**Desenvolvimento e validação de métodos SPE-LC-MS e
MEPS-LC-MS para quantificação de fluoroquinolonas
em matrizes aquosas**

Maura Roquete Amparo

Orientador: Prof. Dr. Álvaro José dos Santos Neto

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

São Carlos

2013

Maura Roquete Amparo

**Desenvolvimento e validação de métodos SPE-LC-MS e MEPS-LC-MS para
quantificação de fluoroquinolonas em matrizes aquosas**

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

Exemplar revisado

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

São Carlos

2013

Dedicatória

*Dedico essa dissertação, em especial,
aos meus pais, Mauro e Anete,
aos meus irmãos Lucas e Tatiane,
e a toda minha família,
por todo amor e apoio incondicional.*

Agradecimentos

Agradeço a Deus que com seu infinito amor guiou-me ao longo dessa caminhada, sempre me dando força, saúde e coragem para vencer todas as dificuldades e pela constante providencia divina que vivi em cada momento, especialmente por ter colocado pessoas especiais durante toda essa caminhada.

Aos meus pais Mauro e Anete, pelo constante e incondicional amor, dedicação, apoio, proteção, carinho e por primarem pela minha educação, vocês são para mim grande exemplo de vida e fé. Aos meus irmãos Lucas e Tatiane, que pelas trocas de ensinamentos de uma vida acadêmica descobrimos a nossa individualidade, e independente da distância, estávamos sempre unidos em nossas orações. A toda minha família que apesar da grande distância não negaram nenhuma forma de apoio e de intercessão a Deus por mim. Ao meu namorado Thiago, por todo carinho, paciência e amor, dedicados a mim e que apesar da distância, sua força e perseverança, sempre me motivaram a nunca desaminar e sempre seguir em frente.

Agradeço ao Prof. Dr. Álvaro José dos Santos Neto, em especial pela sua grandiosidade e sensibilidade em desempenhar o papel de orientador, repleto de muita educação, companheirismo, incentivo, dedicação e interesse no desenvolvimento da pesquisa. Obrigado professor por todo ensinamento partilhado, pela amizade e oportunidade.

A todos os amigos do Lab. de Cromatografia - IQSC, pelo aprendizado e partilha constate, pelo respeito e agradável convívio. Agradeço em especial ao Carlos, ao Felipe, ao Lucas, a Maraíssa, a Meire e a Raquel, pela imensa amizade, companheirismo e carinho dados sem cessar, além dos bons momentos de conversa, gargalhadas e diversão; vocês foram essenciais em todos os momentos, e sempre serão os “*the best*”. Agradeço também a Bruna Schiavon pela grande amizade e por toda parceria, colaboração e empenho dado para o desenvolvimento do projeto.

Ao prof. Marcelo Zaiat – Laboratório de Processos Biológicos da EESC – pelo incentivo e infraestrutura disponibilizada especialmente, o LC-QTRAP® 5500 para o desenvolvimento do trabalho. Agradeço a todo seu grupo, em especial ao Paulo, Sami e ao Guilherme Oliveira pelas sugestões, ajuda, pela persistência e dedicação à pesquisa, além dos bons momentos de conversa e partilha.

Ao prof. Fernando Mauro Lanças pelo apoio à pesquisa e por ter disponibilizado toda infraestrutura do CROMA para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço a Elaine, a Odete e ao Guilherme Titato pela ajuda e apoio constante.

A todos meus amigos e colegas que fiz em São Carlos, especialmente às minhas amigas de república pelos momentos de distração, pelo carinho, amizade, cuidado e pela partilha constante de todas as alegrias e dificuldades “da vida de pós-graduação”. Agradeço também ao Grupo de Partilha de Profissionais-GPP, pela amizade, carinho e intercessão constante em suas orações.

Ao IQSC, pelo espaço físico e pela formação dada aos alunos do programa de pós-graduação. À secretaria da pós-graduação pela ajuda e dedicação disponibilizadas.

À FAPESP, pelo apoio financeiro concedido aos laboratórios que participaram do desenvolvimento deste trabalho e pela confiança especial dada ao trabalho desenvolvido. A CAPES e CNPq, pelo auxílio financeiro também dado ao desenvolvimento deste trabalho.

A todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho,

MUITO OBRIGADA!

*“A vontade de Deus nunca irá levá-lo
aonde a graça de Deus não irá protegê-lo”*

RESUMO

Os antimicrobianos, especialmente a classe das fluoroquinolonas (FQs), são utilizados em grandes quantidades na medicina humana e veterinária. Uma atenção especial deve ser dada à ocorrência desses fármacos em diferentes matrizes ambientais, devido a potencialidade de propagação da resistência bacteriana. As principais fontes dessa contaminação são os esgoto industrial, urbanos, esgoto sanitário de hospital e de fazendas que utilizam antibióticos com finalidades veterinárias. Após a ingestão, os antimicrobianos são excretados na sua forma inalterada e, devido a baixa eficiência dos sistemas convencionais de tratamento de esgoto, são eventualmente liberados para o meio aquático. Diferentes métodos têm sido desenvolvidos para a determinação de FQs em amostras aquosas diversas, tais como esgoto sanitário, água de abastecimento, águas superficiais e esgoto sanitário de hospital. A maior parte dessas amostras ambientais é complexa e exige uma série de etapas de preparo, limpeza e pré-concentração; de maneira que, nos últimos anos, extensos esforços têm sido feitos para o desenvolvimento de novas técnicas de preparo de amostra que reduzam o tempo, trabalho, consumo de solvente e que permitam melhor desempenho do processo analítico. Nesse estudo foram desenvolvidos dois métodos de extração – a extração em fase sólida (SPE) e a microextração por sorvente empacotado (MEPS) – sendo a separação, identificação e quantificação feitos por HPLC-MS/MS. Os métodos foram avaliados e validados segundo os parâmetros: precisão, exatidão, recuperação, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), seletividade, efeito matriz, eficiência total do processo e robustez. Posteriormente, foi feita aplicação dos métodos desenvolvidos para investigação de FQs em águas superficiais e amostra de esgoto coletadas em diferentes pontos da cidade de São Carlos-SP. Os métodos apresentaram valores de recuperação maiores que 80% para as FQs estudadas, e valores de exatidão e precisão menores que 30%. A comparação entre as técnicas de extração desenvolvidas permitiu listar vantagens e desvantagens particulares de cada técnica. Além do menor consumo de solventes e volume de amostras, valores insignificantes de efeito matriz foram alcançados para a técnica MEPS; no entanto a SPE, devido ao seu maior fator de concentração, permitiu a quantificação de duas fluoroquinolonas em amostra de esgoto doméstico e detecção das mesmas em amostra de rio.

ABSTRACT

Antimicrobials, particularly the fluoroquinolones (FQs) class, are widely used in human and veterinary medicine. Particular attention must be given to the occurrence of these drugs in different environmental matrices, due to the potential spread of bacterial resistance. Effluents from industries, residential districts, hospitals and animal farms are the main sources of contamination by antibiotics. After ingestion, the antimicrobials are excreted in its unchanged form. Due to the low efficiency of conventional wastewater treatments, these antimicrobials are eventually released into the aquatic environment. Several methods have been developed for the determination of FQs in different water samples, such as municipal wastewater, tap water, river water, and hospital sewage. Most of these environmental samples is complex and requires a number of preparation steps, cleaning and preconcentration. For this reason, recently, extensive efforts have been made to develop new techniques for sample preparation in order to reduce: time, number of steps, solvent consumption and achieve better performance on the analytical process. This work describes the development of two methods of extraction – by solid phase extraction (SPE) and microextraction by packed sorbent (MEPS) – and separation, identification and quantification by HPLC-MS/MS. These methods were evaluated and validated by studying the following parameters: accuracy, precision, recovery, linearity, limit of detection (MDL), limit of quantification (MQL), selectivity, matrix effect, process efficiency and robustness. These methods were subsequently applied for FQs investigation in surface water and sewage sample collected at different points in the city of Sao Carlos/SP, Brazil. The methods recoveries achieved values greater than 80% for the studied FQS and the accuracy and precision values were satisfactory when compared to the values acceptable by regulatory agencies such as EPA and AOAC. A comparison between the extraction techniques developed allowed listing advantages and disadvantages of each particular technique. Besides the lowest solvent consumption and volume of samples, negligible values of matrix effects were achieved for MEPS technique. However, SPE, due to its higher pre-concentration, allowed the quantification of two fluoroquinolones in a sample of sewage and the detection in river sample.

Lista de ilustrações

Figura 1 - Possíveis rotas para contaminação ambiental por fármacos.	17
Figura 2 - (a) Levantamento realizado no mês de dezembro de 2012 utilizando as palavras “antibiotics” e “wastewaters” encontradas nos títulos, resumos ou palavras-chave das publicações indexadas. (b) Comparação com os estudos que adicionalmente apresentavam a(s) palavra(s) degradação e/ou remoção nos mesmos campos de busca.....	18
Figura 3 - Estrutura das FQs estudadas nesse trabalho.	19
Figura 4 - Esquema das etapas geralmente empregadas na extração em fase sólida.	23
Figura 5 - Esquema de uma microsseringa de MEPS, com detalhe para o BIN. Adaptado de Abdel-Rehim. (22).....	24
Figura 6 - Etapas ilustrativas da MEPS.	25
Figura 7 - Mapa representativo, para indicação dos pontos de coleta realizados na cidade de São Carlos-SP. Tais amostras foram aplicados nos métodos SPE-LC-QTRAP/MS e MEPS-LC-QTRAP/MS.....	37
Figura 8 - Cromatogramas sobrepostos das fluoroquinolonas estudadas. Condições gerais: volume de injeção: 1 µL; FM: (A) ácido fórmico 0,1% e (B) ACN; eluição por gradiente (0,01 min 8% B; 16 min 20% B; 17 min 8% B e 22 min 8% B); temperatura do forno 40 °C e vazão 0,5 mL min ⁻¹	43
Figura 9 - Fluxograma do procedimento otimizado para a extração em fase sólida.	45
Figura 10 - Esquema dos cartuchos de SPE em série.....	46
Figura 11 - Fluxograma do método SPE utilizado para amostras aquosas complexas.	46
Figura 12 - Gráfico de barras, avaliando a eficiência total do método para os seis pares de cartuchos candidatos a serem utilizados em SPE.	47
Figura 13 - Fotografia comparativa dos extratos obtidos em SPE - Strata XA versus Chromabond HRXA.	48
Figura 14 - Gráfico de barras mostrando a eficiência total de extração dos cartuchos Strata X e Strata XL.	49
Figura 15 - Fotografia da seringa utilizada para MEPS e do microdispositivo de extração confeccionado no IQSC (destaque para o dispositivo desmontável, na parte superior da fotografia).	49
Figura 16 - Diagramas de Pareto de NOR (A) e CIP (B) para o planejamento fatorial 2 ³	51
Figura 17 - Diagramas de Pareto de NOR (A) e CIP (B) para o planejamento fatorial 2 ²	52
Figura 18 - Superfície de resposta para volume de eluição e número de ciclos de eluição.	52

Figura 19 - Fluxograma das etapas envolvidas na extração por MEPS.	53
Figura 20 - Comparação entre os cromatogramas LC-UV obtidos para amostras de esgoto sanitário (concentração final $5 \mu\text{g mL}^{-1}$), processadas por SPE e MEPS. Condições gerais: análise em gradiente (A - água 0,1% ácido fórmico; B - ACN), temperatura do forno a 40°C e vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$	54
Figura 21 - Comparação entre os cromatogramas LC-UV obtidos para os extratos não fortificados das amostras de esgoto doméstico extraídas por SPE e MEPS. Condições gerais: análise em gradiente (A - água 0,1% ácido fórmico; B - ACN), temperatura do forno a 40°C e vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$	54
Figura 22 - Cromatograma de íons totais das 48 transições de SRM monitoradas para as FQs obtido a partir da extração da matriz esgoto sintético isenta de FQs e fortificadas com ibuprofeno, cafeína, AAS e nicotina.	57
Figura 23 - Curvas analíticas para as FQs processadas por SPE. A reta de regressão linear ajustada foi obtida a partir da ponderação em função de $1/x$	58
Figura 24 - Gráfico de resíduos para o ajuste dos dados experimentais de cada Fluoroquinolonas, à reta de regressão linear – SPE.	59
Figura 25 - Efeito dos parâmetros avaliados na robustez sobre a recuperação dos fármacos no método SPE.	61
Figura 26 - Curvas analíticas para as FQs processadas por MEPS-LC-MS. A reta de regressão linear ajustada foi obtida a partir da ponderação em função de $1/x$	63
Figura 27 - Gráfico de resíduos obtidos por MEPS-LC-MS, para o ajuste dos dados experimentais de cada FQ, à reta de regressão linear.	64
Figura 28 - Efeito dos parâmetros avaliados na robustez para recuperação dos fármacos - MEPS.	67

Lista de tabelas

Tabela 1 - Parâmetros otimizados para análise dos antimicrobianos por LC-ESI-QTRAP ^{TM} /MS no modo de ionização ESI+, usando o modo de aquisição <i>Scheduled MRM^{TM}</i>	39
Tabela 2 - Fatores para a determinação da robustez do método SPE-LC-MS.	41
Tabela 3 - Fatores para a determinação da robustez do método MEPS-LC-MS.....	41
Tabela 4 - Matriz de Youden.	41
Tabela 5 - Avaliação das fases extratoras.....	44
Tabela 6 - Variáveis avaliadas nos planejamentos experimentais.....	50
Tabela 7 - Planejamento experimental 2 ³	50
Tabela 8 - Planejamento experimental 2 ²	51
Tabela 9 - Valores de concentração utilizados em cada curva.	55
Tabela 10 - Valores dos parâmetros de RE, PE e ME, nas análises feitas em LC-MS e LC-UV	55
Tabela 11 - Dados da curva analítica.....	58
Tabela 12 - Valores de precisão e exatidão obtidos para o método SPE desenvolvido.	60
Tabela 13 - Valores de recuperação, efeito matriz e eficiência total do método SPE validado.	60
Tabela 14 - Resultados expressos em porcentagem de recuperação das combinações ensaiadas na avaliação da robustez da SPE para cada fluoroquinolona.	61
Tabela 15 - Dados das curva analíticas obtidas pelo método de extração MEPS.	64
Tabela 16 - Valores de precisão e exatidão obtidas para o método desenvolvido por MEPS- LC-MS.....	65
Tabela 17 - Valores de recuperação, efeito matriz e eficiência total do método MEPS validado.	66
Tabela 18 - Resultados expressos em porcentagem de recuperação das combinações ensaiadas na avaliação da robustez – MEPS, para cada fluoroquinolona.....	66
Tabela 19 - Concentração dos antibióticos detectados nas amostras de esgoto doméstico e rio Monjolinho (proximidades do Shopping Iguatemi).	68
Tabela 20 - Comparação entre fatores de maior vantagem entre MEPS e SPE.	69

Lista de abreviaturas e siglas

AAS – ácido acetilsalicílico

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC – Association of Official Analytical Chemists

APCI – ionização química a pressão atmosférica (do inglês “atmospheric pressure chemical ionization”)

API – ionização a pressão atmosférica (do inglês “atmospheric pressure ionization”)

BIN – Barrel Insert and Needle assembly

CE – energia de colisão (do inglês “collision energy”)

CIP – ciprofloxacina

CIP-d8 –ciprofloxacina deuterada

CXP – potencial de saída da cela de colisão (do inglês “collision cell exit potential”)

DP – potencial de orifício (do inglês “declustering potential”)

DPR – Desvio padrão relativo

ENR – enrofloxacin

EP – potencial de entrada (do inglês “entrance potential”)

EPA – Environmental Protection Agency

ESI – ionização por electrospray (do inglês “electrospray ionisation”)

EURACHEM – Comitê Europeu para Análise Química (A Focus for Analytical Chemistry in Europe)

FQs – fluoroquinolonas

GC – cromatografia gasosa (do inglês “gas chromatography”)

HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês “high performance liquid chromatography”)

ICH – International Conference on Harmonisation

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

IS – padrão interno (do inglês “internal standard”)

ISO – International Organization for Standardization

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry

LC –cromatografia líquida (do inglês “liquid chromatography”)

LD – limite de detecção

LEV – levofloxacin

LPB – Laboratório de Processos Biológicos

LPME – microextração em fase líquida

LQ – limite de quantificação

ME – efeito de matriz (do inglês “matrix effect”)

MEPS – microextração por sorvente empacotado (do inglês “Microextraction by Packed Sorbent”)

MS – espectrometria de massas (do inglês “mass spectrometry”)

MS/MS – espectrometria de massas sequencial (do inglês “tandem mass spectrometry”)

nd – não detectado

NOR – norfloxacin

NOR-d5 – norfloxacin deuterada

PE – eficiência total do processo (do inglês “process efficiency”)

PEF – pefloxacin

QqLIT – quadrupolo-linear ion trap

QqQ – triplo quadrupolo

QqTOF – quadrupolo-tempo-de-voo

RAHLF – reator anaeróbio horizontal de leito fixo

RE – recuperação (do inglês “recovery”)

RIA – radioimunoensaio (do inglês “radio-immuno-assay”)

SAX – trocador forte de ânions (do inglês “strong anion exchange”)

SCX – trocador forte de cátions (do inglês “strong cation exchange”)

SPE – extração em fase sólida (do inglês “solid phase extraction”)

SPME – microextração em fase sólida (do inglês “solid phase microextraction”)

SRM – monitoramento de reações selecionadas (do inglês “selected reaction monitoring”)

SUMÁRIO

1. Introdução	16
1.1 Fluoroquinolonas	18
1.2 Sistemas de tratamento de águas residuais	20
1.3 Métodos analíticos para determinação ambiental das fluoroquinolonas	21
1.3.1 Preparo de amostra	21
1.3.1.1 Extração em fase sólida (SPE)	21
1.3.1.2 Microextração por sorvente empacotado (MEPS)	23
1.3.2 Técnicas de separação e detecção das fluoroquinolonas	26
1.3.2.1 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas	26
1.4 Validação do método de análise	29
1.4.1 Parâmetros de validação	30
1.4.1.1 Seletividade	30
1.4.1.2 Precisão	30
1.4.1.3 Exatidão	31
1.4.1.4 Linearidade ou faixa linear de trabalho	31
1.4.1.5 Métodos de padronização para construção da curva de calibração	32
1.4.1.6 Robustez	32
1.4.1.7 Recuperação	32
2. Objetivos	34
3. Parte experimental	35
3.1 Materiais e Reagentes	35
3.2 Preparo das soluções estoque e de trabalho	35
3.3 Coletas e amostragens	36
3.4 HPLC-UV e HPLC-MS/MS	37
3.5 Validação dos métodos desenvolvidos	39
4. Resultados e discussão	43
4.1 Otimização da separação cromatográfica das FQs	43
4.2 Desenvolvimento da extração em fase sólida	44
4.3 Desenvolvimento da extração por MEPS	49
4.5 Validação do método SPE-LC-MS/MS	56
4.5.1 Seletividade	56
4.5.2 Linearidade	57
4.5.3 Precisão e Exatidão	59
4.5.4 Recuperação e efeito matriz	60
4.5.5 Robustez	61

4.6 Validação do método MEPS	62
4.6.1 Seletividade	63
4.6.2 Linearidade, limite de quantificação e detecção	63
4.6.3 Exatidão e Precisão.....	65
4.6.4 Recuperação e efeito matriz	65
4.6.5 Robustez	66
4.7 Aplicação dos métodos desenvolvidos em amostras aquosas – investigação de antibióticos no meio ambiente	67
4.8 Avaliação comparativa das técnicas MEPS e SPE	68
5. Conclusão	70
5.1 Perspectivas futuras	70
Referências bibliográficas.....	72

1. Introdução

Nos últimos anos o interesse público e científico sobre vestígios de produtos farmacêuticos no ambiente vem crescendo continuamente. Um aspecto central é o risco potencial para os organismos aquáticos e do solo associado à presença de baixas concentrações desses compostos, na faixa de ng L^{-1} . Uma grande preocupação é a possibilidade do aparecimento e disseminação da resistência aos antimicrobianos. (1) A ocorrência ambiental desses fármacos trata-se de um problema ecotoxicológico; a exposição prolongada de bactérias diversas às baixas concentrações de antimicrobianos encontradas no ambiente pode levar à seleção de microrganismos resistentes e, eventualmente, à transferência de seus genes de resistência para outras bactérias. (2)

Os antimicrobianos, dentre os diferentes grupos de fármacos, são de interesse especial, pois são administrados em grandes quantidades para os seres humanos e animais no tratamento de infecções, bem como utilizados em aditivos alimentares para promover o crescimento animal. (3;4) A excreção humana e animal dos antimicrobianos na forma inalterada é uma das vias de contaminação ambiental. Todavia, o descarte de formulações não utilizadas, o esgoto gerado pelas indústrias farmacêuticas, e o uso hospitalar também têm importâncias no processo de entrada desses contaminantes ao meio ambiente. (5; 6) Possíveis rotas da entrada de fármacos no ambiente foram descritas por Bila et. al, Figura 1, com seu consequente retorno ao homem por meio da água de abastecimento. Por esta figura, verifica-se que a caminho final é essencialmente pelo meio aquático. (7)

Diante deste fato, diversos levantamentos científicos reportam a presença de diferentes classes de antimicrobianos em águas residuais tratadas e não tratadas (de várias fontes), em leitos de água, e em águas de abastecimento. (5,8-15)

Figura 1 - Possíveis rotas para contaminação ambiental por fármacos.

Fonte: BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 523-30, 2003.

No Brasil, um estudo recente demonstrou a presença de todos os 8 antimicrobianos estudados, na bacia do rio Atibaia, região de Campinas. A maior parte dos achados teve concentrações na ordem de ng L^{-1} ou menos. No entanto a região com maior atividade antropogênica chegou a apresentar contaminações de 1,3 e $2,4 \mu\text{g L}^{-1}$ para dois dos antimicrobianos. (9)

Um levantamento baseado no sistema de busca bibliográfica Scopus demonstra o crescente interesse da comunidade científica no assunto (Figura 2A). Um aumento significativo é observado a partir da década de 2000, o qual é acompanhado por publicações nacionais na proporção de 1,8 a 3,4% desse total a partir de 2007. Tal levantamento representa o grau de comprometimento da comunidade científica em estudar o assunto e está relacionado à emergência com a qual o tema tem sido tratado.

Figura 2 - (a) Levantamento realizado no mês de dezembro de 2012 utilizando as palavras “antibiotics” e “wastewaters” encontradas nos títulos, resumos ou palavras-chave das publicações indexadas. (b) Comparação com os estudos que adicionalmente apresentavam a(s) palavra(s) degradação e/ou remoção nos mesmos campos de busca.

Não obstante à constatação da contaminação, fazem-se também necessárias estratégias para evitar-se o processo contínuo de contaminação já observado. O levantamento mostrado na Figura 2B apresenta o surgimento dessa preocupação com a remoção ou degradação dos antimicrobianos em águas residuais, com um grande avanço em publicações a partir de 2009.

1.1 Fluoroquinolonas

As quinolonas surgiram, acidentalmente, como produto secundário da síntese de um agente antimalárico, de atividade antibacteriana conhecida e comprovada, a cloroquina. A substância foi descoberta no ano de 1962 por George Leshner e colaboradores em uma destilação, durante a síntese de cloroquina. Esse produto secundário revelou possuir também atividade antimicrobiana, surgindo assim a primeira quinolona: o ácido nalidíxico. Quimicamente, as fluoroquinolonas (FQs) diferem das anteriores por possuírem a combinação de um átomo de flúor e um grupo piperazina. (16)

As FQs são um grupo de substâncias químicas sintéticas com atividade antimicrobiana, apresentando extensiva aplicação tanto na medicina humana como na veterinária. Elas são consideradas importantes armas no combate a bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. As últimas gerações desses agentes quimioterápicos chegam a ser ativas contra as bactérias anaeróbias. Atualmente é uma das maiores classes de agentes antimicrobianos sendo utilizada, mundialmente, no tratamento de infecções de origem

bacteriana. As suas indicações terapêuticas evoluíram da aplicação em infecções urinárias a aplicações nas mais variadas infecções. Enrofloxacin (uso exclusivo em medicina veterinária), norfloxacin, ciprofloxacin, ofloxacin, lomefloxacin e pefloxacin são os principais representantes desse classe de fármacos. (16)

As fluoroquinolonas estudadas nesse trabalho estão entre as principais representantes deste grupo acima e apresentam aplicações diversas: enrofloxacin, uso exclusivo em medicina veterinária; norfloxacin, principal aplicação em infecções urinárias e em tratamentos oftalmológicos; ciprofloxacin, aplicação contra infecções dos rins e/ou do trato urinário, infecções dos órgãos genitais, infecções da pele e infecções ósseas e articulares; levofloxacin, principal aplicação no tratamento de infecções do trato respiratório superior e inferior; e pefloxacin, aplicação abundante no tratamento de infecção respiratória e infecção nos rins. Na Figura 3 estão apresentadas as estruturas químicas dos antimicrobianos estudados.

Figura 3 - Estrutura das FQs estudadas nesse trabalho.

O conhecimento das propriedades físico-químicas das FQs é fundamental para o desenvolvimento dos métodos de análise. A presença de um grupo ácido (grupo carboxílico) e de um grupo básico (amina terciária) atribui ao composto propriedades anfotéricas. Assim, em função do pH do meio, pode existir mais do que uma espécie presente em solução, devido à protonação/desprotonação desses grupos. (16)

Outra característica relevante das FQs é sua alta solubilidade em água, devido aos grupos polares ligados ao núcleo lipofílico. A estrutura química das FQs determina ainda uma possível interação com a matéria orgânica natural, bem como certa adsorção no solo por causa de interações hidrofóbicas, eletrostáticas ou ambas. (3)

FQs são contaminantes altamente persistentes no meio ambiente por conta da grande estabilidade química do anel heterocíclico, a qual atribui às moléculas resistência contra hidrólise e calor. Em contraste com a estabilidade térmica, as FQs podem ser susceptíveis a fotodegradação. Em água, a irradiação luminosa pode levar à perda de fluoreto, à degradação oxidativa da cadeia amino lateral, ou a ambas. (3)

As FQs de uso humano e veterinário, após introdução por via oral ou parenteral, são excretadas, geralmente, na forma ativa por via renal (80%) e pelas fezes (20%), sendo, ambas, formas de contaminação ambiental. Diante do grande interesse dado ao destino ambiental desses compostos, uma série de métodos analíticos está atualmente disponível para determinação das FQs em águas residuais. (3; 17) No entanto, há uma carência de estudos de remoção, por meio de biorreatores para tratamento de efluentes, com essa classe de quimioterápicos.

1.2 Sistemas de tratamento de águas residuais

Alguns artigos e revisões têm mostrado a ineficácia dos tratamentos convencionais em remover os antimicrobianos e outros fármacos das águas residuais. (2; 10; 11) Por exemplo, Calisto e Esteves divulgaram diversos métodos de tratamento que apresentaram eficiência inferior a 10% na remoção de alguns psicofármacos. (11)

Batt *et al.* demonstraram a ineficiência na remoção de antimicrobianos típicos de diversas classes em estações de tratamento dos EUA e mencionaram a necessidade de estudos posteriores para identificar a melhor forma de tratamento para cada substância. (2) Le-Minh *et al.*, além de reportarem a ineficiência dos métodos convencionais de tratamento, fazem extensas considerações acerca dos estudos atuais e necessidades futuras. Em síntese, eles reportam a falta de controle sobre as variáveis envolvidas em alguns estudos de degradação, as quais estão diretamente relacionadas, por exemplo, com atividades enzimáticas reguladoras

do processo; mencionam a possibilidade da formação de produtos de degradação ou metabólitos com atividade, mesmo nos casos de altas eficiências de remoção da substância na forma inalterada; e declararam a escassez de informações relativas aos processos mais elaborados de tratamento de resíduos. (10)

O comportamento das FQs frente ao tratamento em fluxo em reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF) é um dos estudos que será abordado em perspectiva futura ao presente trabalho, aplicando os métodos de análise na avaliação desses reatores.

1.3 Métodos analíticos para determinação ambiental das fluoroquinolonas

1.3.1 Preparo de amostra

São diversos os motivos que impedem uma análise cromatográfica direta de amostras ambientais. A maior parte das amostras ambientais é complexa e exige uma série de etapas de preparo, limpeza e pré-concentração; de maneira que, nos últimos anos, extensos esforços têm sido feitos para o desenvolvimento de novas técnicas de preparo de amostra que reduzam o tempo, trabalho, consumo de solvente e que permitam melhor desempenho analítico do processo. (15; 18)

O objetivo do preparo de amostra consiste no isolamento dos compostos de interesse, procurando reduzir ou eliminar os interferentes da matriz, preferencialmente concentrando os analitos para facilitar suas determinações em baixas concentrações.

Deseja-se que um método de preparo de amostra a ser aplicado na análise de fármacos em matrizes aquosas complexas apresente as seguintes características: englobe, em um único procedimento, uma ampla variedade de fármacos com propriedades distintas; atinja recuperações próximas a 100%; remova os compostos interferentes da amostra; proporcione robustez, boa precisão e baixo custo; e utilize volumes reduzidos de solvente.

A seguir, encontra-se uma descrição teórica, das técnicas de preparo de amostra desenvolvidas e empregadas nesse trabalho.

1.3.1.1 Extração em fase sólida (SPE)

Ao longo dos últimos vinte anos, a SPE (do inglês “Solid Phase Extraction”) tornou-se uma técnica poderosa para o preparo rápido da amostra antes da análise cromatográfica. Muitos dos problemas encontrados nas extrações líquido-líquido, como a utilização de grandes volumes de solvente e a formação de emulsão, puderam ser resolvidos pela extração em fase sólida.

O processo convencional da SPE envolve a passagem da amostra líquida através de um sólido particulado que preenche um cartucho, de forma que os analitos alvos sejam separados da matriz da amostra. As interações do analito com a fase sólida (sorvente) devem ser maiores do que as interações do analito com a matriz da amostra, para, assim, ocorrer a retenção do analito na fase sorvente e a sua posterior recuperação. A técnica baseia-se nos mesmos princípios das separações cromatográficas (partição, adsorção, troca iônica, exclusão por tamanho). (19)

A seleção da fase extratora em SPE segue, na maioria das vezes, as mesmas regras utilizadas para a escolha da fase estacionária em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O primeiro critério a levar-se em conta é o conjunto de informações a respeito dos analitos de interesse e da matriz onde eles encontram-se. Tais informações auxiliam na definição do modo de separação: adsorção, partição, troca iônica, exclusão por tamanho. A natureza da matriz e o conhecimento das impurezas também auxiliam na escolha da fase.

As etapas da SPE consistem no condicionamento do cartucho, na aplicação da amostra, na remoção de interferentes pela lavagem do sorvente, e na eluição dos analitos.

A etapa de condicionamento destina-se a ativar o material existente dentro do dispositivo de extração; o solvente a ser empregado dependerá principalmente do material a ser ativado. Um dos fatores importantes nessa etapa resume-se a não deixar que o material contido no cartucho seque, para que não sejam formados caminhos preferenciais e não ocorra o descondicionamento da fase extratora. (20)

A percolação da amostra através dos cartuchos contendo o adsorvente, já condicionados, deve ser lenta, com vazão geralmente inferior a 2 mL min^{-1} , e costuma ser obtida por meio de vácuo ou pressão. A fim de permitir resultados reprodutíveis, a transferência da amostra para o cartucho deve ser quantitativa. Idealmente, nessa etapa de passagem da amostra, o analito de interesse fica retido na fase sólida e a maioria dos interferentes passa pelo cartucho. (20)

A lavagem da fase extratora é feita por um solvente apropriado, retirando os interferentes da matriz ou parte deles, com o cuidado de não eliminar os analitos de interesse. Um solvente apropriado para a etapa de lavagem é o próprio solvente da amostra, caso ele não remova também o analito de interesse. Usualmente, a solução contém menos solvente orgânico, menor concentração salina e encontra-se em um pH ideal para remover apenas os interferentes. (20)

A última etapa é a eluição dos analitos, onde é utilizado um solvente capaz de remover os analitos da fase extratora. A fase móvel de eluição é geralmente obtida

aumentando-se o percentual de solvente orgânico, alterando-se o pH, aumentando-se a força iônica do solvente, ou associando-se mais do que um desses fatores. A escolha cuidadosa do força do eluente é importante nesse ponto, pois ele deve eluir os analitos de interesse, mas não permitir a eventual eluição de interferentes que não tenham sido eliminados na etapa anterior de limpeza. Na prática, observa-se que, de forma análoga à extração líquido-líquido, o uso de duas alíquotas do eluente em vez de uma única em volume maior – assim como um tempo de permanência de cada alíquota no cartucho entre meio e um minuto – aumentam a eficiência de extração. (20) A Figura 4 apresenta um esquema do processo de extração em fase sólida.

Figura 4 - Esquema das etapas geralmente empregadas na extração em fase sólida.

1.3.1.2 Microextração por sorvente empacotado (MEPS)

No preparo da amostra, diversos preceitos da Química Verde estão sendo aplicados, de forma que inúmeras modalidades podem ser agrupadas sob os conceitos, em sentido amplo, de microextração em fase sólida (SPME) e de microextração em fase líquida (LPME). Nas revisões de Rodrigues, Tobiszewski, e seus respectivos colaboradores, nota-se um foco direcionado ao uso dessas técnicas dentro de um contexto de aplicações ambientais. (12; 21)

A SPME, em seu sentido amplo, oferece algumas vantagens em relação à SPE, entre as quais facilidade de manipulação e menor volume de amostras. Essa microextração consolida-se como uma opção com excelentes resultados nas aplicações cromatográficas, para a determinação de diversas classes de analitos. Na forma mais popularizada de SPME (em fibra), os analitos são sorvidos em um filme micrométrico de um polímero que atua de modo altamente seletivo, sendo dessorvidos, diretamente, no injetor do sistema cromatográfico.

Recentemente, dentro desse contexto amplo de técnicas de SPME, foi introduzida a técnica denominada MEPS, do inglês "Microextraction by Packed Sorbent". Basicamente ela

consiste em uma forma miniaturizada de SPE, onde o cartucho convencional é substituído por uma espécie de coluna miniaturizada que é adaptada entre a agulha e o corpo de uma seringa de injeção para HPLC ou cromatografia gasosa (GC).

Conforme ilustrado na Figura 5, em MEPS tem-se basicamente uma microsseringa (100 – 500 μL) e uma pequena quantidade de fase estacionária encontra-se acondicionada no compartimento designado por BIN (do inglês “Barrel Insert and Needle assembly”).

Figura 5 - Esquema de uma microsseringa de MEPS, com detalhe para o BIN. Adaptado de Abdel-Rehim. (22)

Fonte: ABDEL-REHIM, M. Recent advances in microextraction by packed sorbent for bioanalysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2569-80, 2010.

A MEPS possui algumas vantagens relativas à SPE clássica em cartuchos:

- Redução do tempo de preparo de amostra e de injeção.
- Redução do volume de solventes necessários.
- Utilização de volume reduzido de amostras (na ordem dos μL comparativamente aos mL necessários para a SPE).
- Possível automação do acoplamento com a HPLC ou GC, onde os passos de extração e injeção podem ser realizados automaticamente com a mesma seringa.

As fases estacionárias utilizadas em MEPS são potencialmente as mesmas disponíveis para SPE. Algumas fases são comercialmente disponíveis pela SGE Analytical Science, tais como as fases reversas C18, C8 e C2; a fase normal sílica; e fase mista composta por fase trocadora forte de cátions (SCX) associada à fase C8.

A extração por MEPS utiliza as mesmas etapas da SPE (condicionamento, aplicação da amostra, lavagem e eluição). A diferença dá-se, principalmente, no modo de execução da técnica, uma vez que os solventes e a amostra (50-1000 μL) são aspirados pela seringa em vários ciclos, através da fase extratora, por um amostrador automático ou em procedimento manual. (Figura 6) Quando a amostra passa pelo suporte sólido, os analitos, idealmente, ficam sorvidos à fase extratora e depois são eluídos pelo solvente final da extração. (22) Outra característica da técnica é que, geralmente, os cartuchos são reutilizados para um determinado número de amostras.

Figura 6 - Etapas ilustrativas da MEPS.

Nesse trabalho a técnica de MEPS foi desenvolvida e aplicada utilizando-se um dispositivo projetado no laboratório e confeccionado pela oficina mecânica do IQSC. Tal protótipo foi elaborado procurando superar algumas limitações do análogo comercial desenvolvido pela SGE Analytical Science (fácil entupimento, impossibilidade de regeneração ou troca dos *frits* e limitado número de fases extratoras disponíveis). Uma das vantagens do dispositivo utilizado é a possibilidade de livre escolha do sorvente para garantir uma melhor eficiência do método, especialmente no caso das FQs, em que nenhuma das fases extratoras comerciais da SGE são eficientes na recuperação desses compostos.

1.3.2 Técnicas de separação e detecção das fluoroquinolonas

Além das etapas de extração e pré-concentração, a separação é igualmente essencial durante o processo analítico, em que é relevante a sensibilidade oferecida pelo sistema de detecção. A capacidade de separação é ainda mais importante quando um grande número de analitos deve ser simultaneamente determinado, e em uma matriz complexa.

Os métodos analíticos utilizados na determinação de contaminantes emergentes em amostras ambientais são normalmente baseados em espectrometria de massa (MS), acoplada à cromatografia líquida (LC) ou à cromatografia gasosa (GC). Embora a GC tenha um elevado poder de resolução, os antimicrobianos costumam ser compostos polares, insuficientemente voláteis, termicamente instáveis, ou ambos, dificultando sua determinação direta utilizando essa técnica. Como consequência, a LC tornou-se a técnica de escolha, uma vez que ela permite a determinação de antimicrobianos, inclusive as FQs, com notável simplificação de manipulação da amostra. Diferentes técnicas de detecção tais como fluorescência por excitação ultravioleta ou radioimunoensaio (RIA) têm sido utilizadas, no entanto o uso da HPLC acoplada à MS (HPLC-MS) e, sobretudo, à MS sequencial (HPLC-MS/MS) teve notáveis progressos nesse campo.

A separação de compostos básicos em colunas de fase reversa a base de sílica é bastante difícil, pelo resultado da forte interação do analito com os grupos silanóis da fase estacionária, o que provoca o aparecimento de picos com cauda. Assim, dadas as limitações quanto ao uso de solventes com elevados valores de pH nas fases a base de sílica, a eluição em pH baixo tem geralmente sido escolhida para separar as FQs, onde elas estão na forma catiônica e para a separação destes antimicrobianos são utilizadas colunas adequadamente capeadas e com pureza de sílica compatível. Modificadores da fase móvel como o ácido fórmico, ácido acético e o ácido trifluoroacético são os mais utilizados nos métodos de separação cromatográfica das FQs. Speltini *et. al*, em sua revisão, descrevem diferentes métodos utilizados em LC para a determinação das fluoroquinolonas. As colunas mais utilizadas para a separação desses antimicrobianos são de fase reversa C18 ou alguma modificação dessa fase (Zorbax XDB-C18, Synergi^{TM} Hydro-RP C18 e Kromasil ODS C18). (3)

1.3.2.1 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

A cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por absorção no UV-visível é ainda empregada nas análises de fármacos em matrizes aquosas.(23; 24; 25) No entanto, o acoplamento a um espectrômetro de massas combina as vantagens da HPLC (alta seletividade

e eficiência de separação) com as vantagens da espectrometria de massas (informação sobre a massa molecular do analito, aumento da seletividade, melhor detectabilidade, e, eventualmente, fornecimento da fórmula molecular), tornando-se uma poderosa ferramenta nas análises de misturas complexas, para determinação de compostos ao nível de traços. (26)

Em LC-MS as interfaces de acoplamento mais utilizadas entre ambas as técnicas permitem que esse processo ocorra a pressão atmosférica. Daí surgem as técnicas de ionização a pressão atmosférica (API) denominadas ionização por electrospray (ESI) e ionização química a pressão atmosférica (APCI). Essas são consideradas técnicas brandas de ionização, as quais fornecem, intrinsecamente, poucos íons para ajudar na confirmação da identidade dos analitos investigados, permitindo, por outro lado, a determinação dos analitos de interesse em baixos níveis de concentração, por meio da alta corrente iônica dos poucos íons gerados. (27)

A técnica ESI é preferencialmente aplicada para análise de moléculas iônicas grandes ou mesmo íons pequenos com carga unitária, podendo ser usada no modo positivo ou negativo. Ela preferencialmente gera os íons dos analitos em solução, antes que eles sejam transferidos para a fase gasosa, e, conseqüentemente, impulsionados para o interior do espectrômetro de massas. De uma forma geral a ionização por electrospray pode ser dividida em três etapas: nebulização da solução da amostra em gotículas eletricamente carregadas, liberação dos íons dessas gotículas e transporte dos íons para o interior do espectrômetro de massas, através de uma série de estágios de vácuo e elementos iônicos que os focalizam no caminho.

Solutos de massa molar, polaridade e volatilidade moderada e não termolábeis podem ser determinados com grande sensibilidade pelo uso da ionização química a pressão atmosférica. Na interface APCI a fase móvel proveniente do sistema LC é nebulizada com gás nitrogênio no interior de um tubo altamente aquecido, evaporando rapidamente. A ionização das moléculas da amostra se dá na câmara de ionização pela interação com um excesso de íons reagentes formados a partir de uma descarga corona aplicada na saída do referido tubo aquecido. Os íons reagentes são, em geral, positivamente carregados, e são gerados da mistura de gases formada na nebulização e evaporação da fase móvel.

O uso do artifício do monitoramento de reações selecionadas (SRM) na análise dos íons garante adicional detectabilidade e seletividade às análises feitas por LC-MS/MS. No entanto, embora a técnica de SRM ofereça a vantagem do monitoramento altamente seletivo dos fragmentos de um íon precursor, o processo de formação desse íon, tanto em APCI quanto em ESI, pode sofrer interferências resultantes da matriz em que se encontra. Quando

interferentes da amostra coeluem com o composto de interesse alterando a eficiência de ionização, ocorre o que se define de efeito matriz (ME). Essa alteração na eficiência de ionização pode ocorrer de forma negativa (supressão do sinal) ou de forma positiva (aumento do sinal analítico). (28)

Alguns estudos têm mostrado que a APCI-MS é geralmente menos susceptível a efeitos de matriz que ESI-MS, porque a ionização tende a ocorrer de uma maneira menos competitiva, onde os analitos são totalmente transferidos à fase gasosa, antes da ionização. Ao contrário, na ESI há maior competição entre os íons dos analitos a migrar para a fase gasosa, em um processo regido por equilíbrio químico. No entanto, a ocorrência de efeito de matriz também tem sido demonstrada em APCI. Em muitos casos o perfil de supressão de íons para os analitos estudados pode ser diferente quando se utiliza ESI ou APCI e isto deve ser levado em conta ao selecionar o método de ionização mais adequado. (29 e 30)

Após a ionização a corrente de íons gerada é direcionada para o analisador de massas. Os analisadores separam os íons de acordo com a relação existente entre suas massas e cargas. As características de operação e construção, diferem de um analisador para o outro, assim como seus benefícios e limitações. A escolha do analisador mais apropriado deve ser efetuada considerando a aplicação e o tipo de desempenho desejados.

Quanto à espectrometria de massa, as tendências atuais para análise de fármacos em amostras ambientais estão focadas para o uso de espectrômetros de massa híbridos, como quadrupolo-tempo de voo (QqTOF) e quadrupolo-*linear ion trap* (QqLIT). Enquanto instrumentos do tipo QqTOF são mais adequados para fins de confirmação ou identificação de compostos desconhecidos e metabólitos, devido a sua alta capacidade de medição de massa exata, os analisadores do tipo QqLIT são mais adequados quando se pretende obter resultados confiáveis em termos de quantificação e confirmação dos analitos estudados em baixíssimos níveis de detecção. A principal vantagem do QqLIT é sua versatilidade, pois ele pode ser operado no modo SRM (tal qual um analisador do tipo triplo quadrupolo - QqQ) e como um aprisionador de íons (*ion trap*), gerando espectros de fragmentação dos íons precursores com alta sensibilidade; dentre inúmeras possibilidades. (31; 32; 33)

Grande parte dos trabalhos encontrados na literatura relataram limites de quantificação (LQ) inferiores a 10 ng mL^{-1} , quando utilizando analisadores do tipo triplo-quadrupolo e LQ ainda inferiores para analisadores do tipo QqLIT. Senta *et. al.* (2008) conseguiram $\text{LQ} < 2 \text{ ng mL}^{-1}$, utilizando um analisador do tipo QqQ para análise de fluoroquinolas em amostras de esgoto doméstico; Barceló *et. al* (2013) utilizando QqLIT obtiveram LQ entre 7,45 a $183,69 \text{ ng L}^{-1}$ para análise de fluoroquinolonas em efluentes de esgoto doméstico; e

Cantatero *et. al* (2013) obtiveram limites de quantificação entre 70 a 150 ng L⁻¹ com um analisador do tipo triplo quadrupolo, para amostras de águas superficiais contendo diferentes classes de antimicrobianos. (33; 34; 35)

Speltini *et. al*, em sua revisão, ressaltam que, para a análise de efluentes/esgoto, o método de separação utilizando HPLC acoplado a espectrometria de massas foi provado, por diferentes estudos, ser o mais adequado, uma vez que forneceu elevada detectabilidade (limites de quantificação baixos) e seletividade nas análises das FQs. Além disso, eles reportam que, utilizando adequado preparo de amostra e eficiente separação cromatográfica, baixos limites de quantificação podem ser obtidos utilizando outras formas de detecção.

1.4 Validação do método de análise

Para assegurar que um novo método analítico seja capaz de gerar informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve ser submetido a uma série de estudos experimentais denominados validação. A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência. (36)

A validação é o processo realizado para demonstrar que o método é aceitável para o propósito pretendido. Devem-se levar em consideração as incertezas envolvidas no processo analítico, incluindo aquelas relacionadas aos equipamentos, padrões, calibrações, analistas e ambiente. O processo de validação exige do analista planejamento e conhecimento para obter os resultados e verificar sua validade perante as exigências das análises. Assim, a validação deve ser bem definida e fundamentada para atender às exigências das agências regulamentadoras. Nacionalmente, destacam-se o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Internacionalmente, existem órgãos como a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), Organização Internacional para Padronização (ISO), *Environmental Protection Agency* (EPA), Comitê Europeu para Análise Química (EURACHEM) e *International Conference on Harmonisation* (ICH).

É válido ressaltar que os guias fazem recomendações vagas, às vezes, tornando flexível, em alguns casos, a forma como será realizado o procedimento de validação. Nessas situações o analista procede de acordo com suas possibilidades experimentais e de interesse, logicamente, sem deixar de se pautar pelos princípios gerais contidos nas recomendações existentes.; Ocorre também que para certas aplicações não se tem uma legislação, norma ou

recomendação vigente, indicando o protocolo de validação a ser seguido para aquele método, apara determinada matriz, ou analitos. (17; 37; 39)

1.4.1 Parâmetros de validação

Diferentes trabalhos na literatura e agências regulamentadoras descrevem os parâmetros que devem ser avaliados na validação de um método analítico, havendo uma concordância quanto à avaliação de: seletividade, curva de calibração (linearidade), precisão, exatidão, limite de quantificação e detecção, robustez, estabilidade e recuperação.

1.4.1.1 Seletividade

A seletividade de um método está relacionada à sua capacidade de superar a presença de outras espécies interferentes na amostra, como substâncias endógenas, produtos de degradação e impurezas, bem como outros compostos de propriedades similares que podem estar presentes no meio. Um método analítico é considerado seletivo quando este é capaz de produzir respostas para vários analitos, distinguindo-as perfeitamente entre si. (36)

Na cromatografia líquida a seletividade pode ser alcançada através da otimização das etapas de extração, separação e detecção dos analitos. A seletividade na etapa da análise cromatográfica pode variar de acordo com o tipo de fase estacionária, composição da fase móvel e sistema de detecção utilizado. Em relação à etapa de extração, a seletividade do método é regida pelo tipo de técnica de extração selecionada e por variáveis envolvidas como tipo de solventes, fase extratora e tempo de extração.

1.4.1.2 Precisão

A precisão é a avaliação da dispersão de resultados obtidos em ensaios independentes, repetidos para uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. A precisão deve ser avaliada de três maneiras: através da repetibilidade (i.e. precisão intra-dia); precisão intermediária (e.g. precisão inter-dias) e reprodutibilidade (e.g. precisão inter-laboratorial).

A repetibilidade (precisão intra-dia) define a precisão do método em repetir, em um pequeno intervalo de tempo, os resultados obtidos nas mesmas condições de análise, ou seja, com o mesmo analista, com o mesmo equipamento, no mesmo laboratório e fazendo uso dos mesmos reagentes.

A precisão intermediária, avaliada como precisão inter-dias, é a habilidade do método em fornecer os mesmos resultados quando as análises são conduzidas no mesmo laboratório, mas em dias diferentes, por analistas diferentes ou equipamentos diferentes. Para a determinação da precisão intermediária, recomenda-se um mínimo de dois dias diferentes com analistas diferentes.

A reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial) é utilizada para demonstrar a precisão entre laboratórios. Os resultados são obtidos usando o mesmo método e mesmas amostras em laboratórios diferentes, analistas e equipamentos diferentes. No entanto, é possível avaliar a reprodutibilidade parcialmente, onde somente alguns dos fatores citados são modificados. Neste caso, as variáveis avaliadas devem ser registradas. (39)

1.4.1.3 Exatidão

A exatidão define a proximidade entre o valor medido e o valor real aceito para uma determinada amostra, sendo determinado pela medida em replicata de uma amostra em concentração conhecida. O termo exatidão é melhor expresso com o desvio em porcentagem (*bias*) do valor de referência. O ideal na avaliação da exatidão seria a utilização de materiais certificados, no entanto, quando isso não é possível, faz-se a fortificação de uma matriz branca com quantidade conhecida do analito, aguardando o seu “envelhecimento” para que ocorra a mais natural possível interação entre o analito e a matriz.

1.4.1.4 Linearidade ou faixa linear de trabalho

A linearidade é a capacidade de um método analítico em demonstrar que o sinal obtido é diretamente proporcional à massa de analito adicionado. Recomenda-se que a linearidade deva ser avaliada usando no mínimo 5 a 6 concentrações diferentes. Esse parâmetro é avaliado pela construção de um gráfico de resposta (y) vs. concentração do analito (x), usando o método dos mínimos quadrados para obter uma função $y = ax + b$. Em que a é o coeficiente angular ou inclinação da reta e b é o coeficiente linear ou intercepto.

A faixa linear deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser usado. A concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se encontrar no centro da faixa linear. A maior parte dos guias de regulamentação recomenda que os pontos das curvas sejam preparados em matriz, com o objetivo de contabilizar os erros de preparo das amostras, dos padrões e de injeção das soluções padrão e das amostras. (38)

1.4.1.5 Métodos de padronização para construção da curva de calibração

Três diferentes tipos de padronização para a construção da curva de calibração podem ser escolhidos. Esta escolha é feita de acordo com o tipo de análise e do tratamento utilizado para a amostra.

A padronização por adição de padrão é o método utilizado nas seguintes situações: quando há fortes interações entre o analito e a matriz, quando é difícil de encontrar um padrão interno adequado e quando não é possível obter a matriz isenta do analito. Este método consiste na adição de diferentes concentrações do analito à matriz, sendo a adição feita antes do processo de tratamento da amostra. (39)

A padronização externa é utilizada para amostras que não precisam de extenso pré-tratamento; os padrões de calibração são obtidos pela adição de concentrações conhecidas do analito na matriz.

A padronização interna refere-se à preparação dos padrões de calibração contendo diferentes concentrações do analito, nos quais se adiciona uma concentração fixa do padrão interno (PI). Esse método permite avaliar a variação da resposta em função da manipulação da amostra (por exemplo, concentração, extração e preparo da amostra). Na aplicação do método, as amostras desconhecidas são analisadas após a adição da mesma quantidade do padrão interno.

1.4.1.6 Robustez

A robustez de um método analítico mede a sensibilidade apresentada frente a pequenas variações das condições experimentais estabelecidas. Assim, um método é considerado robusto quando ele se apresenta praticamente insensível a essas pequenas variações que possam ocorrer quando o protocolo de análise está sendo executado.

Esse parâmetro pode ser avaliado em um experimento chamado teste de *Youden*, em que os fatores que podem afetar o método são avaliados simultaneamente através de um planejamento fatorial. Nesse teste, além da robustez em geral, também é avaliada individualmente a influência de cada um dos fatores nos resultados finais. (38)

1.4.1.7 Recuperação

A recuperação é um dos parâmetros mais destacados na validação de métodos. Esse parâmetro avalia a eficiência do método de tratamento das amostras em retirar o analito do seio da matriz, transferindo-o ao extrato final. Quando possível, a recuperação é calculada

comparando-se a resposta obtida para o analito adicionado na matriz e extraído com a resposta obtida do extrato da amostra fortificado com o analito após a extração. Um parâmetro semelhante é a eficiência total do processo, em que a resposta do analito extraído da amostra é comparada à resposta do analito preparado em solvente apropriado. (28; 39)

Para a avaliação da recuperação, geralmente recomendam-se concentrações em três níveis: baixo, médio e alto, de acordo com a curva de calibração.

1.5 Planejamento experimental

Na otimização de um método analítico é basicamente necessário ajustar vários fatores para determinar as condições melhores de análise. Se um método de otimização univariada for utilizado, esse processo pode exigir tempo, reagentes e muito trabalho. Outra desvantagem da otimização univariada é a negligência em avaliar as interações entre os diferentes fatores que podem afetar os resultados. Nas últimas décadas, a aplicação de técnicas de análise multivariada para otimização dos métodos em química analítica tem aumentado substancialmente, devido, especialmente, às suas vantagens de eficiência e economia. Além disso, esse planejamento permite a otimização simultânea de múltiplos fatores. (40)

Os sistemas de planejamento fatorial permitem avaliar simultaneamente o efeito de um grande número de variáveis, a partir de um número reduzido de ensaios experimentais. (42) Nesse tipo de planejamento são investigadas as influências de todas as variáveis experimentais de interesse e os efeitos de interação na resposta ou respostas. Se a combinação de k fatores é investigada em dois níveis, um planejamento fatorial consistirá de 2^k experimentos. Normalmente, os níveis dos fatores quantitativos são nomeados pelos sinais – (menos) para o nível mais baixo e + (mais) para o nível mais alto. Um nível (zero) pode ser também incluído no centro, no qual todas as variáveis estão no seu valor médio. Esses centros experimentais incluídos em planejamentos fatoriais possibilitam a identificação de relações não lineares no intervalo estudado e a estimativa do erro experimental, sem a necessidade de replicatas em todos os pontos do planejamento.

O planejamento fatorial completo geralmente é aplicado em estudos preliminares e necessita de 2^k ensaios para sua execução, portanto, a cada fator adicionado ao estudo o número de ensaios que devem ser realizados é aumentado. Devem-se realizar experimentos em todas as combinações possíveis dos níveis dos fatores. Os planejamentos fatoriais fracionários são usados com o objetivo de que com um número menor de experimentos possam-se obter informações sobre os efeitos mais importantes do sistema. (42; 43)

2. Objetivos

O objetivo principal desse estudo foi o desenvolvimento, otimização e validação de método para análise de águas residuais contendo fluoroquinolonas utilizando as técnicas de SPE-HPLC e MEPS-HPLC, bem como avaliação comparativa de dois métodos desenvolvidos e suas aplicações na determinação desses antimicrobianos, potencialmente presentes em amostras aquosas.

Como perspectiva futura os métodos foram desenvolvidos para aplicação na avaliação da remoção dessa classe de antimicrobianos de esgoto doméstico tratadas em reator anaeróbio horizontal de leito fixo.

3. Parte experimental

3.1 Materiais e Reagentes

Padrões analíticos de norfloxacin (NOR) (99%), levofloxacin (LEV) (98%), mesilato de pefloxacin dihidratado (PEF) (71,45%), cloridrato de ciprofloxacina (CIP) (98%), enrofloxacin (ENR) (99%), ofloxacin (OFL) (99%), norfloxacin-d5 (NOR-d5) (99%) e cloridrato de ciprofloxacina-d8 (CIP-d8) (99%) foram adquiridos de Sigma–Aldrich. A água utilizada foi purificada pela estação Milli-Q da Millipore. Os solventes orgânicos metanol (MeOH) e acetonitrila (ACN) (grau HPLC) e o ácido fórmico (96%) foram adquiridos de Tedia.

Os cartuchos extratores Strata XL, Strata X e Strata XA foram adquiridos de Phenomenex; os cartuchos Chromabond HR-X, Chromabond HR-XA e Chromabond HR-XWA foram comprados de Macherey-Nagel; os cartuchos Select HLB foram adquiridos de Supelco; os Oasis HLB de Waters; e a fase extratora C18 foi de Alltech. Os frits de SPE e os tubos de SPE vazios de 3 e 6 mL, para confecção de novos cartuchos, com 100 mg de fase extratora, foram adquiridos de Supelco.

3.2 Preparo das soluções estoque e de trabalho

As soluções estoque das fluoroquinolonas (norfloxacin, levofloxacin, ofloxacin, pefloxacin, ciprofloxacina e enrofloxacin), com concentração 500 mg L⁻¹, foram preparadas em MeOH; a quantidade em massa de cada padrão foi pesada considerando seu grau de pureza. Essas soluções foram armazenadas a -18 °C em frasco âmbar. No preparo da solução estoque da levofloxacin, para a dissolução completa do padrão, foi necessária a adição de pequenos volumes de solução de hidróxido de amônio. As soluções estoque de NOR-d5 e CIP-d8 com concentrações 50 mg L⁻¹, foram preparadas em MeOH e ACN respectivamente; em que a quantidade em massa de cada padrão interno foi pesada considerando seu grau de pureza.

As soluções de trabalho contendo NOR, PEF, CIP e ENR a 10, 50, 100 µg L⁻¹ foram preparadas a partir das soluções estoque, bem como as soluções de trabalho contendo os padrões internos utilizados (NOR-d5 e CIP-d8) a 50 e 500 µg L⁻¹. Essas soluções foram armazenadas a -18°C em frasco âmbar. As soluções de trabalho foram usadas para fortificar as amostras de esgoto sintético no processo de validação dos dois métodos desenvolvidos (SPE-LC-MS/MS e MEPS-LC-MS/MS).

3.3 Coletas e amostragens

No desenvolvimento dos métodos de extração por SPE e MEPS foram utilizadas amostras de esgoto sanitário. Esta amostra foi coletada diretamente da rede de esgoto da cidade de São Carlos, localizada nas proximidades do Laboratório de Processos Biológicos (LPB) da Escola de Engenharia de São Carlos - EESC/USP. As amostras se referem ao esgoto sanitário gerado em bairros circunvizinhos ao Campus 2 da USP São Carlos, compostos basicamente por unidades residenciais e poucas unidades comerciais. Essas amostras foram utilizadas inicialmente, por serem sabidamente de alta complexidade. Dessa forma, uma vez que o método foi adequado para essas amostras, por conseguinte, os métodos foram facilmente aplicados em outras amostras, sejam estas de maior ou menor complexidade, como amostras de águas de rios e águas residuais de reatores ou estações de tratamento. As amostras foram acidificadas até pH 3,0, estocadas em frasco âmbar e mantidas sob refrigeração a 4 °C, sendo utilizadas em até três dias após estocagem.

Para garantir que as amostras utilizadas na validação fossem isentas dos antimicrobianos estudados, a validação dos dois métodos analíticos foi feita com amostras sintéticas semelhantes ao esgoto – meio Torres (44). O substrato sintético simula a matriz de amostras aquosas ambientais, sendo contemplada com demanda química de oxigênio de aproximadamente 500 mgDQO/L, e contendo proteínas (na forma de extrato de carne), carboidratos (nas formas de sacarose, amido e celulose), lipídeos (na forma de óleo de soja) e bicarbonato de sódio.

Para aplicação no desenvolvimento e validação da SPE, todas as amostras foram filtradas duas vezes em papel de filtro qualitativo, acidificadas com ácido fórmico e fortificadas em concentração adequada. Na aplicação e desenvolvimento da MEPS, além da filtração em papel de filtro comum, pelo favorecimento do reduzido volume utilizado (< 2,5 mL), as amostras foram filtradas em membranas hidrofílicas de 0,22 µm da *Millipore*.

Após a validação dos métodos SPE-LC-MS/MS e MEPS-LC-MS/MS, estes foram aplicados a amostras de esgoto sanitário, amostras de águas de rios e águas residuais, coletadas na cidade de São Carlos-SP. O objetivo da aplicação foi investigar possíveis perfis de contaminação com esses antimicrobianos, nas amostras coletadas. Os pontos de coleta foram escolhidos de forma a obter maior representação dos efluentes e rios presentes na cidade de São Carlos-SP. A cidade é cortada pelos rio Monjolinho, Gregório e Santa Maria do Leme, e pelos córregos, Tijuco Preto, Simeão, Água Quente e Água Fria. A Figura 7, mostra

o mapa contendo os pontos de coleta. Para aplicação, essas amostras passaram pelo mesmo procedimento de preparo descrito acima, antes da submissão às técnicas de extração.

O ponto 1 apresentado no mapa (Figura 7), refere-se ao esgoto sanitário (representativo dos bairros circunvizinhos do Campus 2 da USP São Carlos); o ponto 2 refere-se ao córrego Mineirinho (pertencente à bacia do rio Monjolinho); o ponto 3 se refere ao rio Monjolinho (localizado próximo à entrada principal da USP São Carlos - Campus 1); o ponto 4 refere-se ao rio Monjolinho (local próximo ao Shopping Iguatemi) e o ponto 5 também se refere ao rio Monjolinho, mas coletado nas proximidades da UFSCar.

Figura 7 - Mapa representativo, para indicação dos pontos de coleta realizados na cidade de São Carlos-SP. Tais amostras foram aplicados nos métodos SPE-LC-QTRAP/MS e MEPS-LC-QTRAP/MS.

3.4 HPLC-UV e HPLC-MS/MS

A coluna analítica Poroshell 120 EC-C18 (100 mm x 3,0 mm; 2,7 μ m) foi adquirida de Agilent Technologies, e utilizada para as análises cromatográficas feitas no HPLC da série 20A Prominence, Shimadzu, contendo bombas LC- 20AD, amostrador automático SIL-20A, forno para colunas CTO-20A e detector UV/Vis SPD 20A.

Nas análises por HPLC acoplado à espectrometria de massas foi utilizado um sistema LC-ESI-QtoF/MS compreendido por HPLC Shimadzu série 20A Prominence e espectrômetro Bruker, equipado com coluna Kinetex XB-C18 (100 mm x 2,1 mm; 2,6 μm) da Phenomenex. Os compostos foram analisados por *electrospray* operando no modo positivo, temperatura de dessolvatação de 200 °C, com fluxo do gás de secagem de 8 mL min⁻¹ e pressão do nebulizador de 1,6 bar.

Para a validação dos métodos analíticos e objetivando analisadores de massas mais sensíveis, as análises foram realizadas em um sistema LC-ESI-QTRAP^{TM}/MS compreendido por HPLC Agilent série 1200 e espectrômetro AB Sciex 5500QTRAP^{TM} com fonte *TurboIonSpray* e coluna analítica Poroshell 120 EC-C18 (50 mm x 3,0 mm; 2,7 μm) de Agilent Technologies. Nessas análises empregou-se a fonte de ionização à pressão atmosférica (API) no modo *electrospray* positivo (ESI +). Com o objetivo de análises quantitativas e qualitativas, três transições SRM (com seus parâmetros otimizadas por infusão dos analitos) foram monitoradas para cada antimicrobiano, com exceção dos padrões internos para os quais foi monitorada somente uma transição SRM. Todas as transições foram adquiridas no modo *Scheduled MRM*^{TM}, utilizando *target scan time* de 0,5 segundo, com uma janela de detecção de 15 segundos. O algoritmo *Scheduled MRM*^{TM} utilizado possibilitou análises com maior detectabilidade e repetibilidade, além disso esse modo de aquisição utiliza um ajuste automático do *dwell time* empregado, de maneira que foram garantidos em média 12 pontos de aquisição por pico cromatográfico.

Os parâmetros da fonte foram determinadas por análise de injeção em fluxo (FIA), sendo gás de cortina (nitrogênio) 20 psi; temperatura da fonte 650 °C; voltagem do *electrospray* 5500 V; gás de aquecimento e gás nebulizador (ambos nitrogênio) 50 psi; e o potencial de entrada (EP, do inglês “entrance potential”) 10 V. Todos os dados foram adquiridos e processados utilizando o software *Analyst* 1.5.1.

Na Tabela 1 são apresentados os parâmetros de energia de colisão (CE, do inglês “collision cell”), o potencial de orifício (DP, do inglês “declustering potential”), o potencial de saída da cela de colisão (CXP, do inglês “collision cell exit potential”), e os fragmentos selecionados, otimizados no sistema LC-ESI-QTRAP^{TM}/MS para análise de cada um dos antimicrobianos e os padrões internos (IS, do inglês “internal standard”), com os valores de tempo de retenção (t_r) correspondentes.

Tabela 1 - Parâmetros otimizados para análise dos antimicrobianos por LC-ESI-QTRAP^{TM}/MS no modo de ionização ESI+, usando o modo de aquisição *Scheduled MRM^{TM}*.

Fluoroquinolonas	IS	Íon precursor (M+H) ⁺ (m/z)	Íon produto (M+H) ⁺ (m/z)	t _r (min.)	DP (V)	EP (V)	CE (eV)	CXP (V)
NOR1	NOR1-d5	320	302	2,7	66	10	29	14
NOR2*		320	276	2,7	66	10	23	14
NOR3		320	233	2,7	66	10	33	10
NOR1-d5		325	281	2,7	96	10	25	12
PEF1*	CIP1-d8	334	290	2,7	61	10	25	14
PEF2		334	233	2,7	61	10	35	12
PEF3		334	205	2,7	61	10	47	8
CIP1-d8		340	296	2,7	91	10	25	14
CIP1*	CIP1-d8	332	288	2,7	96	10	25	14
CIP2		332	314	2,7	96	10	29	14
CIP3		332	231	2,7	96	10	49	12
ENRO1*	CIP1-d8	360	316	3,2	120	10	47	9
ENRO2		360	245	3,2	120	10	47	9
ENRO3		360	286	3,2	120	10	47	9

*Transições de maior intensidade e utilizadas para quantificação dos respectivos antimicrobianos.

3.5 Validação dos métodos desenvolvidos

O protocolo de validação foi adaptado tendo como base critérios aceitos por diferentes diretrizes EPA, INMETRO, AOAC e FDA. A adaptação de diferentes guias de validação foi necessária, devido à inexistência de guias específicos para análise de antimicrobianos/fármacos em amostras aquosas. O mesmo protocolo foi aplicado para os métodos SPE e MEPS.

Uma curva analítica com cinco concentrações diferentes (exceto para a ENR em que a validação do método SPE foi feita com seis pontos) foi construída, usando cinco replicatas para os pontos baixo, médio e alto, e com triplicatas nos demais pontos.

A curva de calibração foi obtida plotando-se a área relativa do pico (divisão da área do pico do analito pela área do pico do padrão interno) versus a concentração do analito no padrão de calibração (esgoto sintético branco fortificado pelos analitos). A NOR-d5 e a CIP-d8 foram utilizadas como padrão interno nas análises.

O limite de detecção (LD) foi estabelecido como sendo três vezes a relação sinal/ruído e o limite de quantificação (LQ) como sendo no mínimo dez vezes a relação sinal/ruído, com precisão e exatidão aceitáveis.

A precisão intra-dia foi avaliada em cinco replicatas em três níveis diferentes 15 ng L⁻¹ (baixo), 150 ng L⁻¹ (médio) e 500 ng L⁻¹ (alto) para a SPE, sendo os níveis 50 ng L⁻¹ (baixo), 1500 ng L⁻¹ (médio) e 5000 ng L⁻¹ (alto) para a MEPS. A precisão inter-dias foi avaliada em três dias diferentes para os níveis baixo, médio e alto. A exatidão foi calculada nos mesmos três níveis de concentração, conforme a equação 1.

$$Exatidão (\% bias) = \left(\frac{x_i - x}{x} \right) \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Sendo x_i o valor de concentração experimental e x o valor de concentração nominal da determinação.

O estudo do efeito de matriz (ME, do inglês “matrix effect”), eficiência total de extração (PE, do inglês “process efficiency”) e recuperação (RE, do inglês “recovery”) foi realizado de acordo com o trabalho de Matuszewski e seus colaboradores. Os valores de ME, RE e PE foram calculados (Equações 2 a 4) a partir da razão entre os coeficientes angulares das retas referentes às curvas de calibração no solvente (curva A), no extrato pós-fortificado (curva B) e no extrato do padrão fortificado antes da extração (curva C). (28; 45)

$$ME (\%) = (B/A) \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

$$RE (\%) = (C/B) \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

$$PE (\%) = (C/A) \times 100 = (ME \times RE)/100 \quad \text{Equação 4}$$

A robustez foi avaliada através do teste de Youden, o qual possui um desenho fatorial fracionário que explora a influência de sete variáveis em dois níveis diferentes (Tabela 2 e 3). As letras maiúsculas representam os valores nominais ou padrão do método desenvolvido e as letras minúsculas às variações a serem estudadas. Assim, nesse teste são realizados oito experimentos de forma aleatória com a combinação fatorial dos parâmetros avaliados e verifica-se qual o efeito ou combinações de efeitos que influenciam no resultado final (Tabela 4).

Tabela 2 - Fatores para a determinação da robustez do método SPE-LC-MS.

Fator	Nominal		Variação	
Temperatura da coluna (°C)	30 °C	A	40 °C	a
Vazão da fase móvel (mL min ⁻¹)	0,6 mL min ⁻¹	B	0,5 mL min ⁻¹	b
Tipo de fase extratora	Strata XA	C	Cromabond XA	c
Volume de condicionamento (mL)	6 mL	D	3 mL	d
Secagem	c/ secagem	E	s/ secagem	e
Temperatura da fonte (°C)	650 °C	F	600 °C	f
Pressão do gás de aquecimento (psi)	50 psi	G	45 psi	g

Tabela 3 - Fatores para a determinação da robustez do método MEPS-LC-MS.

Fator	Nominal		Variação	
Temperatura Coluna (°C)	30 °C	A	40 °C	a
Vazão da fase móvel (mL min ⁻¹)	0,6 mL min ⁻¹	B	0,5 mL min ⁻¹	b
Fase extratora	Strata XL	C	Oasis HLB <i>Waters</i>	c
Nº de ciclos de amostragem	8	D	5	d
Secagem	c/ secagem	E	s/ secagem	e
Temperatura da fonte (°C)	650 °C	F	600 °C	f
Pressão do gás de aquecimento (psi)	50 psi	G	45 psi	g

Tabela 4 - Matriz de Youden.

Efeito	Combinação dos parâmetros							
	Exp.1	Exp.2	Exp.3	Exp.4	Exp.5	Exp.6	Exp.7	Exp.8
A/a	A	A	A	A	a	a	a	a
B/b	B	B	b	b	B	B	b	b
C/c	C	c	C	c	C	c	C	c
D/d	D	D	d	d	d	d	D	D
E/e	E	e	E	e	e	E	e	E
F/f	F	f	f	F	F	f	f	F
G/g	G	g	g	G	g	G	G	g
RESULTADO	<i>s</i>	<i>t</i>	<i>u</i>	<i>v</i>	<i>w</i>	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>

Em cada experimento foram realizadas três injeções e os resultados da análise são representados pelas letras de *s* a *z*.

Para comparar a influência da variação de cada parâmetro, foi calculada a diferença da média dos valores correspondentes às letras maiúsculas com a média dos valores referentes às letras minúsculas como representado pela Equação 5 e 6.

$$Efeito A/a = D_a = \frac{s + t + u + v}{4} - \frac{w + x + y + z}{4} \quad \text{Equação 5}$$

$$Efeito B/b = D_b = \frac{s + t + w + x}{4} - \frac{u + v + y + z}{4} \quad \text{Equação 6}$$

Assim, a influência dos sete parâmetros analíticos foi avaliada em relação à recuperação dos dois métodos de preparo de amostra desenvolvidos.

4. Resultados e discussão

4.1 Otimização da separação cromatográfica das FQs

A otimização da separação das FQs no sistema HPLC-UV foi realizada inicialmente injetando-se separadamente cada uma das FQs (utilizando a coluna Poroshell EC-C18, sendo o mesmo comportamento de seletividade previsto para a coluna Kinetex XB-C18) fazendo a identificação de cada composto a partir do tempo de retenção (Figura 8), para posterior injeção da mistura.

Figura 8 - Cromatogramas sobrepostos das fluoroquinolonas estudadas. Condições gerais: volume de injeção: 1 μ L; FM: (A) ácido fórmico 0,1% e (B) ACN; eluição por gradiente (0,01 min 8% B; 16 min 20% B; 17 min 8% B e 22 min 8% B); temperatura do forno 40 °C e vazão 0,5 mL min⁻¹.

Para obter a melhor separação possível, foram avaliadas diferentes possibilidades de gradiente de eluição, sendo utilizados como solvente orgânico de eluição ACN e solvente aquoso com 0,1% ácido fórmico. Dentro das condições de otimização da separação cromatográfica avaliada, a melhor condição a ser utilizada nas análises por HPLC-UV foi: coluna Poroshell 120 EC-C18, volume de injeção: 1 μ L; FM: (A) ácido fórmico 0,1% e (B) ACN; eluição em gradiente (0,01 min 8% B; 16 min 20% B; 17 min 8% B e 22 min 8% B); temperatura do forno 40 °C e vazão 0,5 mL min⁻¹.

No entanto, mesmo para estes últimos parâmetros ajustados, verificamos que não foi possível, dentro das condições cromatográficas utilizadas, obter uma separação efetiva entre os picos da norfloxacin e da levofloxacin. Assim, para o desenvolvimento dos métodos de extração, os quais utilizaram em algumas etapas a HPLC-UV, foram selecionadas somente quatro das fluoroquinolonas (norfloxacin, pefloxacin, ciprofloxacina e enrofloxacin).

Devido à seletividade propiciada pela detecção por espectrometria de massas, as otimizações da separação por LC-ESI-QtoF/MS e LC-ESI-QTRAP/MS, foram feitas ajustando a porcentagem de solvente orgânico que permitisse uma maior detectabilidade dos antimicrobianos estudados.

4.2 Desenvolvimento da extração em fase sólida

No preparo de amostra por extração em fase sólida, foram feitos testes com oito tipos diferentes de fases estacionárias, as quais eram reportadas por outros pesquisadores na análise de FQs em amostra aquosas, de acordo com a revisão de Speltini e seus colaboradores.(3)

Todas as fases extratoras testadas nessa etapa foram avaliadas pelo parâmetro de eficiência total do método de extração, sendo realizada a extração de amostra de água de abastecimento (100 mL), fortificadas em concentração de $250 \mu\text{g L}^{-1}$. A Tabela 5 mostra os valores de eficiência total da extração encontrados para todas as fases avaliadas. O método de SPE (Figura 9) utilizado para a avaliação desses cartuchos foi otimizado a partir de diversas modificações dos métodos de extração já utilizados por outros autores.(1; 3; 5; 9)

Os parâmetros da SPE que tiveram mais variações em relação aos trabalhos encontrados na literatura foram: a etapa de condicionamento onde foi necessário aumentar o volume de solvente orgânico (MeOH); a etapa de lavagem (com 100% de solvente aquoso - água acidificada pH 3,0) e ainda o solvente de eluição dos analitos (de 1% NH_3 em MeOH para 100% MeOH).

Tabela 5 - Avaliação das fases extratoras.

Fase extratora (100mg)	Eficiência total do processo (%)			
	NOR	PEF	CIP	ENR
C18 – AllTech	44,6	90,8	43,3	99,8
Select HLB	31,3	40,3	43,3	90,7
Oasis HLB	91,1	94,0	76,0	104,9
Strata X	89,8	97,6	75,2	84,0
Chromabond HR-X	117,6	113,8	101,6	137,8
Chromabond tetracycline	27,0	39,2	36,9	108,3
Empore UR	10,5	18,0	20,9	41,6
Empore C18	16,1	42,0	17,7	78,6

Figura 9 - Fluxograma do procedimento otimizado para a extração em fase sólida.

A partir dos valores apresentados na Tabela 5, verificou-se que a fase sólida de melhor desempenho para a extração das fluoroquinolonas foram o Strata X, Oasis HLB e o Chromabond HR-X. Utilizando somente esses três cartuchos, foram feitos testes de extração em as amostras de esgoto fortificadas em concentrações ainda mais baixas, com o objetivo de adequar o método às concentrações de antimicrobianos encontradas em ambientes aquáticos.

Ao aplicar o método da SPE desenvolvido anteriormente (Figura 9) em amostras de esgoto doméstico, não conseguimos valores de recuperação satisfatórios. A explicação para tal fato pode ser explicada pela complexidade da matriz que foi analisada. Dessa forma, conforme sugerido por outros trabalhos encontrados na literatura, onde utilizaram cartuchos de troca aniônica forte antes do cartucho de extração, foram feitas extrações das amostras de esgoto (fortificadas em concentração $10 \mu\text{g L}^{-1}$) utilizando dois cartuchos diferentes sequencialmente (Figura 10). O primeiro cartucho apresenta uma fase polimérica de troca

aniônica forte (Chromabond HRXA ou Strata XA) acoplado ao cartucho de fase polimérica reversa (Strata X, Oasis HLB ou Chromabond HRX). O novo método desenvolvido com a utilização desses dois cartuchos é apresentado na Figura 11.

Figura 10 - Esquema dos cartuchos de SPE em série.

Figura 11 - Fluxograma do método SPE utilizado para amostras aquosas complexas.

Uma melhor eficiência de extração utilizando a fase de troca aniônica junto com um cartucho de fase polimérica tipo HLB pode ser explicada pela adsorção dos interferente orgânicos naturais à fase de troca aniônica, obtendo-se assim melhor remoção desses interferentes na amostra. (3)

Os resultados de recuperação com o novo método de SPE e ainda uma avaliação final do melhor par de fases extratoras a serem utilizadas para análise de fluoroquinonolas em diferentes matrizes aquosas, como água de esgoto e águas superficiais são apresentados no gráfico da Figura 12. As amostras avaliadas nessa estudo, foram amostras de água de esgoto doméstico coletado em reservatório do Campus 2 da USP São Carlos, fortificadas em concentração 10 ng mL^{-1} .

Figura 12 - Gráfico de barras, avaliando a eficiência total do método para os seis pares de cartuchos candidatos a serem utilizados em SPE.

Diante dos resultados apresentados na Figura 12, comparando as extrações feitas com os cartuchos de troca aniônica Strata XA e Chromabond HRXA, podemos verificar que de uma forma geral as extrações utilizando o cartucho Strata XA, obtiveram valores de eficiência total de extração relativamente maiores que as extrações feitas com o Chromabond XA. Em adição a esse resultado, observou-se também que o extrato obtido dos cartuchos Strata XA eram visivelmente mais “limpos” do que os extratos obtidos com o Chromabond HRXA, como observado pela foto apresentada na Figura 13.

Figura 13 - Fotografia comparativa dos extratos obtidos em SPE - Strata XA versus Chromabond HRXA.

Observando ainda os resultados presentes no gráfico na Figura 12, verifica-se que o par de cartuchos que apresentou maior valor de recuperação relativa, foi o Strata XA com o Strata X, conjunto no qual foram obtidos valores de recuperação de 88%, 90%, 92% e 85%, respectivamente, para NOR, PEF, CIP e ENR.

A empresa Phenomenex, fornecedora dos cartuchos Strata X, lançou também no mercado a fase extratora Strata XL. De acordo com a descrição da empresa, a fase Strata XL é composta por um sorvente polimérico de alta capacidade, com partículas grandes (100 μm), totalmente adequados para o uso em amostras viscosas e de grandes volumes. Como a fase Strata XL é quimicamente semelhante à Strata X, fizemos um teste comparativo entre as duas, a partir de amostras de fase extratora Strata XL cedidas pela Phenomenex. O resultado foi satisfatório, pois os valores de recuperação foram um pouco maiores do que o Strata X, para os compostos ENR e CIP, como apresentado no gráfico da Figura 14. Adicionalmente aos valores de recuperação, o processo de extração das amostras de esgoto doméstico utilizando a fase Strata XL, se mostrou mais fácil de ser realizado por não ter ocorrido nenhuma forma de “entupimento” dos cartuchos, o que ocasionalmente ocorria quando se utilizava a fase Strata X. Assim, definiu-se os cartuchos Strata XA e Strata XL, como sendo o par de cartuchos ideal, para extração das amostras por SPE.

Figura 14 - Gráfico de barras mostrando a eficiência total de extração dos cartuchos Strata X e Strata XL.

O método de SPE desenvolvido conta com a vantagem adicional, em relação a outros trabalhos semelhantes encontrados na literatura, de utilizar cartuchos com um preço menor do que outros utilizadas comumente, garantindo ainda um desempenho igual ou superior em eficiência de extração.

4.3 Desenvolvimento da extração por MEPS

As extrações foram feitas utilizando dispositivo para MEPS projetado no grupo de pesquisa e confeccionado na oficina mecânica do IQSC, a Figura 15 apresenta a foto das partes utilizadas nesse dispositivo. Esse dispositivo de extração comporta, aproximadamente, 3,8 mg de fase extratora e possui a vantagem de permitir a livre escolha da fase a ser utilizada, uma vez que o seu preenchimento é bastante simples.

Figura 15 - Fotografia da seringa utilizada para MEPS e do microdispositivo de extração confeccionado no IQSC (destaque para o dispositivo desmontável, na parte superior da fotografia).

O método da SPE já desenvolvido e otimizado, como esperado, influenciou positivamente no direcionamento dos parâmetros a serem otimizados no MEPS, uma vez que o MEPS é uma minituarização da extração em fase sólida. Assim, as escolhas da fase extratora, solventes de condicionamento, lavagem e eluição utilizados no MEPS, foram os mesmos que proporcionaram melhor eficiência no método de SPE. No entanto, a fim de assegurar o resultado do método foi realizada uma otimização por planejamento fatorial.

4.3.1 Planejamento experimental para otimização da extração por MEPS

As variáveis da técnica MEPS foram avaliadas por planejamento fatorial. Cinco variáveis foram identificadas como parâmetros que poderiam afetar a eficiência do método e dois planejamentos fatoriais completos foram aplicados separadamente, como apresentado nas Tabelas 6, 7 e 8. O ponto central foi feito em triplicata para medir o erro puro de cada planejamento.

Tabela 6 - Variáveis avaliadas nos planejamentos experimentais.

	Planejamento fatorial 2³	Planejamento fatorial 2²
Variáveis	Número de ciclos de condicionamento	Número de ciclos de eluição
	Número de ciclos de amostragem	Volume de eluição
	Número de ciclos de lavagem	-

Tabela 7 - Planejamento experimental 2³.

Experimento	Nº de ciclos de condicionamento (-1 = 4; 0 = 7; 1 = 10)	Nº de ciclos de amostragem (-1 = 4; 0 = 7; 1 = 10)	Nº de ciclos de lavagem (-1 = 4; 0 = 6; 1 = 8)
A	1	-1	-1
B	-1	1	1
C (c)	0	0	0
D	1	1	-1
E	-1	-1	-1
F (c)	0	0	0
G	1	1	1
H	1	-1	1
I	-1	-1	1
J	-1	1	-1
K (c)	0	0	0

(c) Ponto central.

Tabela 8 - Planejamento experimental 2².

Experimento	Nº de ciclos de eluição (-1 = 4; 0 = 7; 1 = 10)	Volume de eluição (-1 = 50 µL; 0 = 75 µL; 1 = 100 µL)
A (c)	0	0
B	1	1
C (c)	0	0
D (c)	0	0
E	-1	1
F	-1	-1
G	1	-1

(c) Ponto central.

O *software* Statistica 6.0 foi utilizado para processar os resultados dos experimentos que compuseram a otimização multivariada aplicada para MEPS.

As variáveis estudadas na otimização multivariada da MEPS envolvem basicamente a avaliação da influência do número de ciclos em cada etapa do processo, sobre a eficiência total da extração. O estudo do número de ciclos passa a ser relevante uma vez que ele define o número de vezes que a fase extratora entra em contato com os solventes de condicionamento, lavagem e eluição, e com a própria amostra. O planejamento experimental foi realizado, utilizando amostras de esgoto sintético (500 µL) fortificadas em 50µg⁻¹, e processadas em seringa de 500 µL, utilizando a fase extratora Strata XL.

Os diagramas de Pareto foram feitos a partir dos dados de eficiência total do método de MEPS para cada variável avaliada no planejamento fatorial proposto. Os resultados para norfloxacin e para ciprofloxacina são apresentados nas Figura 16 e 17, sendo estes representativos para os demais analitos estudados.

Figura 16 - Diagramas de Pareto de NOR (A) e CIP (B) para o planejamento fatorial 2³.

Figura 17 - Diagramas de Pareto de NOR (A) e CIP (B) para o planejamento fatorial 2².

Os diagramas de Pareto para ambos os planejamentos experimentais feitos mostraram que nenhuma das variáveis estudadas possui efeito significativo na eficiência do método de preparo de amostra por MEPS, para nenhuma das FQs. Ao avaliar detalhadamente esses resultados, verificou-se que dentro dos experimentos realizados os valores de eficiência total para todas as FQs estavam muito próximos (com valores de coeficiente de variação entre 7 e 13%). Adicionalmente, o desenvolvimento prévio do método de SPE permitiu um bom direcionamento do método MEPS.

O planejamento experimental empregado permitiu ainda verificar a interação entre as variáveis do método MEPS estudado. A superfície de resposta apresentada na Figura 18, mostra a relação entre as variáveis volume de eluição e número de ciclos de eluição (valores referenciados de acordo com a Tabela 6). Apesar dos efeitos não chegarem a ser significativos, o resultado sugere que quanto maior o volume de eluição utilizado no método, menor é o número de ciclos de eluição necessários para obter uma melhor eficiência de extração do método.

Figura 18 - Superfície de resposta para volume de eluição e número de ciclos de eluição.

O método MEPS, após a avaliação por planejamento experimental, ficou definido com as seguintes etapas descritas na Figura 19.

Figura 19 - Fluxograma das etapas envolvidas na extração por MEPS.

*A descrição (4+1) ciclos na etapa de lavagem, se refere a realização do último ciclo de lavagem com a utilização de uma solução nova do solvente correspondente.

É válido ressaltar que não foram encontradas dificuldades na aplicação do método para amostras mais complexas, em que na extração em fase sólida convencional foi necessário fazer modificações do método na transição de amostras de água de abastecimento para água de esgoto. Além da fácil aplicabilidade do método em amostras complexas, foi possível realizar, no mínimo, 55 extrações consecutivas utilizando o mesmo dispositivo de extração, sem constatar nenhuma evidência de efeito memória e perda na eficiência da extração. Esse dispositivo ainda possui a vantagem de poder ser simplesmente desfeito e remontado, permanecendo com o mesmo desempenho.

Além disso, as análises das amostras processadas por MEPS apresentaram menos interferentes que a SPE, demonstrando uma maior limpeza das amostras, como é observado na comparação entre os cromatogramas para amostras de esgoto doméstico extraídas por MEPS

e SPE (Figura 20) e o extrato da amostra não fortificada processadas pelas duas técnicas (Figura 21).

Figura 20 - Comparação entre os cromatogramas LC-UV obtidos para amostras de esgoto sanitário (concentração final $5 \mu\text{g mL}^{-1}$), processadas por SPE e MEPS. Condições gerais: análise em gradiente (A - água 0,1% ácido fórmico; B - ACN), temperatura do forno a 40°C e vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$.

Figura 21 - Comparação entre os cromatogramas LC-UV obtidos para os extratos não fortificados das amostras de esgoto doméstico extraídas por SPE e MEPS. Condições gerais: análise em gradiente (A - água 0,1% ácido fórmico; B - ACN), temperatura do forno a 40°C e vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$.

4.4 Comparação do efeito de matriz nas análises de esgoto sanitário

A partir do método de SPE otimizado e desenvolvido para análise de águas residuais por HPLC-UV e LC-ESI-QtoF/MS, foi realizado um estudo preliminar à validação dos métodos, avaliando o efeito matriz (ME) para as duas formas de detecção estudadas, aplicadas em amostras de esgoto doméstico fortificado em concentrações detectáveis. O efeito matriz foi avaliado de acordo com o trabalho de Matuszewski *et. al.* (28;45)

As amostras de esgoto utilizadas nesse estudo foram fortificadas em diferentes níveis de concentração e em replicatas para cada um dos pontos, como mostrado na Tabela 9. Os valores comparativos de efeito de matriz, eficiência total de extração e recuperação, apresentados na Tabela 10 foram calculados a partir dos coeficientes angulares de cada curva.

Tabela 9 - Valores de concentração utilizados em cada curva.

	Amostra fortificada	Níveis de concentração	Replicata
Curva A	-	2 $\mu\text{g mL}^{-1}$	2x
	-	40 $\mu\text{g mL}^{-1}$	2x
	-	100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	2x
Curva B	-	2 $\mu\text{g mL}^{-1}$	2x
	-	40 $\mu\text{g mL}^{-1}$	2x
	-	100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	2x
Curva C	10 $\mu\text{g L}^{-1}$ (nível baixo)	-	5x
	40 $\mu\text{g L}^{-1}$	-	2x
	200 $\mu\text{g L}^{-1}$ (nível médio)	-	5x
	350 $\mu\text{g L}^{-1}$	-	2x
	500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (nível alto)	-	5x

Tabela 10 - Valores dos parâmetros de RE, PE e ME, nas análises feitas em LC-MS e LC-UV

	NOR		PEF		CIP		ENR	
	LC-UV	LC-MS	LC-UV	LC-MS	LC-UV	LC-MS	LC-UV	LC-MS
Ef.Matriz (B/A) %	90,9	85,4	100,7	92,6	87,3	79,0	100,3	86,8
Ef.Total (C/A) %	85,2	82,4	90,6	84,8	83,7	78,3	89,3	79,9
Rec. (C/B) %	93,8	99,7	89,9	91,5	95,8	99,1	89,0	92,1

A partir dos resultados apresentados na Tabela 10, observou-se que o efeito de matriz (para a faixa de concentração de 10 a 500 $\mu\text{g L}^{-1}$) do método não foi relevante para os analitos. Mesmo diante da complexidade das amostras de esgoto, o método de SPE desenvolvido possibilitou a determinação e identificação de todas as fluoroquinolonas estudadas. Praticamente nenhum resultado, mesmo pela detecção UV-vis, foi influenciado pelos interferentes encontrados na matriz.

No entanto, apesar dos resultados satisfatórios em relação ao efeito matriz, a aplicabilidade das concentrações estudadas não são totalmente condizentes e/ou adequadas às concentrações de antimicrobianos presentes em amostras ambientais (concentrações menores do que $1 \mu\text{g L}^{-1}$, normalmente). Uma alternativa para contornar o fato supracitado foi o uso de um sistema de LC-MS/MS com espectrômetro de massas do tipo 5500 QTRAP^{TM}—(item 3.5), o qual permitiu uma melhor detectabilidade nas análises, gerando valores de limite de detecção e quantificação condizentes às análises de compostos ao nível de traços no ambiente.

4.5 Validação do método SPE-LC-MS/MS

4.5.1 Seletividade

No desenvolvimento de métodos envolvendo a análise de vários compostos presente em uma matriz complexa, pode-se afirmar que o método é seletivo quando não há sobreposição de picos ou coeluição de interferentes com os compostos de interesse, além de quantificar com exatidão o analito na presença de interferentes existentes na amostra. Assim, a seletividade foi avaliada pela contaminação da matriz (isenta dos analitos) com alguns compostos amplamente utilizados (ibuprofeno, cafeína, ácido acetilsalicílico (AAS) e nicotina) e de maior potencialidade de interferência na análise das FQs. Os cromatogramas obtidos nos diversos canais de SRM, dentro das janelas de retenção dos antimicrobianos, não demonstraram qualquer pico cromatográfico que pudesse ser atribuído a um falso positivo. O cromatograma do extrato da matriz contaminada com os potenciais interferentes e processada por SPE é apresentado na Figura 22.

Figura 22 - Cromatograma de íons totais das 48 transições de SRM monitoradas para as FQs obtido a partir da extração da matriz esgoto sintético isenta de FQs e fortificadas com ibuprofeno, cafeína, AAS e nicotina.

4.5.2 Linearidade

A linearidade do método SPE-LC-MS/MS foi avaliada através da curva analítica (Figura 23) construída em amostras de esgoto sintético fortificadas em cinco níveis diferentes; exceto para enrofloxacin – em que a curva foi feita em 6 níveis. A faixa de quantificação analítica, os coeficientes de determinação e correlação e as equações de regressão linear para cada antimicrobiano estão apresentados na Tabela 11.

Figura 23 - Curvas analíticas para as FQs processadas por SPE. A reta de regressão linear ajustada foi obtida a partir da ponderação em função de $1/x$.

Tabela 11 - Dados da curva analítica.

FQs	Faixa linear (ng L ⁻¹)	Coefficiente de determinação (r ²)	Coefficiente de correlação (r)	LQ (ng L ⁻¹)	LD (ng L ⁻¹)
NOR	15 - 500	0,9937	0,9968	15	5
PEF	15 - 500	0,9970	0,9985	15	5
CIP	15 - 500	0,9890	0,9945	15	5
ENR	5 - 500	0,9910	0,9955	5	1,5

Além dos coeficientes de correlação, uma ferramenta para complementar a avaliação da linearidade da curva analítica é a construção do gráfico de resíduos. A Figura 24 apresenta aos gráficos de resíduos para as fluoroquinolonas estudadas. A distribuição dos resíduos, em relação a área relativa (eixo y da curva), mostra que não houve falta de ajuste para o modelo proposto.

Figura 24 - Gráfico de resíduos para o ajuste dos dados experimentais de cada Fluoroquinolonas, à reta de regressão linear – SPE.

4.5.3 Precisão e Exatidão

O estudo de precisão intradia e interdias foi expresso em desvio padrão relativo (DPR, %) sendo obtidos valores abaixo de 20% para o nível baixo (LQ) e 15% para os demais níveis (Tabela 12). Já os estudos de exatidão (*bias*) também apresentaram valores aceitáveis (menores do que $\pm 20\%$) para o nível baixo (LQ) e menores do que $\pm 15\%$ para os demais níveis. Esses limites de referência são utilizados pela maior parte das agências regulamentadoras e adicionalmente estão totalmente coerentes com o que é regulamentado pela EPA para análise de compostos orgânicos em amostras de água. (46; 47; 48)

Tabela 12 - Valores de precisão e exatidão obtidos para o método SPE desenvolvido.

FQs	Níveis	Precisão intradia DPR (%) (n=5)	Precisão interdias DPR (%) (n= 11)	Exatidão (% <i>bias</i>) (n=3)
Norfloxacin	Baixo	8,57	8,56	19,13
	Médio	7,83	14,20	-0,90
	Alto	2,00	9,22	5,79
Pefloxacin	Baixo	5,03	14,60	16,94
	Médio	6,17	13,70	3,73
	Alto	5,10	8,44	-0,07
Ciprofloxacina	Baixo	8,55	10,55	8,83
	Médio	4,42	14,30	-4,35
	Alto	3,95	8,80	4,47
Enrofloxacin	Baixo	5,24	10,01	5,48
	Médio	7,40	13,97	-0,50
	Alto	5,30	8,64	6,01

n= numero de extrações

4.5.4 Recuperação e efeito matriz

Com base nos estudos feitos por Matuszewski *et. al*, foi feito o estudo do efeito de matriz, recuperação e eficiência total do método. Os valores de ME, PE e RE (Tabela 13) foram calculados a partir dos coeficientes angulares de cada curva. (28)

Tabela 13 - Valores de recuperação, efeito matriz e eficiência total do método SPE validado.

	NOR	PEF	CIP	ENR
Recuperação (%)	123	99	120	112
Ef. Matriz (%)	67	90	76	117
Ef. Total (%)	82	89	92	131

Os valores apresentados na Tabela 13 indicam, em vista de uma matriz complexa, um método com eficiência relativamente próxima a 100% para os compostos estudados, com valores de recuperação entre 99 e 123%. Os efeitos de matriz mais intensos foram observados para a norfloxacin e ciprofloxacina (67 e 76 %, respectivamente), indicando a ocorrência de uma provável supressão da ionização nos níveis de concentração das análises feitas por HPLC-QTRAP. Esse efeito pode estar relacionado a possíveis interferentes presentes na matriz e que impedem, de alguma forma, a ionização total de NOR e CIP. Todavia, a presença de um certo grau de efeito de matriz em amostras complexas é, de alguma forma, esperado.

Assim, o uso dos padrões internos deuterados, empregados nesse trabalho, é uma das melhores formas de mitigar a influência desse efeito nas análises de amostras reais.

4.5.5 Robustez

Os resultados, em termos de porcentagem recuperada, de cada uma das fluoroquinolonas, em cada um dos ensaios, podem ser visto na Tabela 14 e a Figura 25 apresenta graficamente quais são os fatores que possuem maior influência na recuperação dos antimicrobianos.

Tabela 14 - Resultados expressos em porcentagem de recuperação das combinações ensaiadas na avaliação da robustez da SPE para cada fluoroquinolona.

FQs	Combinação ensaiada							
	1	2	3	4	5	6	7	8
NOR	108,61	102,86	95,40	105,50	84,40	83,21	109,54	107,30
PEF	92,74	101,63	110,83	123,08	96,54	100,76	93,15	96,56
CIP	84,20	83,44	81,54	84,53	96,54	100,76	93,98	95,59
ENR	125,79	118,87	97,20	110,29	96,54	100,76	91,19	84,44

n=3 medidas

Figura 25 - Efeito dos parâmetros avaliados na robustez sobre a recuperação dos fármacos no método SPE.

Por meio do teste de Youden, foi possível estabelecer, de uma forma geral para todas as FQs estudadas, que os seguintes parâmetros apresentam maior influência no resultado final das análises processadas por SPE :

- temperatura coluna (°C);
- vazão da fase móvel;
- volume de condicionamento (mL).

Assim, esses parâmetros devem ser cuidadosamente realizados em termos de suas variações, durante a aplicação do método de extração por SPE e na sistemática da análise cromatográfica.

4.6 Validação do método MEPS

Similarmente ao protocolo de validação para a SPE, esse foi adaptado às amostras processadas por MEPS.

A fim de se alcançar limites de quantificação mais baixos e para contornar a limitação do menor fator de concentração do MEPS, foi utilizada uma seringa de 1000 μL para a validação do método. A alteração do volume da seringa/amostra, foi avaliada e nenhuma perda da eficiência foi constatada. Os parâmetros volume de condicionamento, lavagem e eluição foram proporcionalmente alterados (200 μL , 200 μL e 100 μL , respectivamente), para melhor adequação ao volume processado pela seringa de maior volume. Os demais parâmetros já otimizados para o volume de 500 μL foram mantidos. No entanto, o fator de concentração foi dobrado, sendo mantido o volume de redissolução da amostra em 50 μL (fator de concentração igual a 20 vezes).

No desenvolvimento do método MEPS foi percebida a maior eficiência dessa técnica em relação à limpeza da amostra, quando comparada aos resultados da extração pela técnica de SPE (Figuras 20 e 21). Assim, foram alcançados limites de quantificação e detecção instrumental, mais baixos do que com a SPE (MEPS apresentou LQ instrumental de 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ e SPE 3 $\mu\text{g L}^{-1}$). No entanto, devido à limitação do fator de concentração da técnica miniaturizada estudada, o limite de quantificação do método de extração foi de 50 ng mL^{-1} (maior que o LQ da SPE – 15 ng L^{-1}).

4.6.1 Seletividade

A seletividade foi avaliada da mesma maneira que o item 4.2.1. Amostra de esgoto sintético isento de FQs foi fortificada com ibuprofeno, cafeína, AAS e nicotina. As análises mostraram que o método é seletivo para os antimicrobianos estudados, mesmo na presença de outros fármacos.

4.6.2 Linearidade, limite de quantificação e detecção

A linearidade do método MEPS-LC-MS/MS foi avaliada através da curva analítica (Figura 26) construída em matriz esgoto sintético fortificada em cinco níveis diferentes. A faixa de quantificação analítica, os coeficientes de determinação e correlação e as equações de regressão linear para cada FQ estão apresentados na Tabela 15.

Figura 26 - Curvas analíticas para as FQs processadas por MEPS-LC-MS. A reta de regressão linear ajustada foi obtida a partir da ponderação em função de $1/x$.

Tabela 15 - Dados das curva analíticas obtidas pelo método de extração MEPS.

FQs	Faixa linear (ng L ⁻¹)	Coefficiente de determinação (R ²)	Coefficiente de correlação (r)	LQ (ng L ⁻¹)	LD (ng L ⁻¹)
NOR	50 - 5000	0,9937	0,9968	50	15
PEF	50 - 5000	0,9970	0,9985	50	15
CIP	50 - 5000	0,9890	0,9945	50	15
ENR	50 - 5000	0,9910	0,9955	50	15

Adicionalmente, para avaliar a linearidade da curva, foi feita a construção do gráfico de resíduos em relação a área relativa (eixo y da curva). A linearidade foi confirmada a partir da distribuição não tendencial dos resíduos (Figura 27).

Figura 27 - Gráfico de resíduos obtidos por MEPS-LC-MS, para o ajuste dos dados experimentais de cada FQ, à reta de regressão linear.

4.6.3 Exatidão e Precisão

O estudo de precisão intradia e interdias foi expresso em desvio padrão relativo (DPR %) sendo obtidos valores abaixo de 20% para o nível baixo (LQ) e 15% para os demais níveis. Os estudos de exatidão (*bias*) apresentaram valores aceitáveis, (abaixo de $\pm 30\%$) para o nível baixo (LQ) e $\pm 15\%$ para os demais níveis (Tabela 16). Esses valores de referência são empregados por alguns guias de validação e órgãos regulamentadores, como AOAC Standard Methods (DPR % até 30% para concentrações menores que $1 \mu\text{g L}^{-1}$) e adicionalmente estão totalmente coerentes com o que é regulamentado pelo EPA para análise de compostos orgânicos em resíduo aquoso.(46; 47; 48)

Tabela 16 - Valores de precisão e exatidão obtidas para o método desenvolvido por MEPS-LC-MS.

FQs	Níveis	Precisão intradias DPR (%) (n=5)	Precisão interdias DPR (%) (n=11)	Exatidão (% <i>bias</i>) (n=3)
Norfloxacin	Baixo	13,79	18,36	23,45
	Médio	3,35	8,03	10,02
	Alto	2,81	13,22	-3,04
Pefloxacin	Baixo	13,72	19,50	-28,55
	Médio	4,77	12,02	3,85
	Alto	3,65	6,51	-4,03
Ciprofloxacina	Baixo	15,32	19,24	15,83
	Médio	4,19	8,72	-2,01
	Alto	2,99	9,97	-0,66
Enrofloxacin	Baixo	6,52	10,78	-14,00
	Médio	4,44	12,86	-11,80
	Alto	2,93	13,95	3,52

n= numero de extrações

4.6.4 Recuperação e efeito matriz

Da mesma forma como avaliado para SPE, foram feitos estudos do efeito de matriz, recuperação e eficiência total do método, de acordo com os estudos feitos por Matuszewski *et. al.* Os valores de ME, PE e RE (Tabela 17), foram calculados a partir dos coeficientes angulares de cada curva.(28 e 45)

Tabela 17 - Valores de recuperação, efeito matriz e eficiência total do método MEPS validado.

	NOR	PEF	CIP	ENR
Efeito de matriz (%)	125	120	89	112
Recuperação (%)	87	94	95	108
Eficiência total (%)	108	113	84	96

Além dos valores satisfatórios de recuperação, os resultados demonstram que o método MEPS-LC-MS, apresenta um efeito de matriz menos pronunciado do que o SPE-LC-MS. O que ajuda a evidenciar que a técnica de extração MEPS é uma ferramenta bastante promissora para análise de amostras complexas e para análise de compostos em níveis traço.

4.6.5 Robustez

Semelhante ao avaliado na validação da SPE, a robustez do método MEPS foi avaliada em termos da porcentagem de recuperação. Os resultados para cada ensaio pode ser visto na Tabela 18 e a Figura 28 apresenta graficamente quais são os fatores que possuem maior influência na recuperação dos antimicrobianos.

Tabela 18 - Resultados expressos em porcentagem de recuperação das combinações ensaiadas na avaliação da robustez – MEPS, para cada fluoroquinolona.

FQs	Combinação ensaiada							
	1	2	3	4	5	6	7	8
NOR	109,09	108,46	114,02	110,95	112,34	109,37	109,46	98,58
PEF	117,25	108,77	98,51	92,56	115,50	116,69	97,90	95,95
CIP	94,52	90,72	82,41	73,87	91,58	92,03	88,82	81,16
ENR	123,58	106,05	102,58	85,61	126,42	117,92	108,07	88,50

n=3 medidas

Figura 28 - Efeito dos parâmetros avaliados na robustez para recuperação dos fármacos - MEPS.

Por meio do teste de Youden, foi possível estabelecer, de uma forma geral para todas as FQs estudadas, que os parâmetros referentes a vazão da fase móvel e fase extratora (particularmente para a ENR), ocasionam maior influência no resultado final das análises.

Assim, esses parâmetros devem ser cuidadosamente operados em termos de suas variações, durante a aplicação do método de extração por MEPS e análise cromatográfica sequencial.

4.7 Aplicação dos métodos desenvolvidos em amostras aquosas – investigação de antibióticos no meio ambiente

Dentre as amostras utilizadas para aplicação do método, foi possível detectar e quantificar algumas das substâncias estudadas conforme a Tabela 19. As análises mostraram contaminação por norfloxacin e ciprofloxacina em níveis quantificáveis, em amostra de esgoto doméstico. Dentre as FQs estudadas essas duas são provavelmente as mais amplamente utilizadas para diversas infecções – norfloxacin (principal aplicação em infecções urinárias e em tratamentos oftalmológicos) e ciprofloxacina (aplicação contra infecções dos rins e/ou do

trato urinário, infecções dos órgãos genitais, infecções da pele e infecções ósseas e articulares).

Tabela 19 - Concentração dos antibióticos detectados nas amostras de esgoto doméstico e rio Monjolinho (proximidades do Shopping Iguatemi).

Amostra	Esgoto sanitário (Ponto 1)		Amostra de água do rio Monjolinho (Ponto 4)	
	SPE (ng L ⁻¹)	MEPS (ng L ⁻¹)	SPE	MEPS
NOR	92,8	71,2	< LQ	nd
PEF	nd	nd	nd	nd
CIP	146,7	156,6	< LQ	nd
ENR	Nd	nd	nd	nd

*nd = não detectado.

A limitação em relação ao fator de concentração da técnica MEPS impossibilitou a detecção dos fármacos encontrados na amostra referente ao Ponto 4. No entanto, devido ao maior fator de concentração do método SPE em relação ao MEPS, foi possível detectar a norfloxacin e a ciprofloxacina na amostra de água do rio Monjolinho coletada nas proximidades do Shopping Iguatemi São Carlos-SP.

4.8 Avaliação comparativa das técnicas MEPS e SPE

A partir dos resultados referentes ao desenvolvimento e validação dos métodos analíticos desenvolvidos, SPE-HPLC e MEPS-HPLC, foi possível ressaltar diferentes vantagens e particularidades de cada técnica. Na Tabela 20, estão apresentados os principais fatores divergentes e importantes em termos comparativos para as duas técnicas (o nível da vantagem é representado pelo maior número de estrelas).

Além dos parâmetros evidentes correlacionados aos preceitos da Química Verde, como menor consumo de solvente orgânico durante o processo de análise, a técnica miniaturizada desenvolvida – MEPS – alcançou níveis de efeito de matriz menores que o método SPE.

Tabela 20 - Comparação entre fatores de maior vantagem entre MEPS e SPE.

	MEPS	SPE
Consumo de solvente orgânico	★★★★★	★★★
Tempo de análise	★★★★	★★★
Consumo de amostra	★★★★★	★★
Fator de pré-concentração	★★★	★★★★★
Consumo de fase extratora	★★★★★	★
Robustez na operação do método	★★	★★★★
Efeito de matriz	★★★★	★★

5. Conclusão

Os métodos SPE-HPLC-UV e SPE-HPLC-MS desenvolvidos possibilitaram a análise das fluoroquinolonas mesmo diante da complexidade das amostras, em que foi possível isolar e concentrar os analitos de interesse, removendo os interferentes da matriz, garantindo ainda resultados com altas taxas de recuperação.

O método MEPS-HPLC-MS, apesar de algumas limitações, como o baixo fator de concentração, apresentou-se mais eficiente do que a SPE em termos de qualidade de limpeza da amostra, durante o processo de extração.

Os dois métodos desenvolvidos apresentaram resultados adequados para os parâmetros validados. Dada a complexidade da matriz e os baixíssimos níveis de concentração, os valores de recuperação, precisão e exatidão observados estão plenamente dentro dos intervalos aceitos por fontes bibliográficas que tratam do assunto. Adicionalmente, são excelentes os limites de detecção e quantificação por SPE, considerado o volume de amostra consumido de apenas 100 mL. Por sua vez, o método de MEPS ainda apresenta valores de LD e LQ aplicáveis a estudos direcionados a verificar o comportamento desses analitos em pesquisas de tratamento/remediação de efluentes contaminados. Uma das grandes vantagens da opção por MEPS é o consumo de apenas 1 mL de amostra, tornando a técnica plenamente compatível com estudos em escala de “bancada”, onde o volume de efluente tratado em um reator é um fator limitante, mesmo frente ao consumo de 100 mL de amostra apresentado pela SPE.

A aplicabilidade do método foi demonstrada através da análise de amostras aquosas coletadas em diferentes regiões da cidade de São Carlos, possibilitando a detecção e quantificação de duas das FQs estudadas em algumas dessas amostras.

5.1 Perspectivas futuras

Os métodos analíticos desenvolvidos e validados serão utilizados em um projeto em colaboração com um grupo de pesquisa do Laboratório de Processos Biológicos da EESC (Escola de Engenharia de São Carlos/USP). Um completo estudo de avaliação do tratamento de amostras de águas residuais contaminadas artificialmente com FQs em reatores anaeróbios horizontais de leito fixo será concretizado com o emprego dos presentes métodos. Nesse estudo, serão realizadas análises da água em diferentes fases do tratamento no reator, antes, durante e ao fim do sistema, sob diferentes condições de uso do reator, a critério do grupo Laboratório de Processos Biológicos (LPB) da EESC. Adicionalmente, em trabalhos futuros, os presentes métodos poderão ser usados como base para o desenvolvimento de outros,

aplicados à análise dos produtos de degradação e de metabolismo dos antibióticos, bem como para a definição de suas rotas de degradação, do ponto de vista do funcionamento do reator biológico e, até mesmo, no ambiente.

Referências bibliográficas

- 1 GOLET, E. M.; ALDER, A. C.; HARTMANN, A.; TERNES, T. A.; GIGER W. Trace determination of fluoroquinolone antibacterial agents in urban wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography with fluorescence detection. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 15, p. 3632-3638, 2001.
- 2 BATT, A. L.; BRUCE, I. B.; AGA, D. S. Evaluating the vulnerability of surface waters to antibiotic contamination from varying wastewater treatment plant discharges. **Environmental Pollution**, v. 142, n. 2, p. 295-302, 2006.
- 3 SPELTINI, A.; STURINI, M.; MARASCHI, F.; PROFUNO, A. Fluoroquinolone antibiotics in environmental waters: Sample preparation and determination. **Journal of Separation Science**, v. 33, n. 8, p. 1115-1131, 2010.
- 4 HERNANDEZ, F.; SANCHO, J.; IBANEZ, M.; GUERRERO, C. Antibiotic residue determination in environmental waters by LC-MS. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 6, p. 466-485, 2007.
- 5 BROWN, K. D.; KULIS, J.; THOMSON, B.; CHAPMAN, T. H.; MAWHINNEY, D. B. Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico. **The Science of the Total Environment**, v. 366, n. 2-3, p. 772-783, 2006.
- 6 MOMPELAT, S.; BOT, B. LE; THOMAS, O. Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. **Environment International**, v. 35, n. 5, p. 803-814, 2009.
- 7 BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 523-530, 2003.
- 8 PICÓ, Y.; ANDREU, V. Fluoroquinolones in soil-risks and challenges. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, n. 4, p. 1287-1299, 2007.
- 9 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.
- 10 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.
- 11 CALISTO, V.; ESTEVES, V. I. Psychiatric pharmaceuticals in the environment. **Chemosphere**, v. 77, n. 10, p. 1257-1274, 2009.
- 12 TOBISZEWSKI, M.; MECHLIŃSKA, A.; ZYGMUNT, B.; NAMIEŚNIK, J. Green analytical chemistry in sample preparation for determination of trace organic pollutants. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 8, p. 943-951, 2009.

- 13 FARRÉ, M.; PÉREZ, S.; GONÇALVES, C.; ALPENDURADA, M.F.; BARCELÓ, D. Green analytical chemistry in the determination of organic pollutants in the aquatic environment. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 11, p. 1347-1362, 2010.
- 14 GÖBEL, A.; MCARDELL, C. S.; JOSS, A.; SIEGRIST, H.; GIGER, W. Fate of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in different wastewater treatment technologies. **The Science of the Total Environment**, v. 372, n. 2-3, p. 361-371, 2007.
- 15 NOVÁKOVÁ, L.; VLCKOVÁ, H. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: chromatography and sample preparation. **Analytica Chimica Acta**, v. 656, n. 1-2, p. 8-35, 2009.
- 16 SILVA, J. M. B.; HOLLENBACH, C. B. Fluoroquinolonas x resistência bacteriana na medicina veterinária. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 77, n. 2, p. 363-369, 2010.
- 17 ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Method 1694**: Pharmaceuticals and personal care products in water, soil, sediment, and biosolids by HPLC/ MS/ MS. Cincinnati, 2007. 1-77 p.
- 18 CUNHA, S. C.; FERNANDES, J.O.; ALVES, A.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Fast low-pressure gas chromatography-mass spectrometry method for the determination of multiple pesticides in grapes, musts and wines. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 1, p. 119-126, 2009.
- 19 ROSSI, D. T.; MILLER, K. G. Sample preparation methods for the analysis of pharmaceutical materials. **Separation Science and Technology**, v. 5, p. 165-201, 2004.
- 20 LANÇAS, F. M. **Extração em fase sólida (SPE)**. São Carlos: Rima, 2004. 87p.
- 21 RODRIGUES, G.D.; SILVA, L.H.M.; SILVA, M.C.H. Alternativas verdes para o preparo de amostra e determinação de poluentes fenólicos em água. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1370-1378, 2010.
- 22 ABDEL-REHIM, M. Recent advances in microextraction by packed sorbent for bioanalysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2569-2580, 2010.
- 23 CHRISTODOULOU, E. A.; SAMANIDOU, V. F.; PAPADOYANNIS, I. N. Validation of an HPLC-UV method according to the European Union Decision 2002 / 657 / EC for the simultaneous determination of 10 quinolones in chicken muscle and egg yolk. **Journal of Chromatography B**, v. 859, n.2, p. 246-255, 2007.
- 24 TURIÉL, E.; MART, A.; TADEO, L. Multiresidue analysis of quinolones and fluoroquinolones in soil by ultrasonic-assisted extraction in small columns and HPLC-UV. **Analytica Chimica Acta**, v. 562, n.1, p. 30-35, 2006.
- 25 TURIÉL, E.; MARTÍN-ESTEBAN, A.; BORDIN, G.; RODRÍGUEZ, A. R. Stability of fluoroquinolone antibiotics in river water samples and in octadecyl silica solid-phase extraction cartridges. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 380, n. 1, p. 123-128, 2004.

- 26 CHIARADIA, M.C.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.
- 27 LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.
- 28 MATUSZEWSKI, B. K.; CONSTANZER, M. L. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS / MS. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 13, p. 3019-3030, 2003.
- 29 EECKHAUT, A.V.; LANCKMAN, K.; SARRE, S.; SMOLDERS, I.; MICHOTTE, Y. Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: evaluation of matrix effects. **Journal of Chromatography B**, v. 877, n. 23, p. 2198-2207, 2009.
- 30 SANGSTER, T.; SPENSE, M.; SINCLAIR, P.; PAYNE, R.; SMITH, C. Unexpected observation of ion suppression in a liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric bioanalytical method. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 18, n. 12, p. 1361-1364, 2004.
- 31 GUERRA, P.; DE LA TORRE, A.; MARTÍNEZ, M. A.; ELJARRAT, E.; BARCELÓ, D. Identification and trace level determination of brominated flame retardants by liquid chromatography / quadrupole linear ion trap mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 22, n. 7, p. 916-924, 2008.
- 32 HAGER, J. W.; YVES LE BLANC, J. C. Product ion scanning using a Q-q-Q_{linear} ion trap (Q TRAP^{TM}) mass spectrometer. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 17, n. 10, p. 1056-1064, 2003.
- 33 GROSS, M.; RODRÍGUEZ-MOZAZ, S.; BARCELÓ, D. Rapid analysis of multiclass antibiotic residues and some of their metabolites in hospital, urban wastewater and river water by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 2013. In Press. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.12.072>>. Acesso em: 12 fev. 2013.
- 34 SENTA, I.; TERZIĆ, S.; AHEL, M. Simultaneous determination of sulfonamides, fluoroquinolones, macrolides and trimethoprim in wastewater and river water by LC-Tandem-MS. **Chromatographia**, v. 68, n. 9-10, p. 747-758, 2008.
- 35 DORIVAL-GARCÍA, N. ; ZAFRA-GÓMEZ, A. ; CANTARERO, S. ; NAVALÓN, A. ; VÍLCHEZ, J.L. Simultaneous determination of 13 quinolone antibiotic derivatives in wastewater samples using solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 106, p. 323-333, 2013.
- 36 RIBANI, M. ; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

37 BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 jun. 2003. Seção 1, p. 56-59.

38 Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO). **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos DOQ-CGCRE-008, revisão 03**. Rio de Janeiro, 2010. Disponível em:

< http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf >. Acesso em: 26 dez. 2012.

39 CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; MARTINS, L. R. R.; OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1021-1030, 2009.

40 LOPES, W. L.; SANTELLI, R. E. ; OLIVEIRA, E. P. ; CARVALHO, M. F. B.; BEZERRA, M. A. Application of multivariate techniques in the optimization of a procedure for the determination of bioavailable concentrations of Se and As in estuarine sediments by ICP OES using a concomitant metals analyzer as a hydride generator. **Talanta**, v. 79, n. 5, p. 1276-1282, 2009.

41 NAGATA, N. Por que otimização multivariada? **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 10, n.2, p. 106-110, 2005.

42 TEÓFILO, R. F. FERREIRA, M. M. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.

43 BRUNS, R. E. SCARMINIO, I. S. BARROS NETO, B. D. **Planejamento e Otimização de Experimentos**. Campinas: UNICAMP, 1995. 278 p.

44 TORRES, P. L. **Desempenho de um reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) de bancada no tratamento de substrato sintético simulando esgoto sanitário sob diferentes condições de operação**. 1992, 101 f. Dissertação de mestrado - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1992.

45 MATUSZEWSKI, B. K. Standard line slopes as a measure of a relative matrix effect in quantitative HPLC-MS bioanalysis. **Journal of Chromatography. B**, v. 830, n. 2, p. 293-300, 2006.

46 ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Method 525.2**: determination of organic compounds in drinking water by liquid-solid extraction and capillary column gas chromatography/mass spectrometry. Cincinnati, 1995. 1- 62p.

47 AOAC; LATIMER, G. Appendix F : Guidelines for standard method performance requirements. In: Official Methods of Analysis, Gaithersburg: AOAC International, 2012, v. 2, p. 1-17.

48 AOAC INTERNATIONAL. **AOAC requirements for single laboratory validation of chemical methods**. Gaithersburg, 2002. Disponível em: <http://www.aoac.org/Ag_Materials/additives/aoac_slv.pdf>. Acesso em: 28 fev. 2013.