções Intermediárias (SI) foram preparadas por diluição na concentração de $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ e também mantidas sob refrigeração. A partir das SI, misturas contendo todos os compostos (inclusive os padrões internos) foram preparadas em água (purificada pelo sistema Milli-Q, da Millipore) em concentrações que variavam em função da resposta dos instrumentos de análise utilizados. As soluções de trabalho foram preparadas em concentrações que dependiam da necessidade da análise. Todos os frascos utilizados para armazenamento eram de alta qualidade.

Além de ACN, MeOH de alta pureza (grau HPLC, ambos da Tedia) também foi utilizado. Dentre os reagentes, destacam-se o uso de ácido fórmico (Tedia), fosfórico (Synth) e hidróxido de amônio (Synth) de alta pureza analítica.

Tabela 4 – Compostos utilizados durante o estudo. O pK_{a1} refere-se à protonação do grupamento amina ligado ao grupamento benzênico, enquanto o pK_{a2} refere-se à desprotonação da amida sulfônica (continua)

Composto	Estrutura	Massa molar (g/mol)	pK_a	logP
Sulfacetamida (SCT)		214,2	$pK_{a1} = 1,8$ $pK_{a2} = 5,3$	-1,0
Sulfadiazina (SDZ)		250,3	$pK_{a1} = 2,1$ $pK_{a2} = 6,5$	-1,3
Sulfatiazol (STZ)		255,3	$pK_{a1} = 2,0$ $pK_{a2} = 7,1$	-0,4
Sulfamerazina (SMR)		264,3	$pK_{a1} = 2,0$ $pK_{a2} = 7,1$	-0,1
Sulfametazina (SMT)		278,1	$pK_{a1} = 2,0$ $pK_{a2} = 7,6$	0,89
Sulfametizol (SMZ)		270,3	$pK_{a1} = 2,0$ $pK_{a2} = 5,5$	0,5
Sulfacloropiridazina (SCZ)		284,7	$pK_{a1} = 1,9$ $pK_{a2} = 5,5$	0,3
Sulfametoxazol (SMX)		253,3	$pK_{a1} = 2,0$ $pK_{a2} = 5,6$	0,9

Tabela 4 – Compostos utilizados durante o estudo. O pK_{a1} refere-se à protonação do grupamento amina ligado ao grupamento benzênico, enquanto o pK_{a2} refere-se à desprotonação da amida sulfônica (conclusão)

Composto	Estrutura	Massa molar (g/mol)	pKa	logP
Sulfadimetoxina (SDX)		310,3	$pK_{a1} = 2,0$ $pK_{a2} = 5,9$	1,6
Sulfaquinoxalina (SQN)		300,3	$pK_{a1} = 2,0$ $pK_{a2} = 5,5$	1,7
Trimetoprima (TMP)		290,3	$pK_{a1} = 7,2$ $pK_{a2} = 17,7$	0,91
Trimetoprima-d ₉ (TMP-d ₉)		299,3	$pK_{a1} = 7,2$ $pK_{a2} = 17,7$	0,91
Sulfadiazina- ¹³ C ₆ (SDZ-C ₆)		256,3	$pK_{a1} = 2,1$ $pK_{a2} = 6,5$	-1,3
Sulfametoxazol- ¹³ C ₆ (SMX-C ₆)		259,3	$pK_{a1} = 2,0$ $pK_{a2} = 5,6$	0,9

Fonte: 120

3.1.2 Consumíveis utilizados no preparo de amostra

A Tabela 5 apresenta todas as fases extradoras utilizadas no desenvolvimento do trabalho, bem como suas características físicas.

Tabela 5 – Fases extradoras utilizadas no estudo (continua)

Fase extratora	Estrutura	Tamanho da partícula (μm)
Alltech C18* e Macherey-Nagel Chromabond C18**		35 a 75* 45**
Waters Oasis HLB		30
Supelco Select HLB		55 a 60
Macherey-Nagel Chromabond HR-X		45

Tabela 5 – Fases extradoras utilizadas no estudo (conclusão)

Fase extratora e fabricante	Estrutura	Tamanho da partícula (µm)
Macherey-Nagel Chromabond HR-XA		45
Phenomenex Strata-XL		100
Phenomenex Strata-XA		33

O sistema de SPE em cartucho utilizado consiste de um *Manifold* de 12 portas auxiliado por um sistema de regulação de pressão negativa fornecido pela Supelco. Os cartuchos de polipropileno (com volume de 3 mL) e os frits de polietileno (20 µm de porosidade) utilizados para o empacotamento das fases extradoras também foram fornecidos pela mesma empresa.

A extração por MEPS foi feita utilizando uma seringa do tipo gastight de 1 mL (fornecida pela Hamilton) adaptada para a inserção de um BIN (*Barrel Insert Needle*)

labmade feito de teflon. Tal adaptação foi desenvolvida para que fosse possível utilizar fases extratoras que não estão disponíveis comercialmente para a técnica.

As colunas capilares utilizadas para o preparo de amostras *online* foram confeccionadas utilizando tubos com 500 μm de diâmetro interno, telas de proteção (1/16'' de diâmetro externo e 10 μm de tamanho de poro), ferrolhos, porcas e uniões. Todos esses materiais são de aço inoxidável e foram fornecidos pela Valco.

3.1.3 Equipamentos

Todas as pesagens foram realizadas em uma balança analítica Mettler Toledo, modelo AG285. Quando necessário, as medições de pH foram realizadas em um pHmetro Micronal, modelo B374. Uma centrífuga do tipo MiniSpin (Eppendorf) foi utilizada para a etapa final de preparo das amostras. Os equipamentos de cromatografia líquida utilizados durante o estudo, bem como as colunas, fases móveis e demais informações são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6 – Instrumentos, consumíveis e parâmetros cromatográficos principais utilizados durante o estudo

	Shimadzu Prominence 20 A	Agilent 1260	Dionex RSLC Ultimate 3000
Software	LC Solution	Analyst	Chromeleon 7.0
Fase móvel**	H ₂ O (A)/ACN (B)	H ₂ O (A)/ACN (B)	Bomba binária = H ₂ O (A)/ACN (B) Bomba carregadora = H ₂ O
Coluna analítica	Phenomenex Kinetex XB C18 (2,1 x 100 mm; 2,6 μm)	Agilent Poroshell 120 EC C18 (2,1 x 50 mm, 2,7 μm)	Acclaim PepMap RSLC C18 (0,3 x 150 mm; 2 μm)
Volume de injeção	5 μL	5 μL	1 μL *
Temperatura do forno	40 °C	30 °C	40 °C
Vazão	0,25 mL min ⁻¹	0,6 mL min ⁻¹	9 $\mu\text{L min}^{-1}$

* Volume de injeção utilizado no sistema convencional

** Os dois componentes da fase móvel continham 0,1% de ácido fórmico em volume em sua composição

O sistema bidimensional utilizou três modos de injeção, sendo eles:

- *Full loop*: o volume injetado é o mesmo da alça de injeção. O trabalho utilizou, na maioria dos experimentos realizados, um *loop* de 125 μL ;
- *Partial loop*: o volume injetado deve ser menor ou igual à metade da alça de injeção. Embora seja útil quando se possui quantidades reduzidas de amostra, nem todo volume é aproveitado;
- *Microliter pick-up*: nesse tipo de injeção uma quantidade específica de amostra é enviada à alça de injeção, que é completada com um solvente apropriado. Nesse modo é possível aproveitar toda a amostra disponível. No entanto, os solventes presentes no momento da injeção podem causar a dispersão da banda cromatográfica devido à diluição dos analitos.

O desenvolvimento prévio dos métodos de separação e de preparo de amostras foi feito utilizando-se detecção por UV, monitorando-se o comprimento de onda 254 nm.

As principais características dos espectrômetros de massa envolvidos no trabalho são mostradas na Tabela 7.

Tabela 7 – Instrumentos e parâmetros principais utilizados durante o estudo.

	AbSciex QTRAP 5500	Bruker microTOF-Q II
<i>Software</i>	Analyst	Compass
Fonte de ionização	ESI+	ESI+
Voltagem do capilar	5.500 V	4.500 V
Pressão do gás nebulizador	3,5 bar	Sistema capilar = 0,8 bar Sistema convencional = 4 bar
Vazão do gás de secagem	20 L min ⁻¹	Sistema capilar = 5 L min ⁻¹ Sistema convencional = 8 L min ⁻¹
Temperatura do gás de secagem	650 °C	Sistema capilar = 180 °C; Sistema convencional = 200 °C

As análises utilizando o QTRAP foram feitas no modo *ScheduleTM MRM*, que divide o tempo de análise em períodos e monitora apenas os compostos que apresentam tempos de retenção nessas janelas de tempo. A otimização das condições de ionização e fragmentação foram feitas pelo próprio *software*. O analisador do tipo QTOF operou com uma faixa de 50 a 3000 Da.

3.2 Métodos aplicados

3.2.1 Comparação entre os sistemas cromatográficos

O sistema convencional e o capilar foram comparados pelas seguintes características:

- Detectabilidade: valores de área e razões sinal/ruído (S/R) obtidos nos sistemas quando soluções-padrão foram analisadas na mesma concentração, utilizando um sistema de detecção comum aos dois equipamentos.
- Eficiência das colunas: a avaliação da eficiência foi feita pela comparação das curvas de van Deemter geradas para o composto com menor fator de retenção (SCT), utilizando-se colunas convencionais e capilares. As análises foram feitas de maneira isocrática, sendo a fase móvel composta por H₂O/ACN (92:8 em volume). As curvas foram construídas pela relação entre altura de prato (H) e velocidade linear (u) do sistema. As relações matemáticas que determinam essas grandezas são dadas pelas equações 11 e 12.

$$H = \frac{W_{1/2}^2}{5,54 \times t_r^2} \quad (\text{Equação 11})$$

Onde $W_{1/2}^2$ é o quadrado da largura do pico a meia altura e t_r^2 é o quadrado do tempo de retenção do composto de interesse. A altura do prato é inversamente proporcional ao Número de Pratos teóricos (N).

$$u = \frac{L}{t_0} \quad (\text{Equação 12})$$

Onde L é o comprimento da coluna e t_0 o tempo do composto não retido.

3.2.2 Preparo de amostra

3.2.2.1 Métodos *off-line*

Os métodos utilizando-se SPE clássica foram desenvolvidos e validados com cartuchos empacotados contendo 100 mg de sorvente. Cada extração utilizou 100 mL de esgoto sintético, que foi preparado visando mimetizar o ambiente complexo em que os compostos de interesse estão presentes.¹¹⁷ Ele é composto por carboidratos (como a sacarose, o amido e a celulose), proteínas (extrato de carne) e lipídeos, além de sais de sódio, magnésio e cálcio, conforme mostrado na Tabela 8. As amostras foram filtradas antes de cada análise utilizando-se filtro de celulose qualitativo com 45 µm.

Tabela 8 – Composição do esgoto sintético utilizado no estudo

Composto	Unidade	Quantidade/L
Sacarose	mg	35
Amido	mg	114
Celulose	mg	34
Extrato de carne	mg	208
Óleo de soja	mg	51
NaHCO ₃	mg	200
Detergente doméstico	mL	3
NaCl	mg	250
MgCl ₂ .6H ₂ O	mg	7
CaCl ₂ .2H ₂ O	mg	4,5

O empacotamento na MEPS foi manual e representou, em grande parte, uma miniaturização direta da técnica clássica. Cada extração utilizou 1 mL do esgoto sintético, que foi filtrado da mesma forma que a extração convencional. Todos os demais solventes envolvidos na SPE também foram utilizados.

Visando evitar a entrada de material particulado na coluna analítica, todos os extratos provenientes da etapa *off-line* foram centrifugados após a reconstituição.

Todos os experimentos foram conduzidos com, no mínimo, três réplicas e os resultados só eram considerados se o RSD fosse menor do que 15%.

3.2.2.1.2 Validação dos métodos analíticos

A avaliação dos parâmetros referentes às validações dos métodos foi feita como mostrado a seguir.

- Linearidade: três curvas com seis pontos de concentração (preparados de forma independente) foram construídas utilizando soluções-padrão (com três réplicas por ponto) e amostras fortificadas antes e depois da extração (com cinco e três réplicas por ponto, respectivamente). As curvas só seriam aprovadas se os modelos construídos obtivessem coeficientes de correlação maiores que 0,97 e apresentassem homocedasticidade. O ponto era descartado se apresentasse mais de dois *outliers* (comprovado pelo teste de Cochran) e a curva era reconstruída caso mais de um ponto apresentasse esse comportamento.
- Exatidão: três concentrações independentes em relação à curva analítica foram utilizadas para avaliar se o método gerava uma resposta adequada, sendo o primeiro deles entre o P1 e o P2, o segundo entre o P2 e o P3 e o terceiro entre o P5 e o P6. Todos foram feitos de maneira independente e analisados em triplicata. Os resultados só seriam considerados se estivessem entre 80 e 120% da concentração teórica e com um RSD inferior a 15%.
- Recuperação, efeito de matriz e eficiência do processo: os três parâmetros foram estudados em todos os pontos da curva analítica.
- Precisão: a avaliação foi feita em três dias utilizando as réplicas geradas nas curvas de calibração no dia 1 e novas réplicas produzidas nos pontos baixo, médio e alto nos dias 2 e 3. Os valores só seriam aceitos se obtivessem um RSD menor que 15% na combinação de todos os valores obtidos para cada nível de concentração.
- Seletividade: a seletividade do processo foi estudada pela análise dos compostos: ácido acetilsalicílico, ibuprofeno, cafeína, nicotina, diclofenaco e sinvastatina utilizando os métodos desenvolvidos. Tal escolha foi motivada pelas diferentes propriedades químicas que apresentam e ao grande uso na medicina atual. Os métodos seriam considerados seletivos se tais interferentes não prejudicassem a quantificação dos compostos de interesse. Isso pode

acontecer se o método de preparo de amostra não os extrair adequadamente, se a separação cromatográfica for insatisfatória ou se não ocorrer ionização para a detecção por MS.

- Robustez: os parâmetros avaliados na validação dos dois métodos são mostrados nas Tabelas 9 e 10.

Tabela 9 – Parâmetros avaliados na avaliação da robustez do método SPE-LC-QTOF

Parâmetro	Nível Baixo	Nível Alto
Temperatura do forno (°C)	30	40
Vazão da fase móvel (mL min ⁻¹)	0,25	0,3
Fase extratora	HR-XA	ST-XA
Potencial da Fonte (V)	4.000	4.500
Fase móvel	ACN	MeOH
Temperatura na fonte (°C)	180	200
Vazão do gás de secagem (mL min ⁻¹)	6	8

Tabela 10 – Parâmetros avaliados na avaliação da robustez do método SPE-LC-QTRAP

Parâmetro	Nível Baixo	Nível Alto
Temperatura do forno (°C)	30	40
Vazão da fase móvel (mL min ⁻¹)	0,6	0,5
Fase extratora	HR-XA	ST-XA
Potencial da Fonte (V)	5.500	5.100
Fase móvel	ACN	MeOH
Temperatura na fonte (°C)	650	600
Vazão do gás de secagem (mL min ⁻¹)	15	20

A robustez não é um parâmetro que desqualifica um método analítico. É utilizada para indicar ao analista sobre quais parâmetros são importantes e precisam ser monitorados durante a análise.

3.2.2.3 Método *online*

3.1.1.3.1 Confeção das colunas de extração

A coluna de extração *online* foi empacotada utilizando-se uma bomba Shimadzu Prominence 10 A como carregadora da fase extratora. A tela foi posta entre o tubo e as conexões de modo a bloquear a passagem das partículas de sorvente, que estavam em suspensão e eram bombeadas de um reservatório localizado na entrada da tubulação. Após o processo de empacotamento, uma nova conexão (também com uma tela de proteção) era posta na entrada da coluna de modo a selar as partículas dentro do tubo e manter o leito empacotado. A Figura 24 mostra um esquema dos componentes utilizados para a montagem da coluna de SPE.

Figura 24 – Esquema da coluna utilizada para a extração *online*. (a) Uniões utilizadas para conectar a coluna com o sistema cromatográfico, (b) Tela para retenção de partículas, (c) Tubulação utilizada para preenchimento com o leito particulado, (d) Ferrolho para a fixação e vedação da tubulação

Fonte: 121

3.1.1.2.2 Caracterização da capacidade de extração do sistema *online*

Os estudos para se determinar a capacidade de retenção da coluna *labmade* foram feitos utilizando-se detecção por UV e são mostrados a seguir.

- Comparação das inclinações de curvas de calibração geradas pelo sistema convencional (unidimensional) e pelo modo CS. Dessa forma, foi possível determinar-se a

razão entre esses modos de análise obedeciam ao aumento do volume de injeção e se essa relação era linear;

- Avaliação do fator de retenção dos compostos em diversas proporções de solvente orgânico e aquoso, de modo que se observasse a capacidade do composto em permanecer retido em diversas proporções de fase móvel. Para isso, o sistema foi montado como indicado na Figura 25.a. Nele, a amostra foi injetada utilizando-se uma bomba de carregamento em diversas proporções de solvente orgânico, sendo os resultados apresentados graficamente em curvas construídas a partir da relação entre essas frações e os fatores de retenção obtidos. Essa visualização gráfica é útil para demonstrar se a capacidade retentiva da fase extratora é linear e qual a melhor proporção de solvente para retenção e eluição efetiva dos compostos. Estudaram-se os compostos SCT, SDZ, TMP, SMT, SMX e SQN;

- O estudo das perdas por dessorção foi realizado para definir quanto tempo os compostos conseguiriam se manter retidos na fase extratora sem sofrerem perdas significativas pela ação da fase móvel. O experimento consistiu na injeção do composto com menor fator de retenção utilizando a configuração do sistema 25.a. Após um período de tempo, um giro de válvulas permitia que a bomba binária (utilizando ACN como fase móvel) removesse as moléculas de analito retidas na fase extratora e as enviasse para a detecção (Figura 25.b). A avaliação das áreas em diversos tempos de giro de válvula permite que o tempo máximo de permanência fosse estimado para o analito avaliado e extrapolado para os outros compostos da classe.

Figura 25 – (a) Avaliação do fator de retenção (b) Avaliação da dessorção dos compostos

3.1.3. Aplicações

3.1.3.1 Avaliação da remoção de SMX utilizando-se um reator de leito fixo

O método SPE-LC-QTOF foi aplicado na avaliação da concentração do fármaco SMX durante sua passagem através de um Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo (RAHLF), operado em parceria com o Laboratório de Processos Biológicos (LPB) da Escola de Engenharia de São Carlos (Universidade de São Paulo). Como pode ser visto na Figura 26, a presença de amostradores entre a entrada e saída permite o monitoramento da degradação e do comportamento do reator em todo o seu conteúdo, propiciando um ganho de informação que permite traçar a cinética de decomposição do composto de forma mais precisa.

Figura 26 – Biorreator utilizado no estudo

O biorreator foi alimentado em três níveis de concentração de SMX (2, 20 e 40 $\mu\text{g L}^{-1}$), sendo o seu período de estabilização monitorado a cada três dias pela análise do efluente. Ele era considerado estável quando a concentração do composto quantificada no efluente tornava-se constante após um período de alimentação com concentrações conhecidas. Após essa estabilização, amostras dos pontos intermediários foram coletadas de modo a se avaliar as concentrações obtidas de cada retirada. As amostras provenientes das coletas foram entregues semanalmente pelo LPB e armazenadas a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$, sendo descongeladas imediatamente antes do procedimento, filtradas em papel convencional e submetidas à extração. Os perfis gerados pela retirada de amostras dos pontos intermediários eram analisados em batelada e os resultados apresentados em forma de gráfico (Retirada x Concentração).

3.1.3.2 Aplicações em amostras reais

O método SPE-LC-QTRAP foi aplicado na avaliação de águas superficiais da cidade de São Carlos. A Figura 26 mostra os locais de coleta, cujos pontos são apresentados a seguir.

Figura 27 – Coletas realizadas na cidade de São Carlos

Ponto 1: Esgoto puramente doméstico encontrado nos arredores do Campus 2 da USP São Carlos.

Ponto 2: Nascente do córrego Mineirinho, que pertence à bacia do rio Monjolinho.

Ponto 3: Rio que passa próximo ao antigo kartódromo da cidade.

Ponto 4: Rio que passa próximo ao shopping da cidade.

Ponto 5: Rio que passa próximo a Universidade Federal de São Carlos.

As amostras foram coletadas em garrafas do tipo PET previamente higienizadas e mantidas a -4°C até o momento da extração, quando então foram filtradas em papel convencional e submetidas ao procedimento de análise.

4 Resultados e discussão

4.1 Desenvolvimento dos métodos de análise e detecção

O desenvolvimento preliminar dos experimentos cromatográficos foi feito utilizando-se detecção UV. Dessa forma, ante a quantidade de compostos analisados simultaneamente, fez-se uso de eluição no modo de gradiente de solventes para evitar-se a sobreposição das bandas cromatográficas dos compostos. Apesar desse fato não ser um problema insuperável em MS, uma vez que íons com diferentes m/z podem ser isolados em um cromatograma de íons extraídos (*Extracted Ion Chromatogram*, EIC), a presença de dois ou mais compostos em um mesmo tempo de retenção causa uma série de prejuízos para a análise como um todo, destacando-se principalmente a redução do *dwell time*. Esse parâmetro, também chamado de tempo de permanência, está relacionado ao tempo em que o analisador espectrométrico se mantém estático na aquisição de uma m/z específica. Quanto maior esse tempo, maior a razão sinal/ruído esperada para os compostos detectados, uma vez que maior contagem da corrente iônica é estabelecida. Por outro lado, esse tempo de permanência precisa ser reduzido quando muitos compostos são analisados simultaneamente, uma vez que mais íons de m/z diferentes precisam ser monitorados em um determinado seguimento de tempo. Mesmo quando a análise é feita no modo denominado *Schedule MRM* (descrito anteriormente), é preferível que haja uma separação razoável dos compostos para que uma menor sobreposição de picos permita um maior *dwell time*.

Além disso, o uso de grandes quantidades de solvente aquoso durante a análise dificulta a dessolvatação das moléculas no momento da ionização, reduzindo a eficiência do processo. Dessa forma, o método cromatográfico foi desenvolvido visando obter ionizações satisfatórias, o que resulta em um aumento do uso de solventes orgânicos, sem causar a coeluição excessiva dos analitos de interesse. Os gradientes utilizados nos três equipamentos são mostrados na Tabela 11.

Tabela 11 – Gradientes de eluição nos sistemas de cromatografia líquida utilizados

	Shimadzu Prominence 20 A	Agilent 1260	Dionex RSLC Ultimate 3000
Gradiente*	0 a 5 min. – 17%	0 a 0,5 min. – 10%	0 a 7 min. – 20%
	5 a 6 min. – 40%	0,5 a 2,7 min – 65%	7 a 8 min. – 50%
	6 a 9 min. – 40%	2,7 a 4 min – 65%	8 a 12 min. – 50%
	9 a 10 min. – 17%	4 a 4,2 min – 10%	12 a 12,5 min. – 20%
	9 a 16 min. - 17%	4 a 5 min – 10%	12,5 a 15 min. – 20%

* Variação referente à proporção de acetonitrila

Como o QTOF não possui a característica filtrante dos analisadores do tipo quadrupolo optou-se por manter o primeiro analisador operando no modo RF para que se evitassem perdas excessivas de íons.

Para o QTRAP, a definição dos parâmetros que forneceram a melhor fragmentação para a formação dos íons-produto mais abundantes a partir de seus precursores foi feita pelo próprio *software* e pode ser vista na Tabela 12. Os critérios mais importantes referem-se à cela de colisão, uma vez que é nela em que ocorre a formação dos íons utilizados para a qualificação e quantificação dos compostos de interesse. Dessa forma, o desenvolvimento foi feito pela infusão direta dos padrões analíticos de cada composto para que se definissem automaticamente a energia de colisão do gás (*collision energy*, CE), os fragmentos mais abundantes e o potencial de saída da cela (*collision cell exit potential*, CXP). Três íons produtos foram selecionados para cada composto analisado, possibilitando uma qualificação e quantificação inequívoca.

Tabela 12 – Principais parâmetros utilizados para a análise por LC-MS/MS no sistema QTRAP (continua)

	Q1	Q3	Collision Energy (CE)	Collision Cell Exit Potential (CXP)
Composto	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺	(volts)	(volts)
SCT	215	156	15	8
		92	29	14
		108	27	12
SDZ	251	156	21	10
		92	35	14
		108	31	8
(SDZ-C ₆)	257	162	21	10
		114	31	18
		98	37	8
STZ	256	156	21	10
		92	35	14
		108	33	18
SMR	265	156	23	8
		92	37	14
		108	35	16
TMP	291	261	31	12
		230	35	12
		257	41	12
(TMP-d ₉)	300	234	35	12
		264	35	12
		123	33	10

Tabela 12 - Principais parâmetros utilizados para a análise por LC-MS/MS no sistema QTRAP (conclusão)

	Q1	Q3	<i>Collision Energy (CE)</i>	<i>Collision Cell Exit Potential (CXP)</i>
Composto	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺	(volts)	(volts)
SMZ	271	156	21	12
		92	39	14
		108	31	18
SMT	279	186	25	10
		92	41	16
		108	37	16
SCZ	285	156	21	10
		92	39	14
		108	33	18
(SMX-C ₆)	260	162	21	16
		98	39	16
		114	33	6
SMX	254	156	21	10
		92	37	14
		108	31	16
SDX	311	156	29	8
		92	45	14
		108	41	18
SQN	301	156	23	24
		92	41	16
		108	37	18

4.2 SPE off-line

4.2.1 Desenvolvimento

A eficiência da técnica de extração depende, dentre outros fatores, da forma em que a espécie de interesse estará presente na amostra. Dessa forma, é importantíssimo saber se o composto estará ou não ionizado, pois isso é determinante para que o sorvente se torne apropriado. No caso das sulfonamidas, que são compostos de baixa acidez e que possuem mais de uma constante de ionização, recomenda-se que se estabeleça uma faixa de pH em que todos estejam em uma mesma forma (neutra ou carregada). Essa abordagem já foi adotada em diversos trabalhos da literatura que obtiveram resultados satisfatórios⁸⁸⁻⁹⁰ e, por isso, optou-se por trabalhar com a amostra em pH 3,4 pela adição de 1% de ácido fórmico em volume, pois os compostos se mantêm predominantemente em sua forma neutra. A fase extratora também foi condicionada na mesma concentração hidrogênionica. Os estudos preliminares foram feitos com apenas 8 sulfonamidas, uma vez que a introdução dos outros padrões foi feita posteriormente. A definição do solvente de eluição foi feita em função das séries eluotrópicas de fases baseadas em octadecilsilano (C18) e polímeros mistos (PS-DVB) encontradas na literatura.^{98,99} Nelas, ACN mostrou força satisfatória nos dois tipos de fases e por isso foi utilizada. A partir das definições propostas, o método preliminar foi construído como mostrado na tabela 13.

Tabela 13 – Método de extração preliminar

	Solvente	Volume (mL)
Lavagem	MeOH	5
Condicionamento	H ₂ O em pH 3,4 (0,1% ácido fórmico v/v)	5
Amostragem	Amostra em pH 3,4 (0,1% ácido fórmico v/v)	100
Lavagem	H ₂ O em pH 3,4 (0,1% ácido fórmico v/v)	5
Secagem	5 minutos sob pressão negativa	
Eluição	Acetonitrila	5 mL

Após o processo de eluição, o extrato foi seco em fluxo de nitrogênio, reconstituído em H₂O e submetido a análise cromatográfica.

Os dados de recuperação para todas as fases avaliadas são mostrados na Tabela 14.

Tabela 14 – Recuperações de sulfonamidas (%) em sorventes utilizados em SPE

Composto	Oasis HLB	Supelco HLB	Phenomenex Strata-X	Chromabond HR-X	Chromabond Tetracycline	Altech C18
SCT	88,0 ± 4%	39,4 ± 2%	91,4 ± 1%	74,6 ± 2%	1,7 ± 3%	0
SDZ	77,3 ± 3%	64,7 ± 6%	72,5 ± 4%	66,1 ± 9%	3,2 ± 12%	8,2 ± 40%
STZ	99,7 ± 6%	94,8 ± 2%	88,8 ± 5%	90,7 ± 1%	8,6 ± 6%	12,3 ± 19%
SMR	82,3 ± 1%	77,9 ± 6%	89,8 ± 3%	74,0 ± 2%	11,8 ± 4%	13,7 ± 40%
SMT	102,3 ± 3%	93,6 ± 1%	103,4 ± 3%	87,7 ± 2%	40,1 ± 4%	20,6 ± 4%
SCZ	96,8 ± 1%	99,2 ± 1%	105,1 ± 3%	88,0 ± 1%	37,2 ± 1%	47,6 ± 7%
SMX	90,7 ± 7%	93,4 ± 3%	95,7 ± 1%	79,8 ± 5%	36,9 ± 1%	40,8 ± 6%
SDX	97,0 ± 3%	92,3 ± 3%	93,2 ± 2%	98,3 ± 6%	68,5 ± 3%	61,9 ± 7%

Observou-se que as fases poliméricas mistas obtiveram bons valores de recuperação (excetuando-se a fase Supelco HLB) em comparação com as quimicamente modificadas a base de C18, que não apresentaram valores de precisão para compostos com recuperação menor que 20%. Os resultados são compreensíveis, uma vez que as sulfonamidas são analitos de polaridade elevada e não são retidas satisfatoriamente em sorventes apolares. Dessa forma, optou-se por reduzir os experimentos e utilizar apenas as três fases que obtiveram os melhores resultados. Nenhuma alteração foi feita no método de extração, uma vez que ele apresentou valores apropriados de recuperação para a maioria dos compostos.

Visando mimetizar a complexidade das amostras ambientais, avaliou-se a recuperação e a limpeza do extrato utilizando-se amostras de esgoto sintético. Os resultados, obtidos por detecção em UV, são mostrados na Tabela 15.

Tabela 15 – Valores de recuperação (%) na presença da matriz.

Composto	Oasis HLB	Phenomenex Strata-X	Chomabond HR-X
SCT	83,7 ± 3%	89,7 ± 10%	69,7 ± 4%
SDZ	78,7 ± 5%	83,9 ± 4%	70,3 ± 1%
STZ	86,3 ± 2%	86,9 ± 3%	76,7 ± 3%
SMR	73,0 ± 8%	82,6 ± 4%	67,1 ± 8%
SMT	76,3 ± 9	78,9 ± 2	67,4 ± 10%
SCZ	48,0 ± 4	61,2 ± 8	52,7 ± 1%
SMX	52,3 ± 3%	97,3 ± 1	69,4 ± 10%
SDX	62,4 ± 11%	76,3 ± 3	69,3 ± 4%

A presença da matriz causou uma redução acentuada nos valores de recuperação das fases Oasis HLB e HR-X, provavelmente devido à saturação desses sorventes. Isso pode ocorrer quando o volume máximo de amostra em que é possível recuperar 100% dos compostos utilizando-se uma massa específica de sorvente, chamado de volume de *breakthrough* ou volume de ruptura,⁶² é excedido, o que gera perdas na recuperação. Como a Strata-X apresentou os melhores resultados, além de um melhor efeito de limpeza, como pode ser visto na Figura 28, optou-se por utilizá-la para o restante dos estudos.

Figura 28 – Comparação entre os extratos dos brancos após o procedimento de extração utilizando três sorventes diferentes

Avaliou-se, também, o tamanho da partícula de sorvente na eficiência da limpeza e da extração. Para isso, comparou-se a recuperação na extração das sulfonamidas utilizando-se as fases Strata-X (que possui um tamanho de partícula de aproximadamente 33 μm) e Strata-XL (de aproximadamente 100 μm). A avaliação dos resultados encontra-se na Tabela 16 e na Figura 29.

Tabela 16 – Valores de recuperação (%) quando se utilizam tamanhos de partícula distintos

Composto	Phenomenex Strata-X (33 μm)	Phenomenex Strata-XL (100 μm)
SCT	74,2 $\pm$ 5%	72,8 $\pm$ 3%
SDZ	81,1 $\pm$ 1%	81,8 $\pm$ 8%
STZ	84,3 $\pm$ 2%	86,7 $\pm$ 6%
SMR	79,9 $\pm$ 7%	78,2 $\pm$ 4%
SMT	81,9 $\pm$ 12%	79,9 $\pm$ 2%
SCZ	49,2 $\pm$ 4%	48,3 $\pm$ 7%
SMX	71,7 $\pm$ 7%	89,7 $\pm$ 1%
SDX	75,6 $\pm$ 3%	75,7 $\pm$ 5%

Figura 29 – Influência do tamanho da partícula na limpeza do extrato

O maior tamanho de partícula influenciou positivamente na limpeza da amostra, o que fez com que o desenvolvimento do método fosse continuado com a fase Strata-XL. Os valores de recuperação, no entanto, estavam abaixo do satisfatório para uma técnica com potencial exaustivo com a SPE.

Como a matriz contém uma ampla variedade de compostos que se ionizam em diferentes faixas de pH, avaliou-se o uso de fases de troca iônica precedendo a fase polimérica (não iônica), visando reduzir os efeitos de saturação do sorvente pelos interferentes. Essa

abordagem é frequentemente utilizada para minimizar os efeitos da matriz, como pode ser visto em alguns trabalhos da literatura.^{97, 100}

Os resultados da avaliação da adição dos cartuchos de troca iônica podem ser vistos na Tabela 17. O método original foi mantido, mas os cartuchos foram condicionados separadamente.

Tabela 17 – Recuperação (%) dos analitos quando dois cartuchos são utilizados em sequência

Composto	Phenomenex Strata-XA	Chromabond HR-XA
SCT	42,1 ± 7%	76,0 ± 8%
SDZ	65,5 ± 1%	78,4 ± 3%
STZ	25,9 ± 9%	53,0 ± 10%
SMR	64,6 ± 4%	86,1 ± 6%
SMT	61,6 ± 6 %	97,8 ± 3%
SCZ	7,1 ± 3%	49,8 ± 5%
SMX	32,9 ± 7%	70,6 ± 1%
SDX	32,4 ± 8%	73,6 ± 3%

A recuperação diminui quando a fase Strata-XA foi utilizada e manteve-se com a HR-XA. Além disso, o efeito de limpeza foi evidente quando essa associação foi realizada, como mostrado na Figura 30.

Figura 30 – Comparação da limpeza do extrato quando com e sem a fase HR-XA

Apesar das melhorias, a recuperação de alguns dos compostos analisados ainda não era satisfatória levando-se em conta o potencial da técnica. Com a adição de uma fase trocadora de íons, que também é polimérica, existe a possibilidade de que parte das sulfonamidas analisadas se mantenha retida nesse primeiro sorvente. Dessa forma, avaliou-se o uso de um aditivo no solvente de eluição para auxiliar na remoção dos compostos. Como pode ser visto na Tabela 18, a adição de íons H^+ e OH^- no eluente foi feita visando alterar a afinidade dos compostos de interesse pela fase extratora, sendo o uso de um ácido comprovadamente mais apropriado. Tais resultados podem ser explicados pela forma em que as moléculas-alvo estão ionizadas. A adição de um aditivo básico pode alterar o estado de ionização das sulfonamidas, permitindo que possíveis ligações fortes com o sorvente trocador de ânions sejam realizadas e que a eluição seja impedida. Por outro lado, o aditivo ácido mantém o estado de ionização dos compostos alvo e pode alterar o dos interferentes, facilitando a remoção dos compostos ligados à fase extratora.

Tabela 18 – Efeito de adição de reagentes ácidos e básicos no solvente de eluição na recuperação dos compostos de interesse

Composto	Recuperação (%) com adição de 5% H ₃ PO ₄ em ACN	Recuperação (%) com adição de 5% NH ₄ OH em ACN
SCT	119,6 ± 8%	41,7
SDZ	85,1 ± 6%	36,3
STZ	100,8 ± 9%	88,4
SMR	105,0 ± 4%	25,0
SMT	104,3 ± 5%	75,0
SCZ	97,8 ± 5%	13,0
SMX	104,1 ± 6%	67,6
SDX	106,3 ± 9%	48,9

Como o método possuía recuperação satisfatória e apresentava repetitividade, seus principais parâmetros físicos e químicos foram avaliados, já utilizando a espectrometria de massas como forma de detecção. Utilizando um planejamento experimental completo do tipo 2³, avaliou-se a influência de parâmetros físicos e químicos na recuperação dos compostos de interesse, inclusive os recém adicionados TMP, SMZ e SQN. As Tabelas 19 e 20 apresentam os parâmetros estudados nos dois planejamentos.

Tabela 19 – Variáveis físicas envolvidas no planejamento experimental

Fator	Nível +1	Nível -1
Vazão da amostra	12 mL min ⁻¹	6 mL min ⁻¹
Volume de lavagem	10 mL	5 mL
Vazão de eluição	12 mL min ⁻¹	6 mL min ⁻¹

Tabela 20 – Variáveis químicas envolvidas no planejamento experimental

Fator	Nível +1	Nível -1
pH da amostra	7,0	3,4
pH de condicionamento	H ₂ O em pH 7,0	H ₂ O em pH 3,4
% de aditivo	5% H ₃ PO ₄	10% H ₃ PO ₄

Pelos diagramas de Pareto gerados (Anexos 1 e 2) observou-se que apenas o TMP sofre uma influência direta das variáveis físicas, obtendo melhorias significativas nos resultados de recuperação quando se utiliza menores vazões. Notou-se, também, que o pH da

amostra é parâmetro mais relevante dentre os avaliados, embora seja significativo apenas para a SMR. O TMP exibiu um comportamento diferente ao restante das sulfonamidas, muito provavelmente devido a sua natureza química diferenciada. Tais resultados, no entanto, podem ser reflexos da escolha de uma faixa de variação muito estreita, que não permitiu que variações significativas fossem observadas. A alteração dessa faixa, avaliando condições em que as amostras e os solventes estivessem em meio básico, por exemplo, poderia indicar resultados distintos dos que foram obtidos.

Por fim, como o método apresentou valores aceitáveis de precisão e recuperação para os todos os compostos, iniciou-se a etapa de validação. A Tabela 21 mostra como o método ficou definido.

Tabela 21 – Método SPE desenvolvido

	Solvente	Volume (mL)	Vazão (mL.min ⁻¹)
Lavagem	MeOH	5	12
Condicionamento	H ₂ O em pH 3,4 (0,1% ácido fórmico v/v)	5	12
Amostragem	Amostra em pH 3,4 (0,1% ácido fórmico v/v)	100	12
Lavagem	H ₂ O em pH 3,4 (0,1% ácido fórmico v/v)	10	12
Secagem	5 minutos sob pressão negativa		
Eluição	Acetonitrila 5% H ₃ PO ₄	5 mL	12

4.2.2 Validação dos métodos utilizando SPE

Nas Tabelas 22 e 23 são apresentados os principais resultados dos parâmetros avaliados na validação do método SPE-LC-QTOF. Os dados da validação completa podem ser vistos no Anexo 3.

Tabela 22 – Resultados referentes ao estudo da linearidade do método SPE-LC-QTOF

Composto	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Coefficiente angular*	Coefficiente linear*	Coefficiente de Correlação*	Calibração*
SCT	0,83	2,5 - 50	0,05	0,0004	0,997	$1/x^2$
SDZ	0,15	0,44 - 8,80	0,31	0,0055	0,996	$1/x^2$
STZ	0,15	0,45 - 9,00	0,34	-0,0104	0,994	$1/x^2$
SMR	0,11	0,32 - 6,40	0,15	0,0130	0,990	$1/x^2$
TMP	0,29	0,88 - 17,50	0,14	0,0077	0,986	$1/x^2$
SMT	0,12	0,37 - 7,50	0,07	-0,0030	0,986	$1/x^2$
SMZ	0,16	0,50 - 10	0,02	0,0040	0,986	$1/x^2$
SCZ	0,16	0,48 - 9,60	0,14	0,0130	0,987	$1/x^2$
SMX	0,13	0,40 - 8,0	0,27	0,0067	0,995	$1/x^2$
SDX	0,04	0,11 - 2,20	0,71	0,0037	0,994	$1/x^2$
SQN	0,07	0,21 - 4,20	0,39	0,0038	0,993	$1/x^2$

* Valores obtidos para a curva gerada pela amostra pré fortificada.

Tabela 23 – Outras figuras de mérito avaliadas na validação do método SPE-LC-QTOF

Composto	Exatidão (%)*	Precisão (%)*	Recuperação (%)*	Efeito de Matriz (%)*	Eficiência do Processo (%)*
SCT	97,0	7,7	91,3	43,4	40,6
SDZ	80,6	10,8	87,8	60,9	53,7
STZ	116,0	11,5	87,8	57,3	50,3
SMR	101,3	10,6	92,4	15,3	14,1
TMP	103,3	9,8	51,0	32,6	16,7
SMT	103,9	9,7	85,2	11,7	9,9
SMZ	116,7	9,8	66,2	11,9	7,9
SCZ	108,1	7,6	81,6	21,4	17,5
SMX	101,3	9,4	85,9	34,6	29,0
SDX	109,3	11,5	85,5	54,6	46,7
SQN	90,2	8,1	63,8	55,7	35,5

* Resultados referentes às médias combinadas de todos os pontos da curva

As curvas geradas não apresentaram um número de *outliers* significativo. Por isso, nenhum ponto ou curva foi descartado. O Teste F e a avaliação dos resíduos mostraram que os modelos construídos eram homocedásticos. Adicionalmente, todos os compostos apresentaram coeficientes de correlação superiores a 0,97. No entanto, visando-se reduzir

ainda mais os erros residuais oriundos dos modelos matemáticos, optou-se por utilizar a calibração ponderada para todos os analitos.

O método não detectou os compostos diclofenaco, sinvastatina e ácido salicílico durante a avaliação da seletividade, o que é um indicativo de que suas ionizações não foram efetivas. Por outro lado, apesar de serem detectados no extrato pós-fortificado (indicando que são ionizados satisfatoriamente), ibuprofeno, cafeína e nicotina apresentaram valores de recuperação menores que 50% quando comparou-se o extrato pré-fortificado. Esses resultados mostram que o método de preparo de amostras se mostrou razoavelmente seletivo, uma vez que elimina grande parte desses analitos.

A Tabela 24 mostra os parâmetros avaliados na robustez. Os itens assinalados por um “x” influenciam no método significativamente e precisam ser monitorados durante sua aplicação. Dentre eles, destacam-se o sorvente utilizado no preparo da amostra e a vazão da fase móvel. A visualização gráfica de todos os parâmetros para cada composto pode ser vista no Anexo 4. Essas influências são compreensíveis, uma vez que a fase extratora influi na recuperação e a fase móvel na separação e na ionização dos compostos.

Tabela 24 – Fatores que afetam a robustez do método SPE-LC-QTOF

Composto	Vazão da fase móvel	Temperatura do compartimento da coluna	Fase móvel	Fase extratora	Vazão do gás de secagem	Temperatura da fonte	Potencial da fonte
SCT		x	x	x			
SDZ	x			x	x		
STZ				x			x
SMR	x		x		x		
TMP	x			x			
SMT		x		x		x	x
SMZ	x			x			
SCZ		x		x			
SMX	x			x		x	
SDX	x				x	x	
SQN				x	x	x	

Apesar dos valores de exatidão, precisão e recuperação estarem apropriados para todos os compostos (excetuando-se os valores de recuperação da SQN, TMP e SMZ), o efeito de matriz é evidente no método e afeta sua quantificação, uma vez que parte das moléculas têm

seu sinal suprimido durante o processo. O tipo de analisador também não se mostrou apropriado para esse tipo de estudo, apresentando um comportamento que já foi relatado em alguns trabalhos da literatura, ou seja, apesar de mais íons atingirem o detector do equipamento, a presença dos interferentes da matriz aumenta consideravelmente o *background* da análise e reduz a S/R.^{107, 108}

Devido a isso, o método foi validado utilizando outro analisador de massas. Os resultados referentes à validação do método SPE-LC-QTRAP são mostrados nas Tabelas 25 e 26. Os dados da validação completa podem ser vistos no Anexo 5.

Tabela 25 - Resultados referentes ao estudo da linearidade do método SPE-LC-QTRAP

Composto	LD (ng L ⁻¹)	Faixa linear (ng L ⁻¹)	Coefficiente angular*	Coefficiente linear*	Coefficiente de Correlação*	Calibração*
SCT	0,33	1 – 375	0,022	3,75	0,990	1
SDZ	0,15	0,44 – 165	0,045	1,71	0,998	1
STZ	0,15	0,44 – 165	0,060	1,59	0,999	1
SMR	0,10	0,32 – 120	0,054	1,31	0,997	1
TMP	0,29	0,87 – 327	0,009	1,22	0,977	1
SMT	0,13	0,38 – 141	0,015	0,82	0,985	1/√y
SMZ	0,33	1 – 375	0,016	0,43	0,992	1/x ²
SCZ	0,16	0,48 – 180	0,015	1,34	0,995	1/√y
SMX	0,13	0,40 – 150	0,045	1,58	0,999	1/√y
SDX	0,04	0,12 – 45	0,214	3,68	0,996	1/√y
SQN	0,07	0,22 - 82,50	0,066	2,77	0,985	1/√y

* Valores obtidos para a curva gerada pela amostra pré fortificada.

Tabela 26 – Outras figuras de mérito avaliadas na validação da método SPE-LC-QTRAP.

Composto	Exatidão (%)*	Precisão (%)*	Recuperação (%)*	Efeito de Matriz (%)*	Eficiência do Processo (%)*
SCT	95,4	5,9	99,3	25,8	35,5
SDZ	96,0	7,3	99,8	38,0	38,2
STZ	106,7	8,5	92,7	40,4	37,4
SMR	101,5	7,6	91,3	31,9	29,2
TMP	101,8	12,5	60,7	62,7	37,0
SMT	110,6	6,5	99,6	76,2	76,1
SMZ	111,5	9,6	76,3	30,6	22,6
SCZ	87,3	13,4	93,8	50,7	47,3
SMX	100,1	8,4	97,5	24,0	23,5
SDX	84,1	9,7	96,5	69,3	66,2
SQN	100,3	9,8	91,9	81,0	74,6

* Resultados referentes às médias combinadas de todos os pontos da curva

Novamente o método não apresentou *outliers* significativos, mas precisou de calibração ponderada para alguns dos compostos, provavelmente devido a maior faixa linear avaliada. Os limites de detecção e quantificação foram muito mais atrativos se comparados com o do outro método validado, uma vez que estão na faixa de concentração em que grande parte dos antibióticos está presente no ambiente.

A comparação entre os dois métodos validados permitiu observar que a faixa linear do QTRAP é maior do que a do QToF. Tal constatação deve-se a diferenciações no sistema de detecção dos equipamentos, que permite que o triplo quadrupolo obtenha maiores faixas lineares.

Ocorre, também, um menor efeito de supressão de sinal no QTRAP para a maioria dos compostos analisados. O uso de maiores vazões de fase móvel propicia uma maior diluição do extrato, o que consequentemente reduz a competição entre a matriz e os analitos pela ionização, além de outras diferenças na tecnologia da fonte de íons. Essas diferenças em relação ao QToF também podem ter influenciado na observação de uma recuperação “aparente” mais alta dos compostos de interesse no caso da análise no QTRAP, assumindo-se que possam existir diferenças na constituição matricial dos extratos pré e pós fortificados.

O modo SRM permite uma análise altamente seletiva para as sulfonamidas, uma vez que apenas transições específicas são monitoradas. Nenhum dos compostos analisados foi detectado nesse instrumento, diferentemente do QToF. Essa comparação ilustra a maior

seletividade dos equipamentos do tipo triplo quadrupolo em relação a outros tipos de analisadores.

A Tabela 27 indica os parâmetros críticos observados no teste de robustez do método utilizando o analisador do tipo QTRAP. Nota-se que, diferentemente do método utilizando o QToF, o tipo de fase móvel e a temperatura da fonte são os fatores mais críticos nessa avaliação, o que se deve ao uso de maiores vazões pelo sistema cromatográfico, que influencia diretamente o processo de ionização. A visualização gráfica pode ser vista no Anexo 6.

Tabela 27 – Fatores que afetam a robustez do método SPE-LC-QTRAP

Composto	Temperatura do compartimento da coluna	Vazão da fase móvel	Fase extratora	Potencial da fonte	Fase móvel	Temperatura da fonte	Vazão do gás de secagem
SCT			x	x		x	x
SDZ						x	
STZ	x					x	x
SMR				x	x	x	
TMP	x					x	x
SMT				x	x	x	
SMZ			x		x		
SCZ				x	x	x	
SMX				x	x	x	
SDX				x	x	x	
SQN					x	x	

4.2.2.1 Aplicações dos métodos desenvolvidos

4.2.2.1.1 Avaliação do potencial do biorreator na remoção de SMX

Apesar do método SPE-LC-QTOF não atingir limites de quantificação apropriados para análises ambientais, seu uso foi satisfatório na avaliação da remoção de SMX pela ação

de um biorreator anaeróbio. As Figuras 31, 32 e 33 mostram o perfil de degradação do fármaco durante sua passagem pelo reator em três concentrações distintas.

Figura 31 – Avaliação da queda da concentração de SMX em reator RAHLF na concentração nominal inicial de alimentação de $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$

Figura 32 – Avaliação da queda da concentração de SMX em reator RAHLF na concentração nominal inicial de alimentação de $20,0 \mu\text{g L}^{-1}$

Figura 33 – Avaliação da queda da concentração de SMX em reator RAHLF na concentração nominal inicial de alimentação de $40,0 \mu\text{g L}^{-1}$

O perfil de queda da SMX foi quantificado em todas as três concentrações iniciais de alimentação do reator e demonstrou o seu potencial de remoção em níveis próximos aos em que tais compostos são encontrados no ambiente. Essas constatações possibilitam, inclusive, determinar-se parâmetros cinéticos aparentes que ocorrem durante esse processo com um volume relativamente baixo de amostras. Tais fatores, no entanto, não foram do escopo da presente dissertação, tendo sido utilizados pelo LPB em trabalho que resultou em dissertação de mestrado.¹¹⁸

4.2.2.1.2 Análise de amostras reais

A aplicação em amostras reais mostrou que, de fato, existem sulfonamidas e trimetoprima em mais de uma região da cidade. A Tabela 28 mostra a presença dos compostos em três locais distintos de coleta. Compostos demarcados por um “--” estão abaixo dos limites de detecção obtidos.

Tabela 28 – Compostos encontrados em rios da cidade (ng L⁻¹)

Composto	Ponto 4	Ponto 1	Ponto 3
TMP	26,9	--	--
SCT	12,2	--	--
STZ	--	6,7	--
SMX	--	6,5	--
SDZ	--	4,1	--
SCL	--	--	4,1
SMR	--	1,4	--

Os resultados mostraram que o método desenvolvido conseguiu quantificar sulfonamidas e trimetoprima em ambientes aquáticos não controlados. Eles fornecem indícios de que ocorre o descarte inadequado de medicamentos no ambiente, sendo a instrumentação, muitas vezes, o fator limitante para que um monitoramento mais efetivo e abrangente seja realizado. Como discutido anteriormente, a falta de controle sobre esse tipo de resíduo pode, a curto e médio prazo, acarretar em efeitos deletérios à saúde humana e animal.

4.3 Desenvolvimento da MEPS

O desenvolvimento do método utilizando MEPS foi menos laborioso, uma vez que grande parte dos parâmetros que afetam a qualidade da extração foi definida durante o desenvolvimento do método SPE. Todavia, foi necessário definir o número de ciclos de sucção e dispensação aplicados pela seringa para as etapas de condicionamento, amostragem, lavagem e eluição.

Preliminarmente, o método foi utilizado como mostrado na Tabela 29, utilizando 1 mL para todos os solventes e para a amostra. Utilizou-se 7 ciclos de amostragem para permitir que a troca entre a amostra e a fase extratora fossem suficientes.^{77, 78}

Tabela 29 – Método preliminar para a MEPS utilizando Phenomenex Strata-XL como fase extratora

	Solvente	Número de ciclos
Lavagem	Acetonitrila	7
Condicionamento	H ₂ O em pH 3,4 (0,1% ácido fórmico v/v)	7
Amostragem	Amostra em pH 3,4 (0,1% ácido fórmico v/v)	7
Lavagem	H ₂ O em pH 3,4 (0,1% ácido fórmico v/v)	7
Secagem	--	7
Eluição	Acetonitrila 5% H ₃ PO ₄	7

Após a eluição, a amostra foi seca em fluxo de nitrogênio e ressuspensa em volumes apropriados de H₂O, dependendo do tipo de análise e modo de injeção.

A aplicação do método miniaturizado gerou os resultados preliminares ilustrados na Tabela 30, sendo o extrato reconstituído em 50 µL (o que torna o extrato 20 vezes mais concentrado do que a amostra inicial, considerando-se uma recuperação de 100%).

Tabela 30 – Avaliação de parâmetros importantes na MEPS

Composto	RSD (%)	Recuperação (%)	Efeito de matriz (%)	Eficiência do processo (%)
SCT	14,7	56,8	60,3	34,3
SDZ	11,9	100,0	60,0	60,0
STZ	14,0	103,7	58,1	60,3
SMR	11,7	110,6	62,9	69,6
TMP	7,8	60,2	63,0	37,9
SMT	7,9	104,1	62,0	64,6
SMZ	12,7	119,2	69,3	82,6
SCZ	3,0	118,8	69,9	83,0
SMTZ	0,9	117,9	61,8	72,8
SDT	11,6	117,25	39,4	46,1
SQN	6,9	115,8	38,6	44,7

Os resultados mostraram melhorias na recuperação (excetuando-se a SCT e TMP), além da redução no efeito de matriz. Enquanto o método baseado em SPE utiliza 100 mg de fase extratora para 100 mL de amostra (o que gera uma razão de 1 mg/mL), a MEPS possui em média 4 mg para 1 mL (4 mg mL^{-1}). Esse aumento na relação sorvente/amostra pode ter sido o responsável por reduzir os efeitos de saturação do sorvente e propiciar essas melhorias nos resultados da extração.

Como o método apresentava valores de recuperação e efeito de matriz adequados, os principais parâmetros envolvidos na técnica foram estudados utilizando planejamento experimental fracionário do tipo 2^{4-1} , conforme mostrado nas Tabelas 31 e 32.

Tabela 31 – Variáveis físicas envolvidas no planejamento experimental

Fator	Nível +1	Nível -1
Ciclos de condicionamento	15	7
Ciclos de amostragem	15	7
Ciclos de lavagem	15	7
Ciclos de eluição	15	7

Tabela 32 – Variáveis químicas envolvidas no planejamento experimental

Fator	Nível +1	Nível -1
pH de condicionamento	3,4	7,0
pH da amostra	3,4	7,0
Fase Estacionária	ST-XL	Mista ST-XL/HR-XA
% de aditivo	5% de H ₃ PO ₄	Sem aditivo

Pelos diagramas de Pareto gerados (Anexos 7 e 8) comprovou-se que o número de ciclos não foi significativo na faixa avaliada para todos os compostos avaliados. Sendo assim, optou-se por usar o menor número de repetições para cada etapa do método para que o método se tornasse menos laborioso. No que se refere às variáveis químicas, apenas a fase extratora exerce de fato uma influência significativa, o que fez com que a possibilidade de uso de uma fase mista fosse descartada por apresentar efeito negativo.

Dessa forma, o método mostrou-se apto a ser validado e utilizado em análises ambientais. Todavia, a aplicabilidade da técnica seria seriamente comprometida se fosse utilizada de maneira convencional, uma vez que não consegue pré-concentrar os analitos de interesse como na SPE devido à baixa quantidade de amostra utilizada, o que tornaria os limites de detecção e quantificação consideravelmente maiores. Consequentemente, a potencialidade do QToF (no que se refere ao seu alto poder de resolução) seria restrita apenas a técnicas que utilizam maiores volumes de amostras. Sendo assim, novas alternativas foram desenvolvidas visando aproveitar as vantagens da técnica miniaturizada para análises que requisitassem, inclusive, limites de detecção comparáveis àqueles obtidos por técnicas como a SPE.

4.4 Miniaturização das condições cromatográficas

A primeira alternativa visando-se potencializar a aplicação da MEPS foi miniaturizar a análise cromatográfica. A redução do uso de fase móvel em quase 100 vezes possibilita que os analitos sejam mais concentrados, o que consequentemente melhora a detectabilidade dos compostos de interesse.

O resultado dessa transferência de escala pode ser vista na Figura 34, que mostra cromatogramas sobrepostos que foram obtidos no modo convencional e capilar, sendo suas escalas normalizadas em função de suas S/R. Ambas foram realizadas em gradiente de

solventes, utilizando o mesmo comprimento de onda para a detecção e fases estacionárias da mesma espécie.

Figura 34 – Cromatogramas sobrepostos ilustrando os ganhos em detectabilidade do sistema capilar com detecção por UV. Do menor ao maior tempo de retenção: SCT, SDZ, STZ, SMR, SMT, SCZ, SMX e SDX

Além de tornar a amostra mais concentrada, o sistema capilar obteve menores ruídos na linha de base, que aumentaram a S/R e possibilitaram que menores níveis de detecção fossem atingidos.

No entanto, como observado na Figura 35, a comparação das curvas de van Deemter para as colunas analíticas utilizadas nos dois sistemas indica que os valores de H estão compatíveis. Isso mostra que a redução do diâmetro e do tamanho das partículas não afetou a eficiência dos picos obtidos e que o uso de partículas de baixo diâmetro e/ou superficialmente porosas é recomendado para análises em que busca-se alta eficiência.¹¹⁶

Figura 35 – Comparação entre curvas de van Deemter do sistema convencional e capilar

A Tabela 33 mostra a razão entre as áreas obtidas comparando-se o sistema cromatográfico convencional e o capilar utilizando o mesmo sistema de detecção por espectrometria de massas.

Tabela 33 – Comparação entre os sistemas convencional e capilar utilizando detecção por espectrometria de massas.

Composto	$A_{\text{cap}}/A_{\text{conv}}$
SCT	$2,7 \pm 1\%$
SDZ	$2,1 \pm 1\%$
STZ	$2,5 \pm 0,7\%$
SMR	$2,5 \pm 1\%$
TMP	$2,8 \pm 1\%$
SMTX	$3,1 \pm 2\%$
SMZ	$4,2 \pm 0,3\%$
SCP	$3,8 \pm 1\%$
SMTZ	$4,9 \pm 0,5\%$
SDT	$4,0 \pm 0,7\%$
SQN	$3,8 \pm 0,6\%$

Dessa forma, foi possível observar-se que o sistema capilar consegue obter ganhos em detectabilidade importantes quando se utiliza um preparo que não é satisfatório em relação ao seu poder de concentração. Apesar de existirem diferenças no que se refere à forma com que os analitos foram ionizados, observa-se que, em termos globais, ocorre um ganho razoável em detectabilidade.

4.5 SPE *online*

4.5.1 Caracterização das colunas de extração

Apesar de a MEPS utilizar menores volumes para a reconstituição do seu extrato, o fator de concentração propiciado ainda não é satisfatório se comparado ao da SPE. Uma das alternativas encontradas para potencializar o seu uso foi aproveitar todo esse volume gerado focalizando-o em um sistema de extração *online*. Essa ferramenta, aliada aos já demonstrados ganhos do sistema capilar, pode satisfatoriamente suprir as limitações de detectabilidade da técnica MEPS em relação a SPE.

Os primeiros testes utilizando o sistema multidimensional valeram-se de pré-colunas comerciais empacotadas com C18. Porém, assim como ocorrido na SPE convencional, a polaridade das sulfonamidas impossibilitou uma retenção efetiva. Como a fase Strata-X

mostrou um comportamento satisfatório no desenvolvimento *off-line*, optou-se por também utilizá-la nessa configuração. Os primeiros protótipos de colunas foram feitos com capilares de sílica fundida, mas as altas pressões impossibilitaram o uso prolongado, pois causavam rompimento de sua estrutura. Dessa forma, o uso de colunas de aço mostrou-se mais apropriado. A Figura 36 mostra a comparação da retenção dos compostos utilizando os dois tipos de fases extratoras.

Figura 36 – Comparação entre sistemas de extração *online*. Do menor ao maior tempo de retenção: STZ, SMR, SMT, SCZ, SMX e SDX.

Como o desenvolvimento foi feito utilizando-se detecção por UV, apenas os compostos que não apresentavam sobreposição foram avaliados. As Figuras 37 e 38 mostram curvas de calibração de SDX geradas pela injeção de amostras de padrão no modo convencional e em *column switching*.

Figura 37 – Curva gerada para o sistema com injeção em *column switching*

Figura 38 – Curva gerada para o sistema com injeção direta

A razão entre as inclinações geradas pelas duas curvas é de aproximadamente 125, que é exatamente o volume de injeção utilizado no modo CS. Dessa forma, concluiu-se que não ocorrem perdas durante o procedimento de extração e que o aumento de área possui um comportamento linear em relação à concentração. No entanto, a mesma característica não pôde ser constatada de modo inequívoco para os compostos mais polares. Como observado na Figura 39, os compostos menos retidos apresentaram problemas na eluição, gerando picos assimétricos e sobrepostos. Visando definir se os compostos ficavam retidos e, caso afirmativo, qual a melhor proporção de solventes para serem dessorvidos, avaliou-se o fator de retenção de alguns analitos em diversas proporções de solvente. Os resultados são mostrados na Figura 40.

Figura 39 – Dispersão dos picos cromatográficos. Do menor para o maior tempo de retenção: SDZ+STZ+SMR, SMR, SMT, SCZ e SMX

Figura 40 – Fatores de retenção utilizando-se a pré-coluna com o sorvente Phenomenex Strata-X

Observou-se que os compostos estudados apresentaram fatores de retenção relativamente altos quando o carregamento da amostra era feito em solvente totalmente aquoso (ou seja, 0% de solvente orgânico), com exceção para a sulfacetamida. No entanto, é possível notar que os compostos não apresentam uma variação linear de $\log K$ quando o percentual de ACN é alterado, fato observado em outros trabalhos na literatura.⁶² Dentre os compostos avaliados, apenas a SCT apresentava fatores de retenção significativamente menores do que outros compostos, o que exigiu que a sua dessorção em função do tempo de passagem do solvente fosse avaliada. Como pode ser visto na Figura 41, o modelo de sigmoide de Boltzmann adequou-se satisfatoriamente, em concordância a outros trabalhos da literatura focados em estudos de retenção de compostos polares.¹²² A aplicação do modelo mostra que a passagem do solvente pela fase extratora gera perdas menores do que 10% durante os primeiros sete minutos. Essa informação é de extrema utilidade, pois permitiu definir a vazão ótima da bomba de carregamento para que os compostos de interesse não fossem dessorvidos significativamente.

Figura 41 – Avaliação da perda por dessorção da sulfacetamida durante a passagem da fase móvel na vazão de 30 $\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$

Assumindo-se que os resultados obtidos para o composto mais polar se aplicariam para os analitos com maiores tempos de retenção, concluiu-se que a coluna apresentava capacidade retentiva necessária, podendo ser utilizada em conjunto com outros sistemas de preparo de amostra.

4.5.2 Desenvolvimento do método de análise por SPE *online*

O método foi desenvolvido e aplicado como mostrado na Tabela 34.

Tabela 34 – Método CS-cLC

Gradiente*	Giro de válvulas	Volumes de Injeção
0 a 7 min - 20%	Posição 1 (carregamento) - 0 a 6 min	Full loop - 125 μL
7 a 8 min - 50%	Posição 2 (eluição) - 6 a 12	Partical loop – 50 μL
8 - 12 min - 20%	Posição 3 (carregamento) - 12 a 15	Microliter pickup - 42 μL

* Variação referente à proporção de acetonitrila

A proporção de fase orgânica é suficiente para eluir adequadamente os compostos com maior fator de retenção sem o alargamento dos menos retidos, propiciando um bom efeito de ionização dos compostos de interesse. O tempo de giro de válvulas é suficiente para que o conteúdo injetado chegue à coluna sem ocorrerem perdas por dessorção.

4.6 Associação entre MEPS, SPE *online* e cromatografia capilar

A miniaturização do sistema de análise, aliado ao melhor aproveitamento do extrato com o auxílio do sistema *online*, possibilitou uma ampliação do escopo utilizando MEPS. A versatilidade do sistema de injeção possibilitou avaliar a melhor alternativa em termos de uso da amostra e reprodutibilidade. A Tabela 34 mostra os limites de detecção obtidos pelo método desenvolvido quando dois modos de injeção distintos são aplicados.

Tabela 35 – Limites de detecção e quantificação encontrados para o método MEPS-CS-cLC-QTOF

Composto	MEPS-CS-cLC-QTOF (<i>Microliter pickup</i>)		MEPS-CS-cLC-QTOF (<i>Partial loop</i>)	
	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
SCT	0,17	0,50	1,00	2,50
SDZ	0,03	0,09	0,06	0,18
STZ	0,03	0,09	0,06	0,18
SMR	0,03	0,09	0,10	0,29
TMP	0,06	0,17	0,10	0,30
SMT	0,03	0,10	0,15	0,45
SMZ	0,02	0,07	0,05	0,15
SCZ	0,03	0,09	0,07	0,22
SMX	0,03	0,08	0,10	0,30
SDT	0,01	0,02	0,02	0,06
SQN	0,01	0,04	0,04	0,12

Observou-se que os limites de quantificação são menores quando o modo *microliter pick-up* é utilizado. Essa melhoria deve-se, em grande parte, ao melhor uso da amostra, uma vez que esse sistema de injeção utiliza 100% do extrato pré-estabelecido no método de análise. Dessa forma é possível obter um melhor proveito do extrato, permitindo utilizar-se menores volumes de solvente para a sua ressuspensão, se necessário. Tal fato, aliado ao SPE *online*, que comprovadamente consegue reter os analitos satisfatoriamente, permite que

grande parte do que é injetado seja enviado ao detector. O modo *partial loop*, no entanto, necessita de um excesso do volume além do especificado para injeção, o que exige que mais extrato do que é realmente demarcado para a análise esteja disponível. Como parte dos analitos é perdida, a detectabilidade diminui. O modo *microliter pick-up* utilizou 42 µL de extrato, o que permitiu que se utilizasse um volume de ressuspensão de 50 µL. O modo *partial*, no entanto, utilizou 62,5 µL, o que fez se utilizasse um volume de 100 µL para que essa quantidade fosse injetada adequadamente. Sendo assim, o efeito de diluição dos analitos, aliado a perdas pela maneira com que eles são injetados, fazem com que o modo *partial loop* seja preterido nesse tipo de análise.

Dessa forma foi possível demonstrar-se que, mesmo utilizando-se pequenos volumes de amostra, limites de detecção e quantificação comparáveis aos obtidos utilizando-se técnicas exaustivas que usam grandes volumes podem ser atingidos se abordagens que potencializem ao máximo as vantagens de cada tipo de preparo forem utilizados. O uso das características do QToF, dessa forma, também pode ser mais bem aproveitado, permitindo que abordagens futuras explorando sua alta resolução sejam aplicadas com maior eficiência.

5 Conclusões

Os métodos utilizando SPE como técnica de preparo de amostras foram desenvolvidos, validados e aplicados com sucesso. O método SPE-LC-QTOF conseguiu demonstrar o potencial de biorreatores anaeróbios de leito fixo na remoção de sulfonamidas em concentrações próximas às aquelas em que são encontradas no ambiente. Paralelamente, o método SPE-LC-QTRAP obteve êxito em detectar e quantificar sulfonamidas em diversas águas superficiais da cidade de São Carlos. Do ponto de vista teórico, foi possível comparar os dois espectrômetros de massa em função das características de cada fonte de ionização e analisador. Observou-se que, em concordância com o que é visto na literatura, o uso de analisadores do tipo QTOF pode limitar a aplicabilidade da SPE para análises ambientais, pois ele não consegue atingir os limites de detecção e quantificação necessários mesmo com a capacidade de concentração dos analitos fornecida pela técnica de extração. O modo SRM mostrou-se fundamental para a obtenção desses baixos limites, embora seja extremamente dependente da separação cromatográfica para que o máximo de detectabilidade seja explorado. Além disso, a seletividade desse tipo de operação é muito maior se comparada a modos convencionais de detecção.

A associação entre técnicas miniaturizadas de preparo de amostra e análise cromatográfica obteve ótimos resultados e abriu possibilidades de aplicações que só seriam possíveis com grandes volumes de amostra e instrumentos de alta detectabilidade, como o QTRAP. O uso do sistema de extração online possibilitou um melhor uso do extrato obtido pela MEPS, principalmente no modo de injeção *microliter pick-up*.

O desenvolvimento do trabalho, por fim, permitiu desenvolver conceitos técnicos sólidos sobre preparo de amostra, cromatografia e espectrometria de massas, além de propiciar a construção do senso crítico no que se refere ao uso consciente das ferramentas disponíveis. Dessa forma, conclui-se que o trabalho atingiu seus objetivos e possibilitará que novas aplicações sejam realizadas futuramente.

6 Referências Bibliográficas

1. BISARYA, R. K.; PURI, S. The Bhopal gas tragedy – A perspective. **Journal of loss prevention in the process industries**, v. 18, p. 209-212, 2005.
2. ENGELHAUPT, E. Happy birthday, Love Canal. **Environmental science & technology**, v. 42, n. 22, p. 8179-8186, 2008.
3. HARADA, M. Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. **Critical reviews in toxicology**, v. 25, n 1, p. 1-24, 1995.
4. Connectcut: IMS Health, 2013. Study Forecasts Rebound in Global Spending on Medicines, Reaching Nearly \$1.2 Trillion By 2016. Disponível em: <<http://www.imshealth.com/portal/site/imshealth/menuitem.c76283e8bf81e98f53c753c71ad8c22a/?vgnextoid=4d47d1822e678310VgnVCM10000076192ca2RCRD&vgnnextfmt=default>>. Acesso em 27 out. 2013.
5. CALISTO, V.; ESTEVES, V. I. Psychiatric pharmaceuticals in the environment. **Chemosphere**, v. 77, n. 10, p. 1257-1274, 2009.
6. DĘBSKA, J.; KOT-WASIK, A.; NAMIEŚNIK, J. Fate and Analysis of Pharmaceutical Residues in the Aquatic Environment. **Critical reviews in analytical chemistry**, v. 34, n. 1, p. 51-67, 2004.
7. HEBERER, T. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. **Toxicology letters**, v. 131, n. 1, p. 5-17, 2002.
8. LE-MINH, N.; KHAN, S. J.; DREWES, J. E.; STUETZ, R. M. Fate of antibiotics during municipal water recycling treatment processes. **Water research**, v. 44, n. 15, p. 4295-4323, 2010.
9. HEBERER, T.; REDDERSEN, K.; MECHLINSKI, A. From municipal sewage to drinking water: fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment in urban areas. **Water science and technology**, v. 46, n. 3, p. 81-88, 2002.
10. ANKLEY, G. T.; BROOKS, B. W.; HUGGETT, D. B.; SUMPTER, J. P. Repeating history: pharmaceuticals in the environment. **Environmental Science and Technology**, v. 15, p. 8211-8217, 2007.
11. BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Química nova**, v. 26, n. 4, p. 523-530, 2003.

12. GARRISON, A. W.; POPE, J. D.; ALLEN, F. R. **Identification and analysis of organic pollutants in water**. Michigan: Ann Arbor Science Publishers, 1976. 517 p.
13. HIGNITE, C.; AZARNOFF, D. L. Drugs and drug metabolites as environmental contaminants: chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent. **Life sciences**, v. 20, n. 3, 337-342, 1977.
14. PURDOM, C. E.; HARDIMAN, P. A.; BYE, V. V. J.; ENO, N. C.; TYLER, C. R.; SUMPTER, J. P. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. **Chemistry and ecology**, v. 8, n. 4, p. 275-285, 1994.
15. DESBROW, C.; ROUTLEDGE, E. J.; BRIGHTY, G. C.; SUMPTER, J. P.; WALDOCK, M. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. **Environmental science & technology**, v. 32, n. 11, p. 1549-1558, 1998.
16. DESBROW, C.; ROUTLEDGE, E. J.; BRIGHTY, G. C.; SUMPTER, J. P.; WALDOCK, M. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. In Vivo Responses in Trout and Roach. **Environmental science & technology**, v. 32, n. 11, p. 1559-1565, 1998.
17. BROOKS, B. W.; CHAMBLISS, C. K.; STANLEY, J. K.; RAMIREZ, A.; BANKS, K. E.; JOHNSON, R. D.; & LEWIS, R. J. Determination of select antidepressants in fish from an effluent-dominated stream. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 24, n. 2, p. 464-469, 2005.
18. BROOKS, B. W.; FORAN, C. M.; RICHARDS, S. M.; WESTON, J.; TURNER, P. K.; STANLEY, J. K.; SOLOMON, K. R. Aquatic ecotoxicology of fluoxetine. **Toxicology letters**, v. 142, n. 3, p. 169-183, 2003.
19. BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J.-L.; CANTÓN, R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. **Current opinion in biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 260-265, 2008.
20. CORCORAN, J.; WINTER, M. J.; TYLER, C. R. Pharmaceuticals in the aquatic environment: a critical review of the evidence for health effects in fish. **Critical reviews in toxicology**, v. 40, n. 4, p. 287-304, 2010.
21. GAO, P.; MUNIR, M.; XAGORARAKI, I. Correlation of tetracycline and sulfonamide antibiotics with corresponding resistance genes and resistant bacteria in a conventional municipal wastewater treatment plant. **The science of the total environment**, v. 421, p. 173-83, 2012.

22. MIRANDA, C. D.; CASTILLO, G. Resistance to antibiotic and heavy metals of motile aeromonads from Chilean freshwater. **The science of the total environment**, v. 224, n. 1, 167-176, 1998.
23. Word Health Organization. Classifications. The Anatomical Therapeutic Chemical Classification System with Defined Daily Doses. Organização Global, 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/entity/classifications/atcddd/en/>>. Acesso em 27 out. 2013.
24. SMITH, A. E.; MILWARD, L. J. Thin-layer chromatographic detection of the herbicide asulam in soils and the identification of sulphanilamide as a minor soil degradation product. **Journal of chromatography**, v. 265, p. 378-381, 1983.
25. DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Veterinary parasitology**, v. 67, n. 1, p. 1-59, 1996.
26. MASTROLORENZO, A.; SUPURAN, C. T. Antifungal activity of Ag (I) and Zn (II) complexes of sulfacetamide derivatives. **Metal-based drugs**, v. 7, n. 1, p. 49-54, 2000.
27. BARAN, W.; ADAMEK, E.; ZIEMIAŃSKA, J.; SOBCZAK, A. Effects of the presence of sulfonamides in the environment and their influence on human health. **Journal of hazardous materials**, v. 196, p. 1-15, 2011.
28. REMKO, M.; VON DER LIETH, C.-W. Theoretical study of gas-phase acidity, pKa, lipophilicity, and solubility of some biologically active sulfonamides. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 12, n. 20, p. 5395-5403, 2004.
29. SUKUL, P.; SPITELLER, M. Sulfonamides in the environment as veterinary drugs. **Reviews of environmental contamination and toxicology**, v. 187, p. 67-101, 2006.
30. LIN, A. Y.-C.; TSAI, Y.-T. Occurrence of pharmaceuticals in Taiwan's surface waters: impact of waste streams from hospitals and pharmaceutical production facilities. **The science of the total environment**, v. 407, n. 12, p. 3793-3802, 2009.
31. KOLPIN, D. W.; FURLONG, E. T.; MEYER, M. T.; THURMAN, E. M.; ZAUGG, S. D.; BARBER, L. B.; BUXTON, H. T. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. **Environmental science & technology**, v. 36, n. 6, p. 1202-1211, 2002.
32. TAMTAM, F.; MERCIER, F.; LE BOT, B.; EURIN, J.; TUC DINH, Q.; CLÉMENT, M.; CHEVREUIL, M. Occurrence and fate of antibiotics in the Seine River in various hydrological conditions. **The science of the total environment**, v. 393, n. 1, p. 84-95, 2008.

33. KURWADKAR, S. T.; ADAMS, C. D.; MEYER, M. T.; KOLPIN, D. W. Effects of sorbate speciation on sorption of selected sulfonamides in three loamy soils. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 4, p. 1370-1376, 2007.
34. PERRET, D.; GENTILI, A.; MARCHESE, S.; GRECO, A.; CURINI, R. Sulphonamide Residues in Italian Surface and Drinking Waters: A Small Scale Reconnaissance. **Chromatographia**, v. 63, n. 5, p. 225-232, 2006.
35. CHU, Q.; ZHANG, D.; WANG, J.; YE, J. Multi-residue analysis of sulfonamides in animal tissues by capillary zone electrophoresis with electrochemical detection. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 89, n. 14, p. 2498-2504, 2009.
36. DOLLIVER, H.; KUMAR, K.; GUPTA, S. Sulfamethazine uptake by plants from manure-amended soil. **Journal of environmental quality**, v. 36, n. 4, p. 1224-1230, 2007.
37. LU, K.-H.; CHEN, C.-Y.; LEE, M.-R. Trace determination of sulfonamides residues in meat with a combination of solid-phase microextraction and liquid chromatography-mass spectrometry. **Talanta**, v. 72, n. 3, p. 1082-1087, 2007.
38. SKOLD, O. Sulfonamides and trimethoprim. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 8, n. 1, p. 1-6, 2010.
39. BYRNE-BAILEY, K. G.; GAZE, W. H.; KAY, P.; BOXALL, A. B. A.; HAWKEY, P. M.; WELLINGTON, E. M. H. Prevalence of sulfonamide resistance genes in bacterial isolates from manured agricultural soils and pig slurry in the United Kingdom. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, p. 696-702, 2005.
40. KOZAK, G. K.; BOERLIN, P.; JANECKO, N.; REID-SMITH, R. J.; JARDINE, C. Antimicrobial resistance in Escherichia coli isolates from swine and wild small mammals in the proximity of swine farms and in natural environments in Ontario, Canada. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 3, p. 559-566, 2009.
41. ZAIAT, Marcelo. Desenvolvimento e análise de biorreatores anaeróbios contendo células imobilizadas para tratamento de águas residuárias. 2003. Tese (Livre Docência em Engenharia Hidráulica e de Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.
42. WILLIAMS, K. R. Colored Bands: History of Chromatography. **Journal of chemical education**, v. 79, n. 8, p. 922-923, 2002.

43. STRAIN, H. H.; SHERMA, J. Michael Tswett's contributions to sixty years of chromatography. **Journal of chemical education**, v. 44, n. 4, p. 235-237, 1967.
44. LEDERER, E. La renaissance de la méthode chromatographique de M. Tswett en 1931. **Journal of chromatography**, v. 73, p. 361-366, 1972.
45. MARTIN, A. J. P.; SYNGE, R. L. M. A new form of chromatogram employing two liquid phases. 1. A theory of chromatography. 2. Application to the micro-determination of the higher monoamino-acids in proteins. **Biochemical journal**, v. 35, n. 12, p. 1358-1368, 1941.
46. JAMES, A T.; MARTIN, A J. P. Liquid-gas partition chromatography: a technique for the analysis of volatile materials. **The analyst**, v. 77, n. 921, p. 915-932, 1952.
47. SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J. **Introduction of chromatography**. Canada: Wiley, 2009. 960 p.
48. Eluotropic strength of solvents. Disponível em:
<<http://www.sanderkok.com/techniques/hplc/eluotropic.html>>. Acesso em 29 out. 2013.
49. GRIFFITHS, J. A brief history of mass spectrometry. **Analytical chemistry**, v. 80, n. 15, p. 5678-5683, 2008.
50. Dass, C. **Fundamentals of contemporary mass spectroscopy**. New York: Wiley, 2007. 587 p.
51. ARDREY, B. **Liquid chromatography-mass spectrometry: An introduction**. New York: Wiley, 2003. 276 p.
52. SMITH, R. M. **Understanding mass spectra: a basic approach**. New York: Wiley, 2004. 371 p.
53. VOYKSNER, R. B. Atmospheric pressure ionization LC/MS: new solutions for environmental analysis. **Environmental science & technology**, v. 28, n. 3, p. 118-127, 1994.
54. THOMSON, B. A. Atmospheric pressure ionization and liquid chromatography/mass spectrometry – together at last. **Journal of the american society for mass spectrometry**, v. 9, p. 187-193, 1998.
55. BOYD, R. K.; BASIC, C.; BETHEM, R. A. **Trace quantitative analysis by mass spectroscopy**. New York: Wiley, 2008. 730 p.
56. EKMAN, R.; SILBERRING, J.; WESTMAN-BRINKMALM, A. M.; KRAJ, A. **Mass spectroscopy: Instrumentation, interpretation and applications**. New York: Wiley, 2009. 390 p.

57. LANÇAS, F. M. **Extração em fase sólida (SPE)**. São Carlos: Rima, 2001. 96 p.
58. QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluídos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química nova**, v. 24, n. 1, p. 68-76, 2001.
59. CRATHORNE, B.; WATTS, C. D.; FIELDING, M. A. Analysis of non-volatile compounds in water by high-performance liquid chromatography. **Journal of chromatography**, v. 185, p. 671-690, 1979.
60. RAVELO-PÉREZ, L. M.; HERRERA-HERRERA, A. V.; HERNÁNDEZ-BORGES, J.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M. A. **Carbon nanotubes: solid phase extraction**. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, n. 16, p. 2618-2641, 2010.
61. BUSZEWSKI, B.; SZULTKA, M. Past, presente and future of solid phase extraction: a review. **Critical reviews in analytical chemistry**, v. 42, n. 3, p. 198-213, 2012.
62. HENNION, M.-C. Solid phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. **Journal of chromatography A**, v. 856, n. 1, p. 3-54, 1999.
63. NAZÁRIO, Carlos Eduardo Domingues. Desenvolvimento e caracterização de materiais baseados em sílica com aplicabilidade em extração em fase sólida e cromatografia líquida de ultra alta eficiência. 2013. Tese (Doutorado). Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.
64. CAMPÍNS-FALCÓ, P.; HERRÁEZ-HERNÁNDEZ, R.; SEVILLANO-CABEZA, A. Column Switching techniques for high-performance liquid chromatography of drugs in biological samples. **Journal of chromatography**, v. 619, p. 177-190, 1993.
65. SANTOS-NETO, A. J.; MARKIDES, K. E.; SJÖBERG, P. J. R.; BERGQUIST, J.; LANÇAS, F. M. Capillary column switching restricted-access media-liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry system for simultaneous and direct analysis of drugs in biofluids. **Analytical chemistry**, v. 79, p. 6359-6367, 2007.
66. ANASTAS, P. T. Green Chemistry and the role of analytical methodology development. **Critical reviews in analytical chemistry**, v. 29, n. 3, p. 167-175, 1999.
67. PRADO, A. G. S. Química Verde, os desafios da química do novo milênio. **Química nova**, v. 26, n. 5, p. 738-744, 2003.
68. TOBISZEWSKI, M.; MECHLINSKA, A.; ZYGMUNT, B.; NAMIESNIK, J. Green Analytical Chemistry in sample preparation for determination of trace organic pollutants. **Trends in analytical chemistry**, v. 28, n. 8, p. 943-951, 2009.

69. ARMENTA, S.; GARRIDES, S.; DE LA GUARDIA, M. Green Analytical Chemistry. **Trends in analytical chemistry**, v. 27, n. 6, p. 497-511, 2008.
70. PAWLISZYN, J.; LORD, H. Evolution of solid phase microextraction technology. **Journal of chromatography A**, v. 885, p. 153-193, 2000.
71. RASMUSSEN, K. E.; PEDERSEN-BJERGAARD, S. Liquid Phase Microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid-liquid extraction. **Journal of chromatography A**, v. 1184, p. 132-142, 2008.
72. REZAEI, M.; YAMINI, Y.; FARAJI, M. Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method. **Journal of chromatography A**, v. 1217, p. 2342-2357, 2010.
73. BALTUSSEN, E.; SANDRA, P.; DAVID, F.; CRAMERS, C. Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: theory and principles. **Journal of microcolumn separations**, v. 11, n. 10, p. 737-747, 1999.
74. LANÇAS, F. M.; QUEIROZ, M. E. C.; GROSSI, P.; OLIVARES, I. R. B. Recent developments and applications of stir bar sorptive extraction. **Journal of separation science**, v. 32, p. 813-824, 2009.
75. KAWAGUSHI, M.; FUJII, S.; ITOH, N.; ITO, R.; NAKAZAWA, H.; TAKATSU, A. Development of vail wall sorptive extraction and its application to determination of progesterone in human serum. **Journal of chromatography A**, v. 1216, p. 7553-7557, 2009.
76. JÖNSSON, J. A.; MATHIASSEN, L. Membrane Extraction in analytical chemistry. **Journal of separation science**, n. 24, p. 495-507, 2001.
77. ABDEL-REHIM, M. Microextraction by packed sorbente (MEPS): A tutorial. **Analytica chimica acta**, v. 701, p. 119-128, 2011.
78. ALTUN, Z.; ABDEL-REHIM, M. Study of factors affecting the performance of microextraction by packed sorbente (MEPS) using liquid scintillation counter and liquid chromatography-tandem mass spectroscopy. **Analytica chimica acta**, v. 630, p. 116-123, 2008.
79. CHERVET, J. P.; URSEM, M.; SALZMANN, J. P. Instrumental requirements for nanoscale liquid chromatography. **Analytical chemistry**, v. 68, n. 9, p. 1507-1512, 1996.
80. SAITO, Y.; JINNO, K.; GREIBROCK, T. Capillary columns in liquid chromatography: Between conventional and microchips. **Journal of separation science**, v. 17, n. 18, p. 1379-1390, 2004.

81. MACNAIR, J. E.; PATEL, K. D.; JORGENSEN, J. W. Ultrahigh-Pressure Reversed-Phase Capillary Liquid Chromatography: Isocratic and Gradient Elution Using Columns Packed with 1 μ m Particles. **Analytical chemistry**, v. 71, n. 3, p. 700-708, 1999.
82. WU, N.; LIPPERT, J. A.; LEE, M. L. Practical aspects of ultrahigh pressure capillary liquid chromatography. **Journal of chromatography A**, v. 911, n. 1, p. 1-12, 2001.
83. ONGHENA, M.; MOLINER-MARTINEZ, Y.; PICÓ, Y.; CAMPÍNS-FALCÓ, P.; BARCELÓ, D. Analysis of 18 perfluorinated compounds in river waters: Comparison of high performance liquid chromatography-tandem mass spectroscopy, ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectroscopy and capillary liquid chromatography-mass spectroscopy. **Journal of chromatography A**, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.04.056>
84. SILVA, R. G. C.; COLLINS, C. H.; BOTTOLI, C. B. G. Cromatografia Líquida Capilar: Estado da arte e aplicações. **Química nova**, v. 34, n. 5, p. 841-849, 2011.
85. CHUNG, Y.; LEE, K. Separation and determination of eleven environmental protection agency priority phenols by reversed-phase capillary high performance chromatography with indirect fluorophotometric detection and solid phase extraction. **Microchemical journal**, v. 69, p. 143-152, 2001.
86. HONGZHE, T.; BINGCHENG, Y.; WENNA, G.; YAFENG, G. Microcolumn Solid-Phase Extraction coupled online to capillary liquid chromatography using a valve switching technique. **Chinese journal of analytical chemistry**, v. 34, n. 6, p. 759-763, 2006.
87. PEREIRA-FILHO, E. R.; PEREIRA, F. M. V.; LEMOS, S. G. Introducing factorial design concepts using experiments with multi-colored chocolates. **Chemical educator**, v. 14, p. 200-203, 2009.
88. CHUI, Q. S. H. Uncertainties related to linear calibration curves: a case study for flame atomic absorption spectrometry. **Journal of the brazilian chemical society**, v. 18, n. 2, p. 424-430, 2007.
89. WEST, D. M., SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J. **Fundamentos de química analítica**. Rio de Janeiro: Thomson. 112 p.
90. HOWARTH, R.; MILLER, J. Is my calibration linear? **Anayst**, v. 119, p. 2363-2366, 1994.
91. GONZÁLEZ, A. G.; HERRADOR, M. A.; A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. **Trends in analytical chemistry**, v. 26, n. 3, p. 227-238, 2007.

92. ALMEIDA, A. M.; CASTEL-BRANCO, M. M.; FALCÃO, A. C. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. **Journal of chromatography B**, v. 774, n. 2, p. 215-222, 2002.
93. MATUSZEWSKI, B. K.; CONSTANZER, M. L.; CHAVEZ-ENG, C. M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. **Analytical chemistry**, v. 75, n. 13, p. 2019-3030, 2003.
94. HEYDEN, Y. V.; NIJHUIS, A.; SMEYERS-VERBEKE, J.; VANDEGINSTE, B. G. M.; MASSART, D. L. Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 24, n. 5, p. 723-753, 2001.
95. PETROVIC, M.; GROS, M.; BARCELO, D. Multi-residue analysis of pharmaceuticals in wastewater by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. **Journal of chromatography A**, v. 1124, n. 1, p. 68-81, 2006.
96. BALAKRISHNAN, V. K.; TERRY, K. A.; TOITO, J. Determination of sulfonamide antibiotics in wastewater: a comparison of solid phase microextraction and solid phase extraction methods. **Journal of chromatography A**, v. 1131, n. 1, p. 1-10, 2006.
97. RAICH-MONTIU, J.; FOLCH, J.; COMPAÑÓ, R.; GRANADOS, M.; PRAT, M. D. Analysis of trace levels of sulfonamides in surface water and soil samples by liquid chromatography-fluorescence. **Journal of chromatography A**, v. 1172, n. 2, p. 186-193, 2007.
98. BOWERS, L. D.; PEDIGO, S. Solvent strength columns studies on polystyrene-divinylbenzene columns, **Journal of chromatography**, v. 311, p. 243-251, 1986.
99. SNYDER, L. R.; DOLAN, J. W.; GANT, J. R. Gradient elution in high-performance liquid chromatography: theoretical basis for reversed-phase systems. **Journal of chromatography**, v. 165, p. 3-30, 1979.
100. LOCATELLI, M. A. F.; SODRÉ, F. F.; JARDIM, W. F. Determination of antibiotics in Brazilian surface waters using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 60, n. 3, p. 385-393, 2011.
101. BEN, W.; QIANG, Z.; ADAMS, C.; ZHANG, H.; CHEN, L. Simultaneous determination of sulfonamides, tetracyclines and tiamulin in swine wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of chromatography A**, v. 1202, n. 2, p. 173-80, 2008.
102. HUERTA-FONTELA, M.; GALCERAN, M. T.; VENTURA, F. Fast liquid chromatography-quadrupole-linear ion trap mass spectrometry for the analysis of

- pharmaceuticals and hormones in water resources. **Journal of chromatography A**, v. 1217, n. 25, p. 4212-4222, 2010.
103. GRITTI, F.; LEONARDIS, I.; SHOCK, D.; STEVENSON, P.; SHALLIKER, A.; GUIOCHON, G. Performance of columns packed with the new shell particles, Kinetex-C18. **Journal of chromatography A**, v. 1217, n. 10, p. 1589-1603, 2010.
104. FEKETE, S.; OLÁH, E.; FEKETE, J. Fast liquid chromatography: The domination of core-shell and very fine particles. **Journal of chromatography A**, v. 1228, p. 57-71, 2012.
105. TRUFELLI, H.; PALMA, P.; FAMIGLINI, G.; CAPPIELLO, A. an overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry. **Mass spectrometry reviews**, v. 30, p. 491-509, 2011.
106. BONFIGLIO, R.; KING, R. C.; OLAH, T. V.; MERKLE, K. The Effects of Sample Preparation Methods on the Variability of the Electrospray Ionization Response for Model Drug Compounds. **Rapid communications in mass spectrometry**, v. 13, n. 12, p. 1175-1185, 1999.
107. NUNEZ, O.; MOYANO, E.; GALCERAN, M. T. Time-of-flight high resolution versus triple quadrupole tandem mass spectrometry for the analysis of quaternary ammonium herbicides in drinking water. **Analytical chimica acta**, v. 525, n. 2, p. 183-190, 2004.
108. HERMO, M. P.; BARRON, D.; BARBOSA, J. Development of analytical methods for multiresidue determination of quinolones in pig muscle samples by liquid chromatography with ultraviolet detection, liquid chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography A**, v. 1201, n. 1, p. 132-139, 2008.
109. BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003. **Diário oficial da união**, Brasília, 02 de junho de 2003. Seção 1, p.1.
110. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Guia de validação e controle de qualidade analítica**. Brasília, 2011. 78 p.
111. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. **DOQ-CGCRE-008**: Orientação sobre validação de métodos analíticos. Brasília, 2011. 19 p.
112. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. **Q2B**: Guideline of analytical procedures methodology: comments for its application. Agência Global, 1995. 5 p.

113. EURACHEM. **Guide to quality in analytical chemistry**: an aid to accreditation. União Européia, 2004. 57 p.
114. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Analytical procedures and method validation**. Estados Unidos, 2000. 37 p.
115. NATIONAL ASSOCIATION OF TESTING AUTHORITIES. **Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods**. Austrália, 2012. 32 p.
116. WU, N.; BRADLEY, A. C.; WELCH, C. J.; ZHANG, L. Effect of extra-column volume on practical chromatographic parameters of sub-2 μm particle-packed columns in ultra-high pressure liquid chromatography. **Journal of separation Science**, v. 35, n. 16, p. 2018-2025, 2012.
117. LOZADA, Patrícia Torres. **Desempenho de um reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) de bancada no tratamento de substrato sintético simulando esgotos sanitário sob diferentes condições de operação**. 1992. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1992.
118. CHATILA, Sami. **Biodegradação de sulfametoxazol e ciprofloxacino em reator anaeróbio horizontal de leito fixo**. 2013. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.
119. Ilustração de uma seringa de MEPS. Disponível em:
<<http://www.sge.com/products/meps>> Acesso em 29/10/2013.
120. Valores de pKa's e logP de sulfonamidas e trimetoprima. Disponível em:
<<http://www.drugbank.ca/>> Acesso em 29/10/2013.
121. Ilustração de tubos e conexões capilares. Disponível em:
<<http://www.vici.com/>> Acesso em 29/10/2013.
122. BACALUM, E.; CHEREGI, M.; DAVID, V. Retention studies of polar compounds in solid-phase extraction on different bonded silica-based adsorbents. **Revue roumaine de chimie**, v. 4, n. 57, p. 427-434, 2012.

ANEXOS

Anexo 1 – Diagramas de Pareto obtidos pelo planejamento experimental do método SPE. Nele foram avaliados os parâmetros físicos em um planejamento do tipo 2³

Sulfacetamida

Sulfadiazina

Sulfatiazol

Sulfamerazina

Sulfametazina

Trimetoprima

Sulfametizol

Sulfacloropiridazina

Sulfametoxazol

Sulfadimetoxina

Sulfaquinoxalina

Anexo 2 – Diagramas de Pareto obtidos pelo planejamento experimental do método SPE.
Nele foram avaliados os parâmetros químicos em um planejamento do tipo 2³

Sulfacetamida

Sulfadiazina

Sulfatiazol

Sulfamerazina

Sulfametazina

Trimetoprima

Sulfametizol

Sulfacloropiridazina

Sulfametoxazol

Sulfadimetoxina

Sulfaquinoxalina

Anexo 3 – Resultados completos da validação do método SPE-LC-QTO F

LINEARIDADE				
Composto	Inclinação	Intercepção	Correlação	Calibração
Sulfacetamida	0,05	0,0004	0,997	$1/x^2$
Sulfadiazina	0,31	0,0055	0,996	$1/x^2$
Sulfatiazol	0,34	-0,0104	0,994	$1/x^2$
Sulfamerazina	0,15	0,0130	0,990	$1/x^2$
Trimetoprim	0,14	0,0077	0,986	$1/x^2$
Sulfametazina	0,07	-0,0030	0,986	$1/x^2$
Sulfametizol	0,02	0,0040	0,986	$1/x^2$
Sulfacloropiridazina	0,14	0,0130	0,987	$1/x^2$
Sulfametoxazol	0,27	0,0070	0,995	$1/x^2$
Sulfadimetoxina	0,71	0,0037	0,994	$1/x^2$
Sulfaquinoxalina	0,39	0,0038	0,993	$1/x^2$

EXATIDÃO (%)			
Composto	P. Exatidão 1	P. Exatidão 2	P. Exatidão 3
Sulfacetamida	95,8	97,7	97,6
Sulfadiazina	79,9	80,7	81,1
Sulfatiazol	120,3	114,7	113,1
Sulfamerazina	106,2	98,7	98,9
Trimetoprim	106,2	102,4	101,3
Sulfametazina	117,6	104,2	89,7
Sulfametizol	115,3	120,3	114,4
Sulfacloropiridazina	107,7	117,5	99,2
Sulfametoxazol	90,5	110,8	102,6
Sulfadimetoxina	115,1	110,6	102,0
Sulfaquinoxalina	91,4	84,8	94,3

Eficiencia do Processo (%)			
Composto	P1	P3	P6
Sulfacetamida	22,4	44,5	54,9
Sulfadiazina	42,3	57,5	61,3
Sulfatiazol	45,3	51,9	53,8
Sulfamerazina	11,1	16,1	15,1
Trimetoprim	15,2	19,4	15,4
Sulfametazina	7,2	11,3	11,2
Sulfametizol	6,4	8,9	8,4
Sulfacloropiridazina	16,2	19,8	16,5
Sulfametoxazol	26,0	30,9	30,0
Sulfadimetoxina	38,8	50,4	50,9
Sulfaquinoxalina	31,7	37,7	37,2

CONCENTRAÇÕES DA CURVA ANALÍTICA E DA AVALIAÇÃO DA EXATIDÃO										
Composto	LD (ng/mL)	P1 (ng/mL)	P2 (ng/mL)	P3 (ng/mL)	P4 (ng/mL)	P5 (ng/mL)	P6 (ng/mL)	P. Exatidão 1 (ng/mL)	P. Exatidão 2 (ng/mL)	P. Exatidão 3 (ng/mL)
Sulfacetamida	1,00	2,50	10,00	20,00	30,00	40,00	50,00	5,00	15,00	25,00
Sulfadiazina	0,18	0,44	1,76	3,52	5,28	7,04	8,80	0,88	2,64	4,40
Sulfatiazol	0,18	0,45	1,80	3,60	5,40	7,20	9,00	0,90	2,70	4,50
Sulfamerazina	0,13	0,32	1,28	2,56	3,84	5,12	6,40	0,64	1,92	3,20
Trimetoprim	0,35	0,88	3,50	7,00	10,50	14,00	17,50	1,75	5,25	8,75
Sulfametazina	0,15	0,38	1,50	3,00	4,50	6,00	7,50	0,75	2,25	3,75
Sulfametizol	0,20	0,50	2,00	4,00	6,00	8,00	10,00	1,00	3,00	5,00
Sulfacloropiridazina	0,19	0,48	1,92	3,84	5,76	7,68	9,60	0,96	2,88	4,80
Sulfametoxazol	0,16	0,40	1,60	3,20	4,80	6,40	8,00	0,80	2,40	4,00
Sulfadimetoxina	0,04	0,11	0,44	0,88	1,32	1,76	2,20	0,22	0,66	1,10
Sulfaquinoxalina	0,08	0,21	0,84	1,68	2,52	3,36	4,20	0,42	1,26	2,10

Obs: Utilizou-se Trimetoprima, Sulfadiazina e Sulfametoxazol deuterados como padrões internos, na concentração P3 dos próprios compostos na forma mais abundante.

Composto	Recuperação (%)			Efeito de Matriz (%)		
	P1	P3	P6	P1	P3	P6
Sulfacetamida	79,2	93,5	101,3	28,2	47,6	54,2
Sulfadiazina	84,1	87,9	91,4	50,3	65,4	67,1
Sulfatiazol	84,1	87,9	91,4	53,9	59,1	58,9
Sulfamerazina	92,2	87,4	97,5	12,0	18,4	15,4
Trimetoprim	47,0	57,5	48,7	32,4	33,7	31,6
Sulfametazina	88,1	84,4	83,1	8,1	13,4	13,5
Sulfametizol	64,7	66,8	67,0	9,9	13,4	12,5
Sulfacloropiridazina	80,5	84,3	79,9	20,1	23,4	20,6
Sulfametoxazol	82,1	87,7	88,0	31,6	35,3	37,1
Sulfadimetoxina	82,9	90,7	82,9	46,8	55,6	61,4
Sulfaquinoxalina	64,3	63,7	63,3	49,3	59,2	58,7

Composto	PRECISÃO/DESVIO PADRÃO RELATIVO (%)					
	Dia 1			Dia 2		
	P1	P3	P6	P1	P3	P6
Sulfacetamida	8,6	2,2	3,2	3,3	1,7	6,0
Sulfadiazina	6,2	7,6	3,9	13,2	1,0	4,4
Sulfatiazol	4,7	4,5	7,1	6,0	2,0	4,7
Sulfamerazina	10,9	7,1	9,8	7,4	6,9	8,6
Trimetoprim	8,3	3,9	5,0	3,8	2,7	6,5
Sulfametazina	4,8	6,6	11,6	6,3	7,0	8,3
Sulfametizol	8,3	3,9	5,0	3,8	2,7	6,5
Sulfacloropiridazina	6,7	4,6	8,4	3,5	1,5	3,7
Sulfametoxazol	5,7	4,6	5,4	6,4	14,9	5,4
Sulfadimetoxina	6,6	4,2	10,2	3,5	0,7	3,2
Sulfaquinoxalina	6,3	5,9	9,3	4,4	1,8	2,7

Composto	PRECISÃO/DESVIO PADRÃO RELATIVO (%)					
	Dia 3			Combinada dos 3 dias		
	P1	P3	P6	P1	P3	P6
Sulfacetamida	4,9	14,8	8,8	9,3	8,2	5,7
Sulfadiazina	8,0	5,2	4,5	15,6	9,0	7,7
Sulfatiazol	6,9	3,8	2,5	14,2	8,2	12,2
Sulfamerazina	3,7	0,1	11,0	15,3	6,2	10,4
Trimetoprim	1,0	2,2	7,5	9,8	13,1	6,4
Sulfametazina	3,9	2,3	10,3	8,4	8,6	12,0
Sulfametizol	1,0	2,2	7,5	9,8	13,1	6,4
Sulfacloropiridazina	2,8	4,4	14,1	6,2	4,2	12,4
Sulfametoxazol	4,2	22,8	3,8	9,0	13,5	5,7
Sulfadimetoxina	8,3	1,6	2,7	12,9	11,1	10,5
Sulfaquinoxalina	10,2	3,5	2,6	10,1	5,5	8,6

Anexo 4 – Apresentação gráfica dos resultados da avaliação da robustez do método SPE-LC-QTOF

Anexo 5 – Resultados completos da validação do método SPE-LC-QTRAP

LINEARIDADE				
Composto	Inclinação	Intercepção	Correlação	Calibração
Sulfacetamida	0,022	3,75	0,9886	1
Sulfadiazina	0,045	1,71	0,9978	1
Sulfatiazol	0,060	1,59	0,9990	1
Sulfamerazina	0,054	1,31	0,9968	1
Trimetoprim	0,009	1,22	0,9773	1
Sulfametazina	0,015	0,82	0,9856	1/vy
Sulfametizol	0,016	0,43	0,9917	1/x ²
Sulfacloropiridazina	0,015	1,34	0,9950	1/vy
Sulfametoxazol	0,045	1,58	0,9987	1/vy
Sulfadimetoxina	0,214	3,69	0,9962	1/vy
Sulfaquinoxalina	0,066	2,77	0,9854	1/vy

EXATIDÃO (%)			
Composto	P. Exatidão 1	P. Exatidão 2	P. Exatidão 3
Sulfacetamida	94,8	96,3	95,3
Sulfadiazina	98,4	86,4	103,3
Sulfatiazol	111,2	111,6	97,3
Sulfamerazina	100,3	98,0	106,3
Trimetoprim	109,3	106,0	90,2
Sulfametazina	113,7	110,7	107,5
Sulfametizol	117,9	119,1	97,4
Sulfacloropiridazina	83,9	86,0	92,0
Sulfametoxazol	100,7	95,9	103,7
Sulfadimetoxina	83,3	84,3	84,7
Sulfaquinoxalina	95,7	97,6	107,7

Eficiencia do Processo (%)			
Composto	P1	P3	P6
Sulfacetamida	54,2	28,1	24,0
Sulfadiazina	49,3	26,3	39,0
Sulfatiazol	39,9	30,5	41,7
Sulfamerazina	34,9	24,6	28,2
Trimetoprim	41,9	34,3	34,8
Sulfametazina	75,7	84,9	67,6
Sulfametizol	14,7	19,7	33,2
Sulfacloropiridazina	60,0	44,8	37,0
Sulfametoxazol	26,9	18,5	25,3
Sulfadimetoxina	72,3	64,0	62,3
Sulfaquinoxalina	77,0	83,6	63,3

CONCENTRAÇÕES DA CURVA ANALÍTICA E DA AVALIAÇÃO DA EXATIDÃO										
Composto	LD (ng/L)	P1 (ng/L)	P2 (ng/L)	P3 (ng/L)	P4 (ng/L)	P5 (ng/L)	P6 (ng/L)	P. Exatidão 1 (ng/L)	P. Exatidão 2 (ng/L)	P. Exatidão 3 (ng/L)
Sulfacetamida	0,40	1,00	5,00	50,00	125,00	250,00	375,00	25,00	75,00	200,00
Sulfadiazina	0,18	0,44	2,20	22,00	55,00	110,00	165,00	11,00	33,00	88,00
Sulfatiazol	0,18	0,44	2,20	22,00	55,00	110,00	165,00	11,00	33,00	88,00
Sulfamerazina	0,13	0,32	1,60	16,00	40,00	80,00	120,00	8,00	24,00	64,00
Trimetoprim	0,35	0,87	4,35	43,50	108,75	217,50	326,25	21,75	65,25	174,00
Sulfametazina	0,15	0,38	1,88	18,75	46,88	93,75	140,63	9,38	28,13	75,00
Sulfametizol	0,40	1,00	5,00	50,00	125,00	250,00	375,00	25,00	75,00	200,00
Sulfacloropiridazina	0,19	0,48	2,40	24,00	60,00	120,00	180,00	12,00	36,00	96,00
Sulfametoxazol	0,16	0,40	2,00	20,00	50,00	100,00	150,00	10,00	30,00	80,00
Sulfadimetoxina	0,05	0,12	0,60	6,00	15,00	30,00	45,00	3,00	9,00	24,00
Sulfaquinoxalina	0,09	0,22	1,10	11,00	27,50	55,00	82,50	5,50	16,50	44,00

Obs: Utilizou-se Trimetoprima, Sulfadiazina e Sulfametoxazol deuterados como padrões internos, na concentração P3 dos próprios compostos na forma mais abundante.

Composto	Recuperação (%)			Efeito de Matriz (%)		
	P1	P3	P6	P1	P3	P6
Sulfacetamida	98,7	103,9	95,3	25,0	27,1	25,2
Sulfadiazina	105,4	96,8	97,4	46,7	27,2	40,0
Sulfatiazol	103,6	87,8	86,7	38,5	34,7	48,1
Sulfamerazina	96,6	89,7	87,4	36,1	27,4	32,2
Trimetoprim	50,3	68,6	63,2	83,2	50,0	55,0
Sulfametazina	110,8	100,1	87,8	68,4	83,5	76,9
Sulfametizol	81,2	79,9	67,7	18,2	24,7	49,1
Sulfaclopiridazina	89,0	100,9	91,5	67,4	44,4	40,4
Sulfametoxazol	100,0	94,5	98,0	26,9	19,5	25,8
Sulfadimetoxina	88,5	106,7	94,2	81,7	60,0	66,1
Sulfaquinoxalina	95,2	95,5	84,9	80,8	87,5	74,6

Composto	PRECISÃO/DESVIO PADRÃO RELATIVO (%)					
	Dia 1			Dia 2		
	P1	P3	P6	P1	P3	P6
Sulfacetamida	3,6	0,8	2,2	6,7	3,3	1,0
Sulfadiazina	4,1	6,4	4,0	11,1	2,3	4,8
Sulfatiazol	10,8	3,9	2,5	13,3	8,8	1,1
Sulfamerazina	5,6	4,4	0,3	9,9	9,5	1,6
Trimetoprim	10,0	6,3	7,0	14,9	2,3	12,0
Sulfametazina	6,0	4,1	4,7	5,8	2,3	2,3
Sulfametizol	8,9	7,8	14,6	15,1	4,6	0,9
Sulfaclopiridazina	14,0	7,3	6,4	14,8	13,4	2,7
Sulfametoxazol	7,9	8,6	3,7	9,5	5,3	1,1
Sulfadimetoxina	9,9	11,3	7,8	6,0	4,5	3,9
Sulfaquinoxalina	3,1	9,6	6,9	9,2	14,9	7,9

Composto	PRECISÃO/DESVIO PADRÃO RELATIVO (%)					
	Dia 3			Combinada dos 3 dias		
	P1	P3	P6	P1	P3	P6
Sulfacetamida	1,9	3,8	6,2	6,2	5,8	5,5
Sulfadiazina	5,1	6,7	6,1	6,4	6,5	8,9
Sulfatiazol	12,0	9,2	6,2	10,6	8,0	6,8
Sulfamerazina	13,1	4,4	6,1	8,6	6,9	7,4
Trimetoprim	8,3	10,0	13,8	11,6	12,2	13,8
Sulfametazina	2,3	4,1	3,2	7,2	7,7	4,7
Sulfametizol	7,0	6,1	4,8	10,9	7,9	9,8
Sulfaclopiridazina	9,2	8,4	9,5	17,9	13,4	9,0
Sulfametoxazol	0,5	12,3	9,5	8,9	9,0	7,3
Sulfadimetoxina	5,3	12,4	10,6	8,8	10,4	9,8
Sulfaquinoxalina	3,8	5,8	8,9	8,2	10,7	10,6

Anexo 6 – Apresentação gráfica dos resultados da avaliação da robustez do método SPE-LC-QTRAP

Anexo 7 – Diagramas de Pareto obtidos pelo planejamento experimental do método MEPS. Nele foram avaliados os parâmetros físicos em um planejamento do tipo 2^{4-1}

Sulfacetamida

Sufadiazina

Sulfatiazol

Sulfamerazina

Sulfametazina

Trimetoprima

Sulfametizol

Sulfacloropiridazina

Sulfametoxazol

Sulfadimetoxina

Sulfaquinoxalina

Anexo 8 – Diagramas de Pareto obtidos pelo planejamento experimental do método MEPS.
Nele foram avaliados os parâmetros químicos em um planejamento do tipo 2^{4-1}

Sulfacetamida

Sulfadiazina

Sulfatiazol

Sulfamerazina

Sulfametazina

Trimetoprima

Sulmetizol

Sulfacloropiridazina

Sulfametoxazol

Sulfadimetoxina

Sulfaquinoxalina