



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para a
determinação de fármacos em amostras de água, superficial e tratada,
utilizando a cromatografia líquida de ultra performance acoplada a
espectrometria de massas Tandem (UPLC-MS/MS)**

Valéria Chiérice Rodrigues

**Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau
de Mestre em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Materiais**

**Orientadora:
Profa. Dra. Maria Aparecida Faustino Pires**

**São Paulo
2011**



INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Desenvolvimento e validação de metodologia análítica para a determinação de fármacos em amostras de água, superficial e tratada, utilizando a cromatografia de ultra performance acoplada a espectrometria de massas Tandem (UPLC-MS/MS)

Valéria Chiérice Rodrigues

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Materiais

Orientadora:

Profa.Dra. Maria Aparecida Faustino Pires

São Paulo
2011

À minha filha Nicole

Ao meu marido Cesar

Aos meus pais Antônia e Onivaldo (in memoriam)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida Faustino Pires, pela orientação dinâmica, apoio e paciência, durante toda jornada do desenvolvimento desta dissertação.

Aos professores e colegas do CQMA, Centro de Química Analítica do IPEN, que de uma forma ou de outra, participaram deste trabalho.

À Nestlé Brasil Ltda, pelo subsidio da infra-estrutura utilizada durante às análises instrumentais que serviram de base para o desenvolvimento desta dissertação.

Aos amigos e colegas do Nestlé Quality Assurance Centre em São Paulo que de alguma forma, participaram desta dissertação.

Ao SFDK Laboratório de Análises de Produtos Ltda., pelo apoio.

A minha família, sempre pronta a me auxiliar nas dificuldades e pelo carinho e incentivo.

A Deus pela benção de me enviar uma filha, que completará seu primeiro ano de vida na data de conclusão deste trabalho.

Ao meu marido, pelo amor e companheirismo.

“Não deixe o barulho da opinião dos outros abafar sua voz interior. E mais importante, tenha a coragem de seguir seu coração e sua intuição. Eles de alguma forma já sabem o que você realmente quer se tornar. Tudo o mais é secundário”.

Steve Jobs

Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de fármacos em amostras de água, superficial e tratada, utilizando a cromatografia líquida de ultra performance acoplada a espectrometria de massas Tandem (UPLC-MS/MS)

Valeria Chiérice Rodrigues

RESUMO

O relevante conceito de sustentabilidade dos dias atuais leva a população a pensar no tratamento dos recursos naturais e principalmente na qualidade e escassez da água. A grave problemática quanto à gestão dos resíduos urbanos no país, desde sua produção, coleta e disposição final são os desafios colocado aos municípios e a sociedade em geral. O uso cada vez mais abundante dos medicamentos farmacêuticos gera uma demanda de resíduos que acabam atingindo os leitos dos rios. Com avanço das tecnologias é possível monitorar e conhecer os resíduos que afetam indiretamente e diretamente as águas das bacias hidrográficas. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar uma metodologia analítica para a determinação dos resíduos de fármacos (ácido acetil salicílico, diclorofenaco de sódio, paracetamol, ibuprofeno e fenoprofeno) em águas utilizando a cromatografia líquida de ultra performance acoplada à espectrometria de massas tipo tandem (UPLC-MS/MS). Foram utilizadas duas fases móveis distintas. Para os fármacos paracetamol e diclofenaco foi utilizado como fase móvel água: metanol (1:1; V/V) com adição de ácido fórmico e a ionização de *electrospray* em modo positivo; para os fármacos acetil salicílico, ibuprofeno e fenoprofeno foi utilizado água: metanol (1:1; v/v) com adição de acetato de amônio e a ionização de *electrospray* em modo negativo. O

desempenho do método foi avaliado quanto aos seguintes parâmetros: especificidade e seletividade, faixa de trabalho, linearidade; limite de detecção e limite de quantificação, exatidão, robustez e incerteza de medição. Os resultados obtidos comprovaram a adequabilidade do método ao propósito supracitado. Os valores obtidos para o limite de decisão ($cc\alpha$) e capacidade de detecção ($cc\beta$) foram: paracetamol 0,21 e 0,34 $\mu\text{g L}^{-1}$; diclofenaco 2,42 e 3,24 $\mu\text{g L}^{-1}$; AAS 1,56 e 2,45 $\mu\text{g L}^{-1}$; ibuprofeno 2,34 e 3,21 $\mu\text{g L}^{-1}$ e fenoprofeno 1,89 e 2,33 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. A metodologia foi aplicada na caracterização de amostras de água superficial (bruta) e tratada proveniente de áreas de captação e de tratamento de água da bacia hidrográfica do Paraíba do Sul. Foram realizadas duas coletas distintas, setembro/ 2010 e novembro/ 2010, nos municípios de Guararema, São José dos Campos, Taubaté e Pindamonhangaba. Em 31,2 % das amostras, Cinco amostras de água bruta das 16 amostras analisadas, foram encontrados resíduos de paracetamol. Os resultados obtidos apresentaram-se em uma faixa de concentração de 0,10 a 0,50 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Development and validation of analytical methodology for determination of pharmaceutical compounds in surface and surface treated water samples by ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS)

Valeria Chiérice Rodrigues

ABSTRACT

The relevant concept of sustainability of the present day leads people to think about the treatment of natural resources and particularly in the quantity and scarcity of water. The serious problems regarding the management of municipal waste in the country, from production, collection and disposal are the challenges facing municipalities and society in general. The increasing use of pharmaceutical drugs most abundant generates a demand for waste that eventually reach the river beds. With advancement of technologies and know you can monitor the waste that directly and indirectly affect the waters of river basins. The objective of this study was to develop and validate analytical methods for residues of drugs (aspirin, sodium diclofenac, paracetamol, ibuprofen and fenoprofen) in water using ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). We used two different mobile phases. For the drugs paracetamol and diclofenac was used as mobile phase water:methanol (1:1, v/v) with addition of formic acid in positive electrospray ionization mode. For drugs acetyl salicylic acid, ibuprofen and fenoprofen was used mobile phase water:methanol (1:1, v/v) with addition of ammonium acetate and negative electrospray ionization mode. The performance of the method was evaluated on the following parameters:

specificity and selectivity, working range, linearity, limit of detection and limit of quantification, accuracy, ruggedness and uncertainty measurement. The result obtained proved the suitability of the method for its purpose. The values obtained for the decision limit ($cc\alpha$) and detection capability ($cc\beta$) were 0.21 and 0.34 $\mu\text{g L}^{-1}$, diclofenac 2.42 and 3.24 $\mu\text{g L}^{-1}$, ASA 1.56 and 2.45 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively. The methodology was applied in the characterization of samples of surface water (raw) and treated from catchment areas and water treatment basin of Paraíba do Sul were two distinct collections, September/2011 and November 2010 in the municipalities of Guararema, São José dos Campos, Taubaté and Pindamonhangaba. In 32,2% of all samples, five samples of 16 raw water samples, residues were found for paracetamol. The results were presented in a concentration range from 0.10 to 0.50 $\mu\text{g L}^{-1}$.

SUMÁRIO

| | |
|-----------------------|-----|
| Resumo..... | I |
| Abstract..... | II |
| Lista de tabelas..... | IV |
| Lista de figuras..... | VII |
| Introdução..... | 1 |

Capítulo 1: Revisão bibliográfica: Fármacos no ambiente aquático e sua determinação

| | |
|---|----|
| 1.1. Introdução..... | 8 |
| 1.2. Ocorrência de fármacos em ambientes aquáticos..... | 9 |
| 1.3. Fármacos residuais monitorados no Brasil..... | 14 |
| 1.4. Destino dos fármacos no meio ambiente..... | 15 |
| 1.5. Possíveis Efeitos de Fármacos no meio ambiente..... | 16 |
| 1.6. Métodos analíticos utilizados na determinação de fármacos..... | 17 |

Capítulo 2: Objetivos

| | |
|---------------------------------|----|
| 2.1. Objetivo..... | 19 |
| 2.2. Objetivos específicos..... | 19 |

Capítulo 3: Desenvolvimento de metodologia analítica e validação

| | |
|---|----|
| 3.1. Introdução | 22 |
| 3.2. Parte experimental – Materiais e Métodos | 26 |
| 3.2.1. Materiais | 26 |
| 3.2.1.1. Equipamentos | 26 |
| 3.2.1.2. Insumos | 27 |
| 3.2.1.3. Reagentes e Soluções | 28 |
| 3.2.1.4. Soluções padrões analíticos | 29 |
| 3.2.1.5. Amostras | 29 |
| 3.2.2. Metodologia | 30 |
| 3.2.2.1. Preparação da amostra | 30 |
| 3.2.2.2. Condições experimentais | 31 |
| 3.2.2.2.1. Métodos cromatográficos | 31 |
| 3.4. Validação | 41 |
| 3.4.1. Especificidade e seletividade | 42 |
| 3.4.2. Faixa de trabalho | 42 |
| 3.4.3. Linearidade | 43 |
| 3.4.4. Limite de detecção | 44 |
| 3.4.5. Limite de quantificação | 45 |
| 3.4.6. Exatidão | 45 |
| 3.4.7. Precisão | 46 |
| 3.4.8. Robustez | 46 |
| 3.4.9. Incerteza de medição | 47 |

Capítulo 4: Resultados e discussão da aplicação de ferramentas de análise multivariada para planejamento e validação de método

| | |
|---|----|
| 4.1. Desempenho analítico | 50 |
| 4.1.1. Especificidade e seletividade | 50 |
| 4.1.2. Faixa de trabalho e linearidade | 57 |
| 4.1.3 Limites de decisão e determinação | 60 |
| 4.1.4 Exatidão | 61 |
| 4.1.5 Precisão..... | 62 |
| 4.1.6 Robustez | 64 |
| 4.1.7 Incerteza de Medição | 66 |

Capítulo 5: Aplicação da metodologia em amostras de água bruta e tratada das águas do rio Paraíba do Sul

| | |
|---|----|
| 5.1. Área de estudo..... | 77 |
| 5.2. Análise quantitativa dos resíduos de fármacos no ambiente aquático | 80 |

Capítulo 6: Conclusões finais do estudo

| | |
|-----------------|----|
| Conclusão | 84 |
|-----------------|----|

| | |
|---|-----------|
| Referências bibliográficas | 85 |
|---|-----------|

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1: Revisão bibliográfica: Fármacos no ambiente aquático e sua determinação

| | |
|---|----|
| Tabela 1.1 Resumo das concentrações médias de fármacos detectados no meio ambiente..... | 10 |
|---|----|

Capítulo 3: Desenvolvimento de metodologia analítica e validação

| | |
|---|----|
| Tabela 3.1 Técnicas analíticas mais utilizadas na determinação de fármacos no ambiente aquático | 23 |
| Tabela 3.2. Características físico químicas dos fármacos..... | 23 |
| Tabela 3.3. Amostras de recuperações dos fármacos em água, após sistema de concentração em sistema de evaporação TurboVap..... | 30 |
| Tabela 3.4. Condições cromatográficas para determinação dos fármacos ácido acetil salicílico, diclofenaco de sódio, paracetamol, ibuprofeno e fenoprofeno | 40 |

Capítulo 4: Resultados e discussão da aplicação de ferramentas de análise multivariada para planejamento e validação de método

| | |
|--|----|
| Tabela 4.1. Avaliação dos parâmetros de tempo de retenção | 50 |
| Tabela 4.2. Amostras de recuperações dos fármacos em água após sistema de concentração em sistema de evaporação turboVap TM | 60 |
| Tabela 4.3. Dados de CC α e CC β | 61 |
| Tabela 4.4. Dados de recuperação dos fármacos | 62 |
| Tabela 4.5. Dados de precisão dos fármacos | 63 |
| Tabela 4.6. Dados de Precisão dos fármacos | 63 |
| Tabela 4.7. Dados de Precisão dos fármacos | 65 |
| Tabela 4.8. Fatores selecionados para estudo de robustez | 64 |
| Tabela 4.9. Fatores de resposta para a amostra de água tratada fortificada com 1 μ g L ⁻¹ de Paracetamol | 65 |
| Tabela 4.10. Dados de cálculo de incerteza de medição para a determinação do fármaco ácido acetil salicílico | 68 |
| Tabela 4.11. Dados de cálculo de incerteza de medição para a determinação do fármaco diclofenaco | 69 |
| Tabela 4.12. Dados de cálculo de incerteza de medição para a determinação do fármaco paracetamol | 69 |
| Tabela 4.13. Dados de cálculo de incerteza de medição para a determinação do fármaco ibuprofeno | 69 |
| Tabela 4.14. Dados de cálculo de incerteza de medição para a determinação do fármaco fenoprofeno | 70 |

| | |
|---|----|
| Tabela 4.15. Resumo dos parâmetros de validação do fármaco ácido acetil salicílico..... | 71 |
| Tabela 4.16. Resumo dos parâmetros de validação do fármaco paracetamol.. | 72 |
| Tabela 4.17. Resumo dos parâmetros de validação do fármaco diclofenaco ... | 73 |
| Tabela 4.18. Resumo dos parâmetros de validação do fármaco ibuprofeno | 74 |
| Tabela 4.19. Resumo dos parâmetros de validação do fármaco fenoprofeno .. | 75 |

Capítulo 5: Aplicação da metodologia em amostras de água bruta e tratada das águas do rio Paraíba do Sul

| | |
|--|----|
| Tabela 5.1. Resultados da análise dos resíduos de fármacos nas amostras de água bruta e tratada da região do Vale do Paraíba, referentes às coletas de 07 e 08/09/2010 e 03 e 04/11/2010 | 81 |
|--|----|

LISTAS DE FIGURAS

Capítulo 3: Desenvolvimento de metodologia analítica e validação

- Figura 3.1 Estrutura química dos fármacos de interesse neste estudo.....25
- Figura 3.2. Representação fotográfica do sistema de UPLC-MS/MS, utilizado para as análises deste trabalho.....26
- Figura 3.3. Espectros de massa carcterísticos do fármaco ácido acetil salicílico (Aspirina): a) íon precursor de massa/carga 136,60: b) íon produto da fragmentação do íon precursor 136,60<93,61. Modo de ionização negativo, padrão analítico de concentração 1mgmL⁻¹ em solução aquosa de água:metanol (1:1, v/v).35
- Figura 3.4. Espectros de massa carcterísticos do fármaco diclofenaco de sódio: a) íon precursor de massa/carga 319,05: b) íon produto da fragmentação do íon precursor 319,1<199,9. Modo de ionização positivo, padrão analítico de concentração 1µgmL⁻¹ em solução aquosa de água:metanol (1:1, v/v). 36
- Figura 3.5. Espectros de massa carcterísticos do fármaco aminoprofeno (Paracetamol): a) íon precursor de massa/carga 151.57: b) íon produto da fragmentação do íon precursor 151.57<109.72. Modo de ionização positivo, padrão analítico de concentração 1µgmL⁻¹ em solução aquosa de água:metanol (1:1, v/v).37

| | |
|--|----|
| Figura 3.6. Espectros de massa carcterísticos do fármaco ibuprofeno: a) íon precursor de massa/carga 205.13: b) íon produto da fragmentação do íon precursor 205.13<161.17. Modo de ionização negativo, padrão analítico de concentração 1µgmL ⁻¹ em solução aquosa de água:metanol (1:1, v/v). | 38 |
| Figura 3.7. Espectros de massa carcterísticos do fármaco ibuprofeno: a) íon precursor de massa/carga 196.74: b) íon produto da fragmentação do íon precursor 196.74<93.32. Modo de ionização negativo, padrão analítico de concentração 1µgmL ⁻¹ em solução aquosa de água:metanol (1:1, v/v)..... | 39 |

Capítulo 4: Resultados e discussão da aplicação de ferramentas de análise multivariada para planejamento e validação de método

| | |
|---|----|
| Figura 4.1. Cromatograma de uma amostra de água pura analisada pelo método 1, para os resíduos de Paracetamol e Diclofenaco..... | 51 |
| Figura 4.2. Cromatograma da solução aquosa de padrão de Paracetamol e Diclofenaco de Sódio na concentração de 1µg L ⁻¹ | 52 |
| Figura 4.3. Cromatograma da solução aquosa de padrão de Ácido Acetil Salicílico e Ibuprofeno na concentração de 1µg L ⁻¹ | 53 |
| Figura 4.4. Cromatograma da solução aquosa de padrão de Fenoprofeno na concentração de 1µg L ⁻¹ | 54 |

| | |
|--|----|
| Figura 4.5. Cromatograma de uma amostra de água do rio Paraíba do Sul, fortificada com padrão de Paracetamol na concentração de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ | 56 |
| Figura 4.6. Gráfico da faixa linear de trabalho para o fármaco Paracetamol | 57 |
| Figura 4.7. Gráfico da faixa linear de trabalho para o fármaco Diclofenaco de Sódio | 58 |
| Figura 4.8. Gráfico da faixa linear de trabalho para o fármaco Ácido Acetil Salicílico. | 58 |
| Figura 4.9. Gráfico da faixa linear de trabalho para o fármaco Ibuprofeno | 59 |
| Figura 4.10 Gráfico da faixa linear de trabalho para o fármaco Fenoprofeno ... | 59 |
| Figura 4.11. Gráficos das combinações das incertezas dos métodos 1 e 2..... | 66 |

Capítulo 5: Aplicação da metodologia em amostras de água bruta e tratada das águas do rio Paraíba do Sul

| | |
|--|----|
| Figura 5.1. Localização da área de estudo: A Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos da Bacia do Rio Paraíba do Sul UGRHI 2..... | 77 |
| Figura 5.2. Cromatogramas de uma amostra de água bruta contendo $0,20\mu\text{g L}^{-1}$ de Paracetamol..... | 82 |

INTRODUÇÃO

Fármacos podem ser definidos como substâncias química conhecidas, de estrutura química definida e usados para prevenir, diagnosticar e tratar doenças tanto na medicina humana como veterinária. São substâncias desenvolvidas para desempenhar um efeito biológico, com propriedades lipofílicas que os tornam capazes de passar por membranas e persistirem para não se tornarem inativos, antes de obter o efeito desejado (Almeida & Weber, 2005; Fent e colaboradores, 2006).

De acordo com a literatura (Mulroy, 2001), de 50% a 90% dos fármacos administrados são excretados na sua forma ativa ou metabólitos, e muitas vezes são lançados diretamente como descartes em águas superficiais. Esses fármacos e seus metabólitos se encontram no ambiente hídricos na forma de uma mistura complexa chamada de múltiplos resíduos de fármacos, e são considerados poluentes emergentes/persistentes, que até recentemente não eram vistos como potencialmente tóxicos.

Os efeitos desses resíduos sobre o meio aquático são difíceis de serem diagnosticados. Por estarem presentes como componentes de um mistura complexa, em baixas concentrações e com uma entrada contínua no meio podem, a longo prazo, provocar efeitos adversos nos seres humanos bem como em organismos não-alvos (Gros e colaboradores, 2006).

As baixas concentrações ambientais dos resíduos de fármacos e seus metabólitos, na faixa de concentração de ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$, associadas às matrizes ambientais complexas, como sedimentos, lodos de esgoto e águas superficiais,

necessitam que sejam desenvolvidas e validadas metodologias analíticas compatíveis.

A estratégia utilizada para desenvolver os procedimentos analíticos para a determinação desses compostos tem sido facilitada pela aplicação de metodologias semelhantes à análise de resíduos de agrotóxicos, compreendendo etapas de extração e pré-concentração, eliminação de interferentes, detecção e quantificação dos analitos (Suchara, 2007).

A cromatografia líquida e a cromatografia gasosa, dependendo das características físicas e químicas do analito, têm sido as ferramentas analíticas mais utilizadas para análise de fármacos em amostras ambientais. O sistema de detecção mais adequado e empregado para a análise de fármacos em amostras ambientais é a espectrometria de massas ou a espectrometria de massas em série (MS/MS). Sua utilização se deve a capacidade de identificar e quantificar os analitos, com alto grau de seletividade e sensibilidade, fornecendo informações de massa molecular bem como da estrutura do analito.

Considerando-se configurações específicas, a cromatografia líquida associada a espectrometria de massas permite desde a determinação de moléculas com baixas unidades de massa atômica (< 1000 u.m.a. ou Da) como fármacos, agrotóxicos e metabólitos até compostos biopolímeros com massas atômicas mais elevadas (Moracci, 2008).

A base da espectrometria de massas é a produção de íons, que são subsequentemente separados ou filtrados de acordo com a sua razão massa/carga (m/z) e detectados. Como resultado tem-se um gráfico da abundância relativa dos

íons produzidos em função da razão m/z. Dependendo da configuração consegue-se obter informações estruturais da molécula (Marques, 2005).

As técnicas cromatografia gasosa ou cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas ou a quadrupolos em sequência (CG/MS; GC/MS/MS; LC/MS; LC/MS/MS) tem se mostrado indispensáveis para realização de estudos de fármacos bioativos e produtos de higiene pessoal em matrizes ambientais, como mostra uma revisão de métodos analíticos para análise de resíduos farmacêuticos, publicada na “ Trends in analytical chemistry “ (Hao e colaboradores, 2007).

A cromatografia líquida (HPLC ou LC) apresenta várias vantagens sobre a cromatografia a gás para as análises de combinações orgânicas. As amostras não voláteis e termolábeis são, preferencialmente, analisadas por cromatografia líquida. Recentemente um novo conceito de cromatografia líquida baseado nas modificações dos parâmetros de fase estacionária (coluna) e aumento de pressão do sistema, possibilitou, no início de 2004, o primeiro sistema que comercialmente disponível denominado de cromatografia líquida de ultra performance ou ultra-alta pressão (Ultra-high Pressure Liquid Chromatography - UPLC).

Esse sistema, desenvolvido para a separação dos diversos compostos farmacêuticos relacionados a pequenas moléculas orgânicas, proteínas e peptídeos, foi patenteado pela Waters como ACQUITY UPLC™.

É uma técnica que combina a utilização de colunas mais curtas com partículas de diâmetro menor que 2 µm e uma instrumentação que permite operar a altas pressões da fase móvel. As altas pressões, variando de 6.000 a 15.000 PSI, possibilitam uma diminuição significativa do tempo de análise em comparação à cromatografia líquida convencional. A UPLC apresenta a habilidade de estender e

ampliar os processos de separação do sistema convencional. A nova química, ou melhor, a nanoquímica alinhada à nova tecnologia em instrumentação pode fornecer mais informações por unidade de trabalho, possibilitando um aumento de velocidade, resolução e sensibilidade predita pela cromatografia líquida (Swartz, 2005).

O desenvolvimento de metodologia analítica para a determinação de fármacos por UPLCTM em amostras ambientais foi o principal enfoque deste projeto de pesquisa, inserido no conjunto de objetivos que visa o melhor conhecimento da qualidade das águas de sistemas hídricos destinados ao abastecimento.

É preciso que se tenha metodologia cada vez mais precisa e sensível para detecção segura destes e outros compostos que interferem no meio ambiente.

O objetivo geral deste trabalho foi o desenvolvimento e a validação de metodologia analítica para quantificar produtos farmacêuticos, também denominados de disruptores endócrinos, em amostras ambientais aquáticas, que possam afetar a qualidade das águas de captação superficial e a qualidade da água potável, utilizando a cromatografia líquida de ultra-alta pressão (UPLC), acoplada a sistema de espectrometria de massas Tandem (MS/MS).

Para este estudo foram escolhidos os fármacos terapêuticos mais consumido pela população, pertencentes à classe dos agentes antiinflamatórios não esteróides, analgésicos e antipirético. Eles também formam um dos grupos de fármacos mais detectados em amostras de ambiente aquático, não só devido ao elevado consumo, mas pela sua grande solubilidade em água. Os salicilatos como o ácido acetil salicílico (AAS), derivados do p-aminofenicol (paracetamol); derivados propiônicos (ibuprofeno, naproxeno, fenoprofeno), derivados do ácido fenilacético (diclofenaco), entre outros. O AAS é um dos fármacos mais utilizados em todo

mundo, além de sua ação antiinflamatória é também indicado como inibidor plaquetário, sendo importante na terapia do infarto do miocárdio. O paracetamol (N – 4 - hidroxifenil acetamida) é um dos analgésicos e antipiréticos não narcóticos mais utilizados no mundo. O ácido 2, 6,diclorofenil-aminbenzenoacético, tem uso anti-reumático e antiinflamatório. O Ibuprofeno é um derivado do ácido 3-fenoxibenzenoacético que é também um dos fármacos mais utilizados no mundo inteiro.

Como área de estudo foi escolhida a Bacia Hidrográfica do Rio Paraíba do Sul pelo fato de ser uma região com densidade de ocupação significativa, atividade industrial diversificada e agricultura histórica. O principal usuário da água é o setor de irrigação em termos de volume de captação. A bacia é fortemente urbanizada e industrializada, dentro de um território quase completamente antrópico, com a Mata Atlântica original restrita a parques e reservas florestais. A Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (SABESP), Unidade de São José dos Campos, parceira no desenvolvimento deste trabalho, tem como foco conhecer o comportamento desses fármacos no sistema hídrico e nos processos de tratamento de águas por ela operados.

Este trabalho foi dividido em capítulos visando uma melhor organização e avaliação dos dados obtidos. Os capítulos estão apresentados da seguinte maneira:

Capítulo 1: Apresenta uma revisão bibliográfica relacionando os temas fármacos no ambiente aquático e sua determinação;

Capítulo 2: Aborda os objetivos gerais e específicos deste trabalho;

Capítulo 3: Descreve o desenvolvimento e a validação da metodologia analítica para a quantificação dos fármacos ácidos, padronização por adição, entre

eles o paracetamol, ácido acetil salicílico-AAS, diclofenaco de sódio fenoprofeno e ibuprofeno em amostras de água, superficial e tratada, utilizando cromatografia líquida de ultra-alta pressão, UPLC Acquity™, acoplada a um sistema de espectrometria de massas Tandem;

Capítulo 4: Desenvolvimento e Aplicação das ferramentas de análise multivariada para planejamento e validação de metodologia, demonstrando estatisticamente a qualidade dos dados gerados no processo analítico;

Capítulo 5: Descreve os estudos em matrizes ambientais, aplicando a metodologia em amostras de água, bruta e tratada, coletadas nas áreas de captação e nas estações de tratamento água (ETAS) da região da Bacia Hidrográfica do Rio Paraíba do Sul, identificando e quantificando as substâncias presentes, aplicando controle de qualidade analítico adequado para validação dos resultados;

Capítulo 6: Apresenta as conclusões finais do estudo.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: FÁRMACOS NO AMBIENTE AQUÁTICO E SUA DETERMINAÇÃO

1.1. INTRODUÇÃO

Recentemente, o monitoramento de fármacos residuais no meio ambiente vem ganhando grande interesse devido ao fato de muitas dessas substâncias serem frequentemente encontradas em efluentes de Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs) e águas naturais, em concentrações na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} . Stumpf e colaboradores (1999), relataram em seu estudo que a presença de fármacos residuais em águas superficiais pode ser um indicativo de contaminação por esgoto das ETEs. Após a administração, uma parte significativa dos fármacos é excretada por humanos no esgoto doméstico.

Estudos demonstram que várias dessas substâncias parecem ser persistentes no meio ambiente e não são completamente removidas nas ETEs. Sendo assim, muitos fármacos residuais resistem a vários processos de tratamento convencional de água. Em todo mundo, fármacos, tais como, antibióticos, hormônios, anestésicos, antilipêmicos, meios de contraste de raios-X, antiinflamatórios entre outros, foram detectados no esgoto doméstico, em águas superficiais e de subsolo.

Na Alemanha, 18 antibióticos foram identificados em efluentes de ETEs e águas superficiais (Hirsch e colaboradores, 1999). Os fármacos são desenvolvidos para serem persistentes, mantendo suas propriedades químicas o bastante para servir a um propósito terapêutico. Porém de 50% a 90% de uma dosagem do fármaco é excretado inalterado e persiste no meio ambiente (Mulroy, 2005).

O uso desenfreado de antibióticos acarreta dois problemas ambientais: um, é a contaminação dos recursos hídricos e o outro, é que alguns microorganismos criam resistência a esses fármacos. As bactérias podem fazer, e frequentemente o fazem,

mudanças no seu material genético, adquirindo resistência aos fármacos. Assim, uma bactéria presente em um rio que contenha traços de antibióticos pode adquirir resistência a essas substâncias.

Atualmente, existe uma preocupação no desenvolvimento de métodos analíticos suficientemente sensíveis na determinação dos fármacos residuais em ambientes aquáticos, com limites de detecção na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} .

1.2. OCORRÊNCIA DE FÁRMACOS EM AMBIENTES AQUÁTICOS

Algumas toneladas de medicamentos são produzidas por ano e aplicadas na medicina humana e veterinária. Geralmente, a produção exata não é publicada na literatura. A ocorrência de fármacos residuais no esgoto doméstico e águas naturais tem se tornado um importante tópico em estudos internacionais. Estudos demonstram que esses fármacos e seus metabólitos estão presentes em ambientes aquáticos em várias partes do mundo, como: Alemanha, Brasil, Canadá, Holanda, Inglaterra, Itália, Suécia, Estados Unidos e Reino Unido (Kolpin e colaboradores, 2002).

Investigações sobre a contaminação de diferentes ambientes aquáticos por fármacos residuais revelam que fármacos residuais estão presentes em faixas de concentrações de $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} . A Tabela 1.1 apresenta um resumo das concentrações médias de fármacos detectados no meio ambiente.

Tabela 1.1 – Resumo das concentrações médias de fármacos detectados no meio ambiente

| Substâncias | Classe das Substâncias | Concentrações médias no ambiente | Condições |
|-------------------------------|-------------------------------------|---|--|
| Ácido Acetilsalicílico | Analgésico | 0,22 $\mu\text{g L}^{-1}$ | Efluente de ETE/Alemanha |
| Ácido Clofibrato | Maior metabólico de 3 antilipêmicos | 0,36 $\mu\text{g L}^{-1}$ 0,066 $\mu\text{g L}^{-1}$ 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ 0,02 a 0,03 $\mu\text{g L}^{-1}$ 0,049 $\mu\text{g L}^{-1}$ 0,01 a 18 ng L^{-1} 1 a 9 ng L^{-1} | Efluente de ETE/Alemanha Água superficial/Alemanha Esgoto doméstico/Brasil Água superficial/Brasil Água superficial/Canadá Água superficial/Mar do Norte Água superficial/Suécia |
| Ácido Fenofibrato | Maior metabólico de 3 antilipêmicos | 0,38 $\mu\text{g L}^{-1}$ 0,45 $\mu\text{g L}^{-1}$ | Efluente de ETE/Alemanha Água superficial/Alemanha |
| Betaxolol | β -bloqueador | 0,057 $\mu\text{g L}^{-1}$ | Efluente de ETE/Alemanha |
| Bisoprolol | β -bloqueador | 0,057 $\mu\text{g L}^{-1}$ | Efluente de ETE/Alemanha |
| Bezafibrato | Antilipêmicos | 2,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ 0,35 $\mu\text{g L}^{-1}$ 1,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ | Efluente de ETE/Alemanha Água superficial/Alemanha Esgoto doméstico/Brasil |
| Bezafibrato | Antilipêmicos | 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ 0,025 $\mu\text{g L}^{-1}$ | Efluente de ETE/Brasil Água superficial/Brasil |
| Carbamazepina | Anticonvulsivante | 2,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ 0,25 $\mu\text{g L}^{-1}$ | Efluente de ETE/Alemanha Água superficial/Alemanha |
| Cetoprofeno | Antiinflamatório | 0,20 $\mu\text{g L}^{-1}$ | Efluente de ETE/Alemanha |
| Ciprofloxacina | Antibiótico | 0,02 $\mu\text{g L}^{-1}$ | Água natural/EUA |
| Clorotetraciclina | Antibiótico | 0,42 $\mu\text{g L}^{-1}$ | Água natural/EUA |

Tabela 1.1 – Continuação dos resumos das concentrações médias de fármacos detectados no meio ambiente

| | | | |
|------------------------------|-------------------------|--|--|
| Diazepam | Droga Psiquiátrica | 0,033 $\mu\text{g L}^{-1}$ 0,053 $\mu\text{g L}^{-1}$ | Efluente de ETE/Alemanha Água superficial/Alemanha |
| Diclofenaco | Antiinflamatório | 0,02 a 0,06 $\mu\text{g L}^{-1}$ 0,81 $\mu\text{g L}^{-1}$ 0,15 $\mu\text{g L}^{-1}$ 200-370 ng L^{-1} <1-12 ng L^{-1} 6,2 ng L^{-1} | Água superficial/Brasil Efluente de ETE/Alemanha Água superficial/Alemanha Efluente de ETE/Suécia Água superficial/Suécia Água superficial/Mar do Norte |
| Eritromicina | Antibiótico | 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ 0,15 $\mu\text{g L}^{-1}$ 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ | Água natural/EUA Água superficial/Alemanha Efluente de ETE/Alemanha |
| 17 α -Etinilestradiol | Hormônio | 0,005 $\mu\text{g L}^{-1}$ 0,001 $\mu\text{g L}^{-1}$ 0,45 $\mu\text{g L}^{-1}$ 0,009 $\mu\text{g L}^{-1}$ 0,073 $\mu\text{g L}^{-1}$ < 0,5 a 10 ng L^{-1} < 0,2 a 2,2 ng L^{-1} 0,2 a 7,0 ng L^{-1} 0,3 a 1,7 ng L^{-1} 4,5 ng L^{-1} 2 ng L^{-1} | Esgoto doméstico/Brasil Efluente de ETE/Alemanha Água superficial/Alemanha Efluente de ETE/Canadá Água natural/EUA Esgoto doméstico/Itália e Holanda Efluente de ETE/Itália e Holanda Efluente de ETE/Inglaterra Efluente de ETE/Itália Esgoto doméstico/Suécia Efluente de ETE/Suécia |
| 17 β -Estradiol | Hormônio | 0,015 $\mu\text{g L}^{-1}$ 0,006 $\mu\text{g L}^{-1}$ 0,021 $\mu\text{g L}^{-1}$ 0,009 a 0,16 $\mu\text{g L}^{-1}$ | Esgoto doméstico/Alemanha Efluente de ETE/Canadá Esgoto doméstico/Brasil Água natural/EUA Naturalmente excretado por uma mulher por dia |
| 17b-Estradiol | Hormônio | <0,5 a 17 ng L^{-1} <0,5 a 7 ng L^{-1} 2,7 a 48 ng L^{-1} 1,1 ng L^{-1} 0,5 ng L^{-1} | Esgoto doméstico/Itália e Holanda Efluente de ETE/Itália e Holanda Efluente de ETE/Inglaterra Esgoto doméstico/Suécia Efluente de ETE/Suécia |

Tabela 1.1 – Continuação dos resumos das concentrações médias de fármacos detectados no meio ambiente

| | | | |
|--------------|------------------------------|---|---|
| Estrona | Hormônio | 0,02 a 0,05 $\mu\text{g L}^{-1}$ 0,04 $\mu\text{g L}^{-1}$ 0,027 $\mu\text{g L}^{-1}$ 0,009 $\mu\text{g L}^{-1}$ 0,003 $\mu\text{g L}^{-1}$ 0,7 a 1,6 ng/L 0,027 $\mu\text{g L}^{-1}$ <0,5 a 38 ng L^{-1} <0,5 a 54 ng L^{-1} 20 a 132 ng L^{-1} 2,5 a 82,1 ng L^{-1} | Água superficial/Brasil Esgoto doméstico/Brasil Esgoto doméstico/Alemanha Efluente de ETE/Alemanha Efluente de ETE no Canadá Água superficial/Alemanha Água natural/EUA Esgoto doméstico/Itália e Holanda Efluente de ETE/Itália e Holanda Esgoto doméstico/Itália Efluente de ETE/Itália |
| Estrona | Hormônio | 6,4 a 29 ng L^{-1} 0,2 a 17 ng L^{-1} 5,8 ng L^{-1} 0,5 ng L^{-1} | Efluente de ETE/Alemanha Água natural/Inglaterra Esgoto doméstico/Suécia Efluente de ETE/Suécia |
| Estriol | Hormônio | 2 a 4 ng L^{-1} 1,2 a 3,1 ng L^{-1} 24 a 188 ng L^{-1} 0,43 a 18 ng L^{-1} 0,019 $\mu\text{g L}^{-1}$ | Efluente de ETE/Inglaterra Água natural/Inglaterra Esgoto doméstico/Itália Efluente de ETE/Itália Água natural/EUA |
| Indometacina | Antiinflamatório | 0,95 $\mu\text{g L}^{-1}$ 0,27 $\mu\text{g L}^{-1}$ 0,17 $\mu\text{g L}^{-1}$ | Esgoto doméstico/Brasil Efluente de ETE/Alemanha Águas superficial/Alemanha |
| Iopamidol | Meio de contraste de Raios-X | 4,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ 0,66 $\mu\text{g L}^{-1}$ 0,49 $\mu\text{g L}^{-1}$ | Esgoto doméstico/Alemanha Efluente de ETE/Alemanha Água superficial/Alemanha |
| Iopromida | Meio de contraste de Raios-X | 7,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ 0,75 $\mu\text{g L}^{-1}$ 0,10 $\mu\text{g L}^{-1}$ | Esgoto doméstico/Alemanha Efluente de ETE/Alemanha Água superficial/Alemanha |

Tabela 1.1 – Continuação dos resumos das concentrações médias de fármacos detectados no meio ambiente

| | | | |
|-------------------|------------------------------|---|--|
| Iomeprol | Meio de contraste de Raios-X | 1,6 a 0,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ 0,37 $\mu\text{g L}^{-1}$ 0,10 $\mu\text{g L}^{-1}$ | Esgoto doméstico/Alemanha Efluente de ETE/Alemanha Água superficial/Alemanha |
| Ibuprofeno | Antiinflamatório | 0,087 $\mu\text{g L}^{-1}$ 0,07 $\mu\text{g L}^{-1}$ 0,37 $\mu\text{g L}^{-1}$ 0,01 $\mu\text{g L}^{-1}$ 1 a 3,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ 2 a 81 ng L⁻¹ 1,5 a 7,8ng L⁻¹ | Água superficial/Canadá Águas superficiais/Alemanha Efluente de ETE/Alemanha Águas superficiais/Brasil Esgoto doméstico/Suécia Efluente de ETE/ Suécia Água superficial/ Suécia |
| Lincomicina | Antibiótico | 0,06 $\mu\text{g L}^{-1}$ | Água natural/EUA |
| Norfloxacina | Antibiótico | 0,12 $\mu\text{g L}^{-1}$ | Água natural/EUA |
| Oxitetraciclina | Antibiótico | 0,34 $\mu\text{g L}^{-1}$ | Água natural/EUA |
| Penicilina | Antibiótico | 1,8 a 5,9 ng L ⁻¹ | Água superficial/Alemanha |
| Progesterona | Hormônio | 0,11 $\mu\text{g L}^{-1}$ | Água natural/EUA |
| Propranolol | β -bloqueador | 0,17 $\mu\text{g L}^{-1}$ 0,012 $\mu\text{g L}^{-1}$ | Efluente de ETE/Alemanha Água superficial/Alemanha |
| Roxitrocina | Antibiótico | 0,05 $\mu\text{g L}^{-1}$ 0,68 a 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ 0,56 $\mu\text{g L}^{-1}$ | Água natural/EUA Efluente de ETE/Alemanha Água superficial/Alemanha |
| Sulfametoxazol | Antibiótico | 30 a 85 ng L ⁻¹ 300 a 1500 ng L ⁻¹ 0,006 a 0,15 $\mu\text{g L}^{-1}$ 410 ng L ⁻¹ 0,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ 0,03 $\mu\text{g L}^{-1}$ | Água superficial/Alemanha Efluente de ETE/Alemanha Água natural/EUA Água de subsolo/Alemanha Efluente de ETE/Alemanha Água superficial/Alemanha |
| Testosterona | Hormônio | 0,116 $\mu\text{g L}^{-1}$ | Água natural/EUA |
| Tetraciclina | Antibiótico | 0,11 $\mu\text{g L}^{-1}$ 1,2 a 4,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ | Água natural/EUA Água superficial/Alemanha |
| Trimetoprim | Antibiótico | 0,013 a 0,15 $\mu\text{g L}^{-1}$ 0,32 a 0,66 $\mu\text{g L}^{-1}$ 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ 0,15 $\mu\text{g L}^{-1}$ | Água natural/EUA Efluente de ETE/Alemanha Efluente de ETE/Alemanha Água superficial/Alemanha |
| Tilosina | Antibiótico | 0,04 $\mu\text{g L}^{-1}$ | Água natural/EUA |
| Vancomicina | Antibiótico | 0,7 a 3,8 $\mu\text{g L}^{-1}$ | Água superficial/Alemanha |

BILA, D. M.; DEZOTTI, M.; Fármacos no meio ambiente. Quim. Nova, V. 26, n° 4, p. 523-530, 2003

1.3. FÁRMACOS RESIDUAIS MONITORADOS NO BRASIL

Algumas toneladas de medicamentos são produzidas por ano e aplicadas na medicina humana e veterinária. Geralmente, a produção exata não é publicada na literatura. A ocorrência de fármacos residuais no esgoto doméstico e águas naturais foram um importante tópico em 1997, antilipêmicos, antiinflamatórios e alguns metabólitos foram detectados em esgoto, em efluente de ETE's e em águas de rios no estado do Rio de Janeiro. (Stumpf e colaboradores, 1999). A concentração média, nos efluentes das ETE's, da maioria dos fármacos investigados esteve na faixa de 0,1 a 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Nos rios, as concentrações médias situaram-se entre 0,02 e 0,04 $\mu\text{g L}^{-1}$, como consequência da remoção incompleta dos fármacos durante sua passagem pelas ETE's e pelo descarte de esgoto *in natura*. A taxa de remoção de fármacos individuais durante a passagem pelas ETE's variou de 12 a 90%.

Em outro estudo também relacionado ao Brasil, foram encontrados estrogênios naturais e contraceptivos sintéticos na ETE da Penha/RJ. Em esgoto bruto, os estrogênios 17 β -estradiol e estrona foram detectados nas concentrações de 0,021 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 0,04 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. As taxas de remoção de estrona observadas foram de 67% para o efluente tratado em filtro biológico e 83% para o efluente tratado pelo processo de lodos ativados. Para o 17 β -estradiol, estas taxas foram de 92 e 99,9% para o efluente tratado em filtro biológico e para o efluente tratado pelo processo de lodos ativados, respectivamente. Para o estrogênio contraceptivo 17 α -etinilestradiol, as taxas de remoção na ETE foram de 64 e 78% para o efluente do filtro biológico e para o efluente do tanque de lodo ativado. (Ternes e colaboradores. 1999).

1.4. DESTINO DOS FÁRMACOS NO MEIO AMBIENTE

Geralmente, os fármacos são absorvidos pelo organismo e estão sujeitos a reações metabólicas. Entretanto, uma quantidade significativa dessas substâncias originais e seus metabólitos são excretados na urina, fezes ou esterco animal, sendo freqüentemente encontrados no esgoto doméstico. Nas ETEs há três destinos possíveis para qualquer fármaco individual: 1.pode ser biodegradável, ou seja, mineralizado a gás carbônico e água, como por exemplo, o ácido acetilsalicílico; 2. pode passar por algum processo metabólico ou ser degradado parcialmente, como as penicilinas; 3.pode ser persistente como o clofibrato, que é um antilipêmicos. (Richardson e colaboradores, 1985).

Pouco se conhece sobre as rotas dos fármacos no meio ambiente. Um caminho de fármacos residuais no ambiente aquático pode ser devido ao esterco ser usado como fertilizantes e, dessa forma, ocorre a contaminação das águas de subsolo. Outra contaminação pode ser devido ao uso do lodo digestivo proveniente das ETEs na agricultura. Os antibióticos são usados como promotores de crescimento na produção de gado, na produção avícola e são intensivamente usados como aditivos de alimento de peixe na aquicultura e criação de porcos. Sendo assim, podem contaminar o solo, águas de subsolo e superficiais. Devido ao uso na cultura de peixes, alguns antibióticos como o cloranfenicol e o oxitetraciclina são detectados em sedimentos de origem marinha.

Outra fonte de contaminação ambiental que tem sido observada é consequente da disposição de resíduos provenientes de indústrias farmacêuticas em aterros sanitários, contaminando as águas de subsolo nas cercanias do aterro.

1.5. POSSÍVEIS EFEITOS DE FÁRMACOS NO MEIO AMBIENTE

A ocorrência de fármacos residuais no meio ambiente pode apresentar efeitos adversos em organismos aquáticos e terrestres. O efeito pode ser em qualquer nível da hierarquia biológica: célula - órgãos - organismo - população - ecossistema, alguns desses efeitos podem ser observados em concentrações na ordem de ng L^{-1} . Pouco é conhecido sobre o destino e o comportamento dessas substâncias no ambiente aquático, assim como não está claro quais organismos são afetados e em que grau (Bila e Dezotti, 2003).

Os antibióticos têm diferentes efeitos sobre o meio ambiente, e um deles é a contribuição no desenvolvimento de bactérias resistentes, assunto que tem sido largamente discutido. Há indícios de que o desenvolvimento de resistência antibiótica é favorecido por baixas concentrações (Bila e Dezotti, 2003).

(Ueda.J, Taverano e colaboradores, 2009).

Atualmente, dois tópicos sobre o efeito desses fármacos no meio ambiente são os mais discutidos. O desenvolvimento de resistência bacteriana aos antibióticos e avaliações de perturbações no sistema endócrino por substâncias como estrogênios. Outros efeitos possíveis têm sido muito discutidos (Ueda.J, Taverano e colaboradores, 2009).

A conscientização e responsabilidade quanto a destino dos medicamentos utilizados pela população estão cada vez mais sendo abordados. Recentemente novas regulamentações para o gerenciamento dos resíduos de medicamentos foram a consulta pública e entraram em vigor (ANVISA, 2009).

1.6. MÉTODOS ANALÍTICOS UTILIZADOS NA DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS

Para a determinação de fármacos, diferentes métodos analíticos são reportados na literatura, os quais são principalmente válidos para matrizes biológicas como sangue, tecido e urina, sendo que algumas modificações nestes métodos podem ser suficientes para amostras ambientais. No entanto, a análise de fármacos residuais em efluentes de ETE, em águas de rios, de solos e água potável requer ainda o desenvolvimento de métodos mais sensíveis para a detecção de concentrações na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} .

Nos últimos anos, muitos métodos (Hao e colaboradores, 2007) para a análise de fármacos em amostras de águas foram publicados, tais como para antilipêmicos, β -bloqueadores e antiinflamatórios e alguns na determinação de antibióticos, estrogênios e drogas psiquiátricas. Para detecção de fármacos residuais em ambiente aquático na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} , os métodos descritos na literatura são baseados na extração em fase sólida, em alguns casos derivatização da substância ácida e subsequente determinação do derivado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/MS) ou cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (HPLC/MS). A detecção por espectrometria de massas é usada para assegurar a identificação das substâncias estudadas (Ternes, 1999).

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

2.1. Objetivo

O objetivo deste trabalho foi o de desenvolver e validar uma metodologia analítica para a quantificação de múltiplos resíduos dos fármacos ácidos em água, entre eles o paracetamol, ácido acetil salicílico, diclofenaco de sódio, fenoprofeno e ibuprofeno, utilizando a técnica cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massas Tandem (UPLC-MS/MS).

2.2. Objetivos Específicos

- Desenvolver a metodologia para a identificação e quantificação dos compostos ácido acetil salicílico, paracetamol, diclofenaco, fenoprofeno e ibuprofeno em águas superficiais por UPLC-MS/MS.
- Validar a metodologia e quantificação dos compostos quanto à exatidão, precisão, linearidade, limite de quantificação e detecção, garantindo que os resultados apresentados são confiáveis e adequados à qualidade pretendida;
- Aplicar a metodologia para caracterizar os níveis atuais de poluição orgânica quanto a presença desses resíduos de fármacos em amostras de águas provenientes de áreas de captação de água para abastecimento público e de estações de tratamento de água, operadas pela Sabesp. Foram coletadas amostras de água provenientes da bacia hidrográfica do

Rio Paraíba do Sul (UGRHI 2) nos municípios de Guararema, São José dos Campos, Taubaté e Pindamonhangaba.

CAPÍTULO 3

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA E VALIDAÇÃO

3.1. INTRODUÇÃO

A cromatografia é uma ferramenta analítica de separação e identificação de compostos químicos muito utilizada. A grande variedade de combinações entre as duas fases de uma análise cromatográfica, fase móvel e estacionária, faz com que a cromatografia tenha uma série de técnicas diferenciadas.

As cromatografias líquida de alta performance (HPLC) e a gasosa (CG), reúnem um grande número de publicações de metodologias para análises de resíduos de fármacos.

A maioria dos fármacos também é altamente solúvel em água. Isto se opõe à aplicação de simples uso de purificação “cleanup” e pré concentração e de métodos convencionais, associados à cromatografia gasosa (CG), sugerindo o uso da cromatografia líquida.

Os métodos mais recentes utilizam a HPLC e a CG acopladas a espectrometria de massas (MS) para a determinação e quantificação dos resíduos de fármacos em água.

A espectrometria de massas (MS) é uma técnica largamente utilizada pelos químicos na análise de moléculas de diversas massas molares e em baixas concentrações desde μg até pg . A grande sensibilidade da técnica faz com que seja rotineiramente usada na análise de substâncias de baixa concentração, como no caso do *doping*, controle de resíduos em alimentos e medicamentos, contaminação ambiental, entre outras aplicações.

O potencial de aplicação da MS em estudos biológicos tem sido bastante estendido, em razão dos impressionantes avanços observados nos últimos anos nas

áreas de genômica, de transcriptômica, de metabolômica, de proteômica, de lipidômica e de outras plataformas “*omics*”, e do desenvolvimento extraordinário dos equipamentos (Hoffmann e Strootbart, 2007; Feng e colaboradores, 2008). A MS é atualmente a técnica de escolha para identificação de proteínas e para estudo de modificações proteicas pós-traducionais (MPTs) em diferentes condições fisiológicas. Além disso, a MS vem sendo utilizada no monitoramento e na caracterização de diversos processos industriais, tais como processos fermentativos (Royce, 1993) e até mesmo análise de microorganismos intactos (Claydon e colaboradores, 1996; Fenselau e Demirev, 2001).

Na Tabela 3.1 é apresentado um resumo dos métodos mais utilizados na determinação de fármacos no ambiente aquático.

Tabela 3.1. Técnicas Analíticas mais utilizadas na determinação de fármacos no ambiente aquático.

| Técnicas | Substância |
|------------|--|
| HPLC/MS | Ácido salicílico, antiinflamatórios e antilpêmicos Ácido clofibrico, antibióticos, antilpêmicos, antiinflamatórios, anticonvulsivantes Antibióticos |
| HPLC-MS/MS | Antibióticos Analgésicos, β -bloqueadores, antilpêmicos, antibióticos Antiinflamatórios, drogas psiquiátricas e antidiabéticas β -bloqueadores, antibióticos Antibióticos |
| CG/MS | Analgésicos, antilpêmicos e metabólitos, antiinflamatórios. Analgésicos, antipiréticos, antiinflamatórios, antilpêmicos, anticonvulsivantes drogas psiquiátricas Estrogênios Ácido Clofibrico, antiinflamatórios, anticonvulsivantes |
| CG-MS/MS | Antiinflamatórios, anticonvulsivantes, ácido salicílico, ácido clofibrico, antilpêmicos. β -bloqueadores, drogas psiquiátricas Estrogênios |

Fonte: BILA & DEZOTTI, 2003.

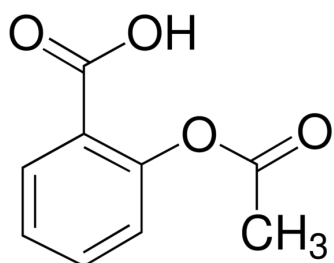
Na Tabela 3.2 são apresentados as características físico-químicas dos fármacos de interesse neste estudo.

Tabela 3.2 Características físico-químicas dos fármacos de interesse neste estudo

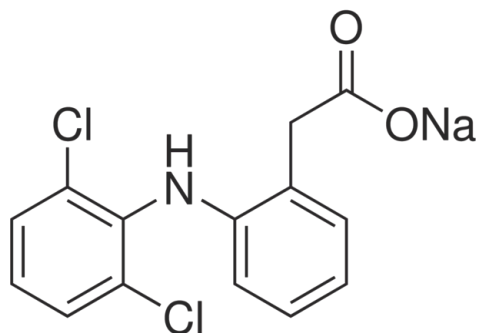
| Fármaco | CAS | Grupo | Fórmula | MM | pKa |
|-------------------------|------------|---|-------------------------|-------|-----|
| ácido acetil salicílico | 50-78-2 | Analgésico, antiinflamatório e antipirético | $C_9H_8O_4$ | 180,2 | 3,6 |
| Diclofenaco de sódio | 15307-79-6 | Antiinflamatório | $C_{14}H_{10}Cl_2NaO_2$ | 318,1 | 4,2 |
| Paracetamol | 103-90-2 | Analgésico e antitérmico | $C_8H_9NO_2$ | 151,2 | 9,5 |
| Ibuprofeno | 15687-27-1 | Analgésico, antiinflamatório e antipirético | $C_{13}H_{18}O_2$ | 206,3 | 4,4 |
| Fenoprofeno | 31879-05-7 | Analgésico, antiinflamatório e antipirético | $C_{15}H_{14}O_3$ | 242,3 | 4,5 |

Referência: CAS: www.sigmaaldrich.com

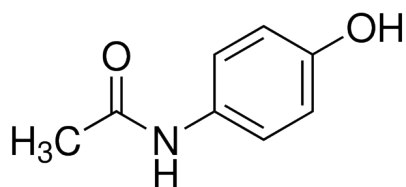
As fórmulas estruturais dos fármacos encontram-se na Figura 3.1.



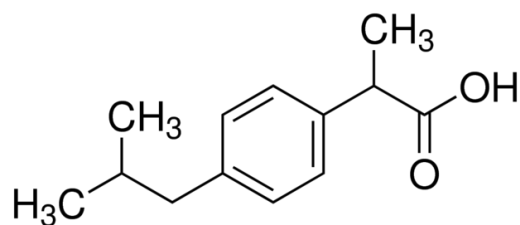
Ácido Acetil Salicílico



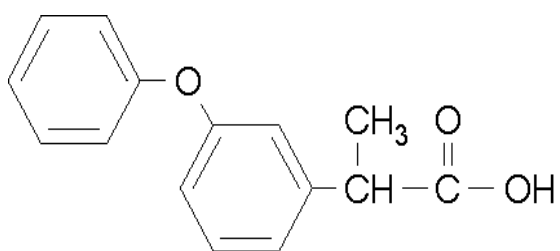
Diclofenaco de sódio



Paracetamol



Ibuprofeno



Fenopropfeno

Figura 3.1: Estrutura química dos fármacos de interesse neste estudo
Referência das Estruturas Moleculares: www.sigmaaldrich.com

3.2. PARTE EXPERIMENTAL- MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1.MATERIAIS

3.2.1.1. EQUIPAMENTOS

Para identificação e quantificação dos fármacos, foi utilizado um sistema cromatográfico Waters composto de um cromatógrafo líquido de ultra performance (UPLC™), modelo Aquilty, acoplado a um espectrômetro de massas tipo tandem, modelo Premier XE. A figura 3.2 ilustra o sistema utilizado.

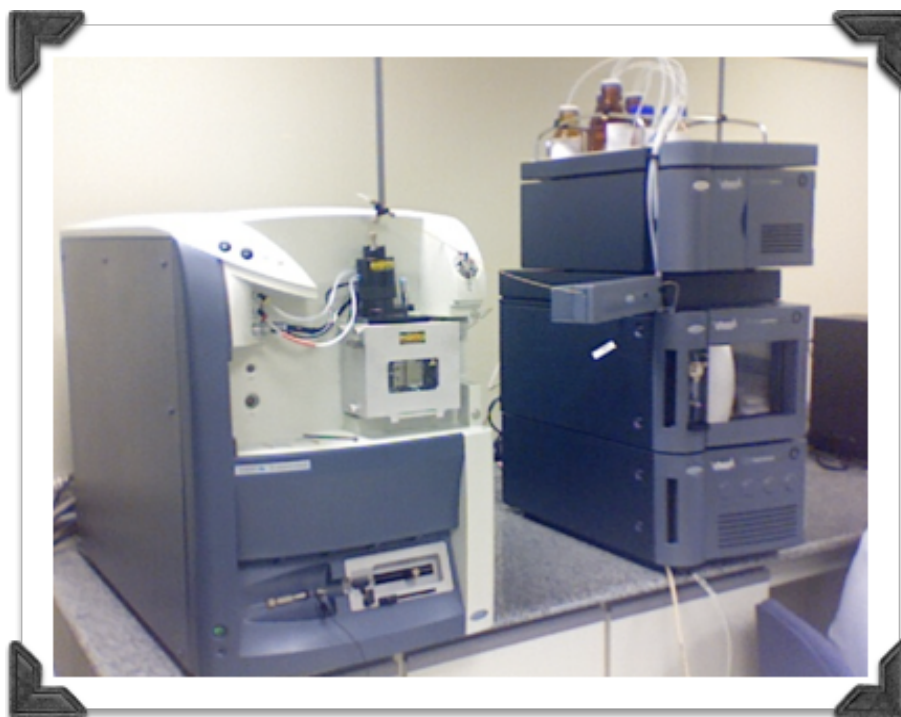


Figura 3.2: Representação fotográfica do sistema de UPLC-MS/MS, utilizado para as análises deste trabalho.

Foram realizados também estudos de concentração das amostras. Para estes estudos foi utilizado um equipamento de concentração de amostras da marca

TurboVap modelo LV 200. Esse concentrador permite a evaporação da amostra através de um fluxo de nitrogênio que acelera o processo de evaporação e minimiza o dano aos analitos de interesse. Com o sistema “vortex shearing TM”, o Nitrogênio é injetado individualmente nos tubos e a temperatura é controlada através do banho de água associado. No final do processo optou-se pela detecção de endpoint onde foi possível interromper a evaporação antes que a amostra fosse levada à secura permitindo que 0,5 da água fosse recuperado. Em uma revisão de métodos analíticos disponível, utilizados na determinação de vários fármacos residuais, a níveis de ng L⁻¹, vários sistemas de concentração de amostras são utilizados, incluindo o sistemas de TurboVap em diferentes matrizes aquosas. (Ternes, 1999).

3.2.1.2. INSUMOS

Os reagentes e insumos utilizados no desenvolvimento da metodologia analítica estão listados a seguir:

- Acetato de amônio P.A (Merck);
- Acetonitrila grau HPLC (Mallinckrodt);
- Água para cromatografia, marca Lichrosolv (Merck);
- Ácido Fórmico P.A (Merck);
- Balões volumétricos de 5,10,25,50 e 100mL;
- Coluna cromatográfica BEH C18 (50 X 2,1,mm d.i.) com partículas de 1,7 mm de diâmetro;

- Filtros millex 0,45mm Ø 15 mm (Millipore);
- Membrana para filtro Millipore para misturas aquosas e solventes orgânicos, tipo GVWP (0,45 mm), Ø 47 mm (Millipore);
- Metanol grau HPLC (Mallinckrodt);
- Micropipeta automática, 1-100 µL;
- Micropipeta automática, 100 -1000 µL;
- Ponteiras para pipeta automática , 100-1000 µL;
- Tubo de ensaio, 5 mL.

3.2.1.3. REAGENTES E SOLUÇÕES

A fase móvel foi preparada com solução aquosa / orgânica de água:metanol (1:1, v/v), com aditivos de ácido fórmico para o método de ionização no modo positivo e acetato de amônio para o método de ionização no modo negativo.

A adição de ácido fórmico ou de acetato de amônio permite a protonação ou desprotonação das moléculas orgânicas. Na ESI-MS, os íons são obtidos por meio da protonação ou desprotonação de moléculas neutras, ou ainda pela adição de outros íons, como Na⁺, K⁺, NH⁴⁺ e Cl⁻, com formação de íons denominados adutos. As espécies observadas são, portanto, denominadas espécies protonadas [simbolizadas por (M +H)⁺], espécies desprotonadas [simbolizadas por (M – H)⁻] ou íons adutos [de sódio, simbolizados por (M + Na)⁺ ou de potássio (M + K)⁺, por exemplo (Chapman,1993).

3.2.1.4. SOLUÇÕES PADRÕES ANALÍTICOS

- Acetamifeno (Sigma Aldrich) lote - 117K0017;
- Aspirina (Sigma Aldrich) lote - 116K0064;
- Diclofenaco de Sódio (Sigma Aldrich) lote - 037K1588;
- Fenoprofeno (Sigma Aldrich) lote - 068K1040;
- Ibuprofeno – (Sigma Aldrich) lote - 026H1368.

As soluções estoque dos padrões analíticos foram preparadas nas concentrações de $1\mu\text{g mL}^{-1}$ de cada fármaco em metanol. As soluções diluídas dos padrões estoque foram preparadas na solução de água:metanol (1:1, v/v). Todos os padrões foram preparados no momento do uso.

3.2.1.5. AMOSTRAS

Para a validação do método foram utilizadas amostras de água mineral água para cromatografia ultra pura e amostras de águas bruta e tratada da região do Vale do Paraíba.

As amostras de água mineral foram adquiridas no mercado local.

As amostras de água para cromatografia ultra pura foram da marca Lichrosolv e adquiridas da empresa Merck.

As amostras de água bruta e tratada foram coletadas pela equipe do laboratório CQMA e da SABESP, nas estações de captação e de tratamento de água da região do Vale do Paraíba.

3.2.2. MÉTODOLOGIA

3.2.2.1. PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

A condição de preparação das amostras utilizada, adaptada de vários trabalhos em literatura, entre eles (Hilton,2003) e (Thomaz, 2003), foi a concentração e diluição das amostras em mistura aquosa de solvente orgânico, composta de água própria para cromatografia, misturada à metanol.

As amostras de água foram filtradas em papel de filtro qualitativo, diluídas em metanol, na proporção de 1:1, v/v e em seguida filtradas em filtros millex de porosidade de 0,45µm.

Também foram preparadas amostras de água que passaram por sistema de concentração em equipamento tipo “Turbo Vap”. Um volume de 10mL de água foi concentrado e reconstituído para 1mL da mistura de água:metanol (1:1,v/v).

Injetou-se 20µL das amostras acima preparadas no sistema de UPLC-MS/MS.

3.2.2.2. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

3.2.2.2.1. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Esta parte do projeto visa avaliar a inovação de troca de uso do cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) pelo sistema de ultra performance (UPLC™). O objetivo foi testar o uso do sistema de ultra performance, com o sistema pressurização até 15000psi.

A metodologia usual aplicada pela literatura para a determinação dos fármacos consiste em submeter amostras à filtração (filtro Millipore de 0,45µm), concentração em extração em fase sólida (SPE) ou extração com solvente e posterior análise por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) ou por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizando-se uma coluna de C₁₈.

Para a determinação de fármacos, diferentes métodos analíticos são reportados na literatura, os quais são principalmente válidos para matrizes biológicas como sangue, tecido e urina, sendo que algumas modificações nestes métodos podem ser suficientes para amostras ambientais.

A metodologia desenvolvida neste trabalho consiste basicamente na utilização da técnica de UPLC, acoplada a espectrometria de massas tipo tandem. Para as amostras de água utilizou-se a técnica de concentração das amostras e diluição da água com a mistura de água: metanol (1:1, v/v). A água diluída, foi filtrada em membrana de 0,45µm, para posterior análise pela técnica UPLC acoplada a espectrometria de massas.

Soluções padrão dos fármacos nas concentrações de 200 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram preparadas dissolvendo em água ultra-pura e metanol. Soluções padrão intermediárias foram preparadas por diluições sucessivas da solução estoque, contendo todos os compostos de interesse. Todas as soluções padrões preparadas foram mantidas no congelador e na ausência de luz. As soluções padrão diluídas foram preparadas no ato do estudo.

Após a calibração do equipamento tanto no modo negativo quanto no positivo obteve-se um espectro de massas no modo “selective reaction monitoring” (SRM) detectando um SRM de transição para cada composto na concentração de $1\mu\text{g L}^{-1}$. Em seguida, selecionou-se um espectro de massas MS/MS para se conhecer os íons produzidos por cada um dos compostos e para determinar o melhor par iônico e as melhores condições dos parâmetros para detecção de cada composto.

Os fármacos foram analisados e quantificados inicialmente separadamente e depois em conjunto de acordo com a afinidade dos fármacos para os métodos multielementares. Onde se estabeleceu as melhores condições cromatográficas para a separação e quantificação. Para os parâmetros de validação foram utilizadas soluções padrão preparadas em água/metanol (Vertzoni e colaboradores, 2003).

A identificação foi realizada combinando-se informações obtidas pelos tempos de retenção, por fragmento dos íons específicos e cromatogramas em Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM).

Duas metodologias distintas foram estudadas. As condições cromatográficas foram as mesmas para os fármacos paracetamol e diclofenaco de sódio analisados simultaneamente, denominado “método 1”, onde a quantificação foi realizada no espectrômetro de massas no modo de ionização positivo. Os fármacos ácido acetil

salicílico, ibuprofeno e fenoprofeno foram otimizados utilizando-se outro método cromatográfico, denominado de “método 2”, no qual estes foram analisados simultaneamente, sendo a quantificação no espectrômetro de massas no modo de ionização negativo.

A fase móvel para determinação dos fármacos paracetamol e diclofenaco de sódio foi preparada adicionando-se 500mL de água ultra pura em um béquer de 1L, 500mL de metanol e 1 mL de ácido fórmico.

Para os fármacos ácido acetil salicílico, ibuprofeno e fenoprofeno foi preparada a fase móvel, adicionando-se 500mL de água ultra pura em um béquer de 1L, 500mL de metanol e 0,77g de acetato de amônio.

Alternativamente utilizou-se uma fase móvel contendo acetonitrila ao invés de metanol. Observou-se melhor separação com o metanol que foi o solvente de eleição para as fases móveis, para este estudo.

A seleção da coluna cromatográfica foi baseada na indicação da Waters Inc, fabricante das colunas próprias para o sistema de UPLCTM Aquilty. Foram avaliadas as colunas de fase reversa BEH C18 (50 X 2.1,mm d.i.) e BEH C18 (100 x 2.1, mm d.i.) ambas com partículas de 1.7 μm de diâmetro. As colunas de menor comprimento ofereceram a mesma seletividade e eficiência que as colunas de maior tamanho. Desta forma optou-se pelo uso da coluna de 50mm para a separação de todos os fármacos deste estudo.

As condições do espectrômetro de massas utilizadas na identificação e quantificação dos fármacos, foram adaptadas de vários trabalhos de literatura, entre eles Sacher e colaboradores (2001) e Hilton (2003), utilizando o detector de massas tipo tandem, em MRM, permitindo a quantificação de todos os fármacos em duas

corridas cromatográficas. Foram preparados os dois métodos cromatográficos, o “método 1” com a ionização de eletrospray em modo positivo determinando os fármacos diclofenaco de sódio e paracetamol (aminoprofeno) e o método cromatográfico 2 com a ionização de eletrospray em modo negativo, determinando os fármacos ácido acetil salicílico, ibuprofeno e fenoprofeno.

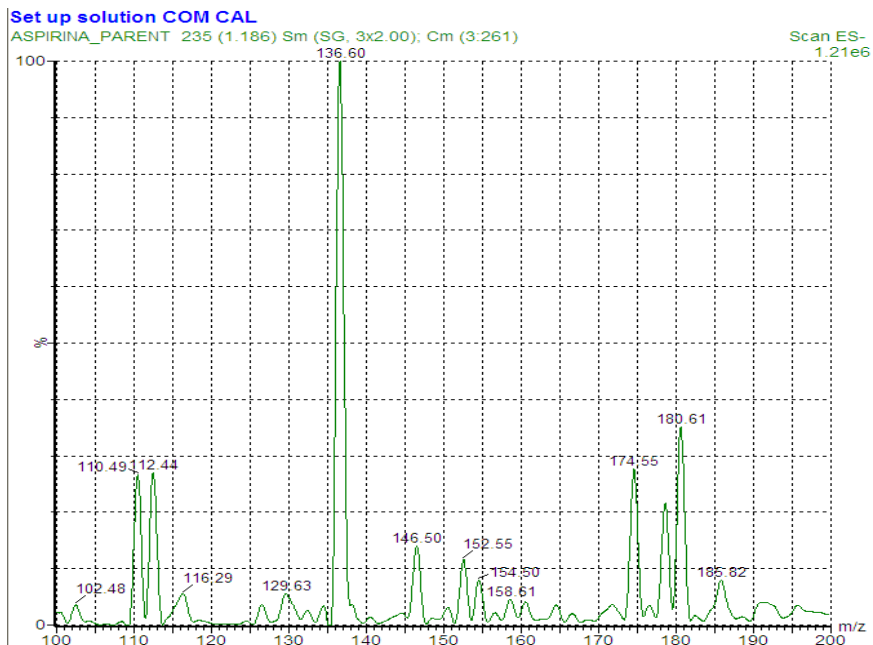
A cada análise foram injetados os padrões e, após a calibração dos métodos foram injetadas as amostras. Às garrafas de limpeza do sistema de UPLC foram adicionadas as misturas de água e metanol para limpeza entre as injeções. Não foram observados resíduos dos fármacos entre as injeções de padrões analíticos, portanto o sistema de limpeza do cromatógrafo foi considerado eficiente.

A otimização dos canais de massas para cada fármaco, foi realizada injetando-se soluções dos padrões analíticos em fase aquosa metanol:água (1:1, v/v), diretamente no espectrofotômetro de massas, pelo sistema de injeção da bomba de infusão.

Cada molécula de fármaco teve sua massa/carga inserida no espectrômetro de massas e de acordo com a calibração do equipamento suas massas foram ajustadas com precisão e seus precursores (parents) foram selecionados para o método. Cada molécula teve sua detecção otimizada no modo negativo ou positivo de acordo com a melhor detecção e sensibilidade na fonte de eletrospray. Após a etapa de identificação dos precursores de cada molécula, foram avaliadas as fragmentações e os íons produtos (daughters) foram selecionados.

Nas figura 3.3; 3.4; 3.5; 3.6 e 3.7, estão demonstrados os canais de massas selecionados para os íons dos fármacos respectivamente: ácido acetil salicílico, diclofenaco de sódio, paracetamol, ibuprofeno e fenoprofeno.

a)



b)

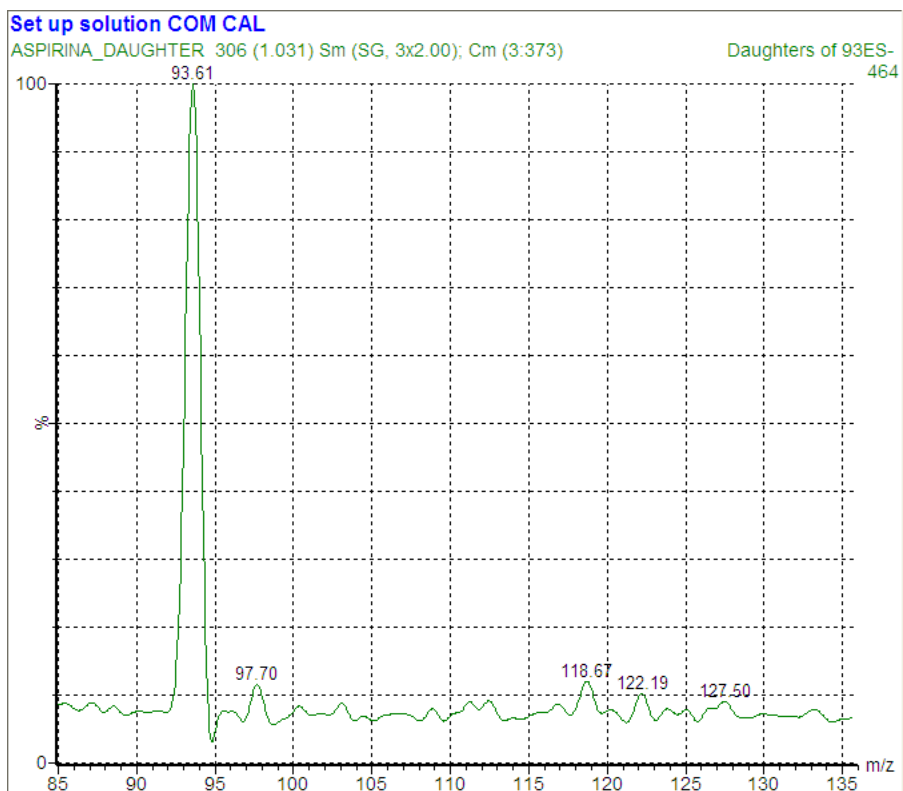
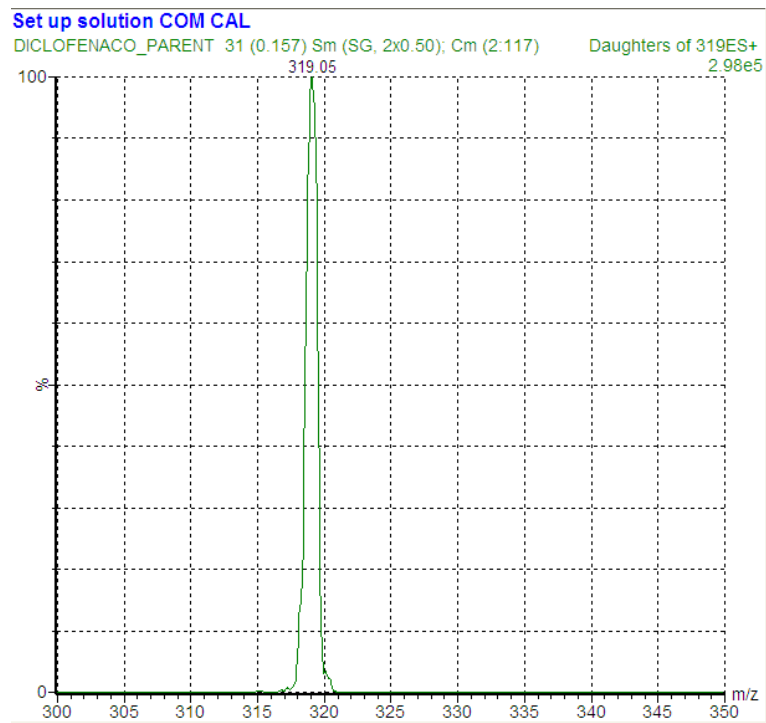


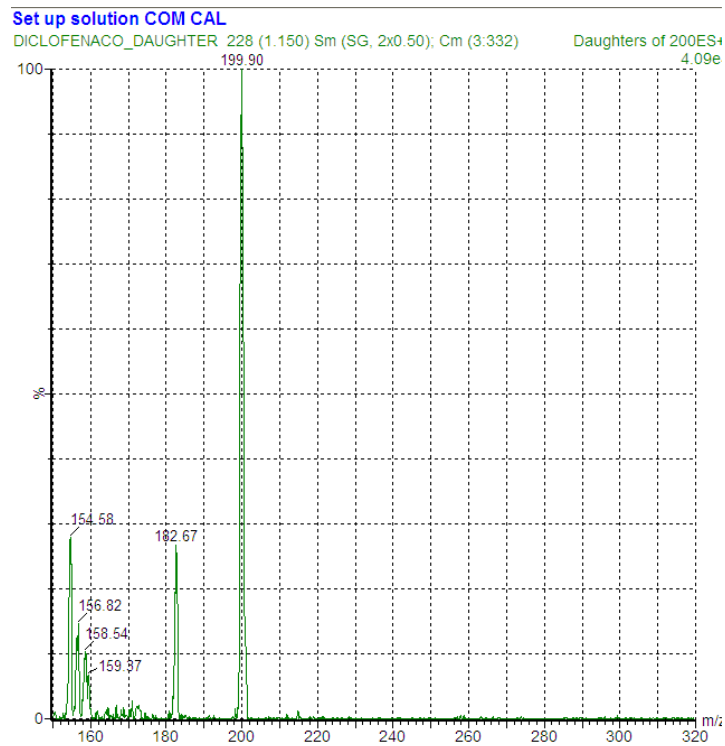
FIGURA 3.3: Espectros de Massas característicos do fármaco ácido acetil salicílico (Aspirina): a) íon precursor de massa/carga 136.60:

b) íon produto da fragmentação do íon precursor 136.60 < 93.61.

Modo de ionização negativo, padrão analítico de concentração $1\mu\text{gL}^{-1}$ em solução aquosa de água:metanol (1:1, v/v).



a)



b)

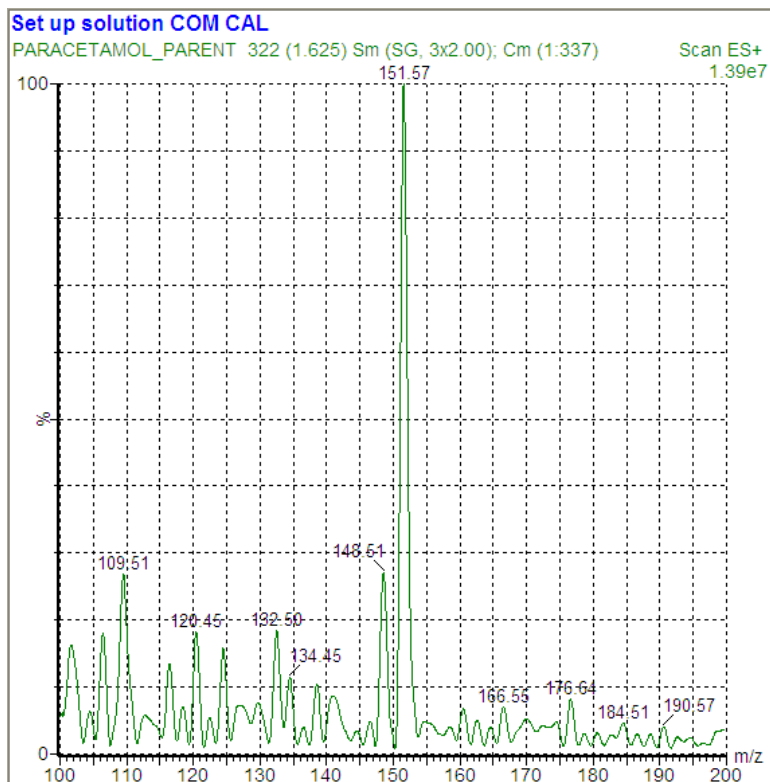
FIGURA 3.4: Espectros de Massas característicos do fármaco diclofenaco de sódio:

a) íon precursor de massa/carga 319.1;

b) íon produto da fragmentação do íon precursor 319.1 < 199.9.

Modo de ionização positivo, padrão analítico de concentração $1\mu\text{g L}^{-1}$ em solução aquosa de água:metanol (1:1, v/v).

a)



b)

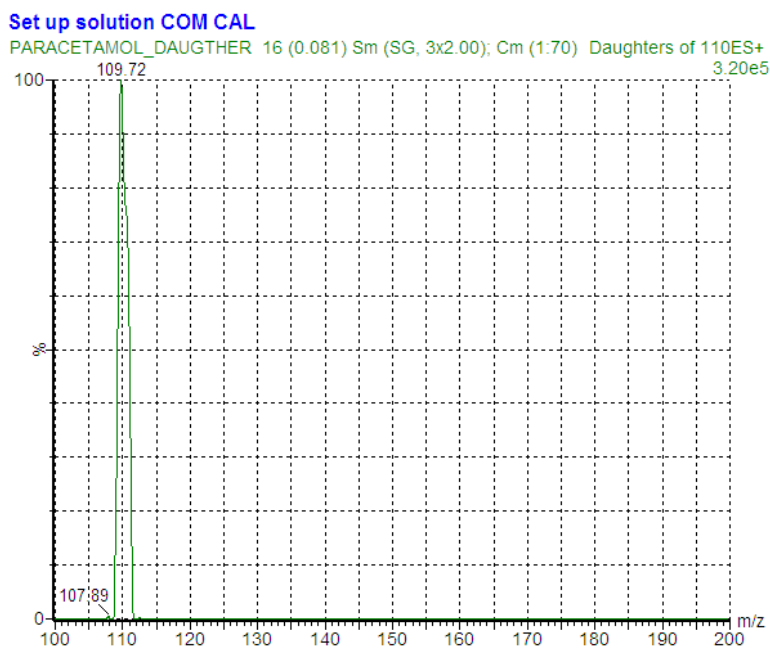


FIGURA 3.5: Espectros de Massas característicos do fármaco aminoprofeno (Paracetamol):

a) íon precursor de massa/carga 151.57;

b) íon produto da fragmentação do íon precursor 151,57<109.72.

Modo de ionização positivo, padrão analítico de concentração $1\mu\text{g L}^{-1}$ em solução aquosa de água:metanol (1:1, v/v).

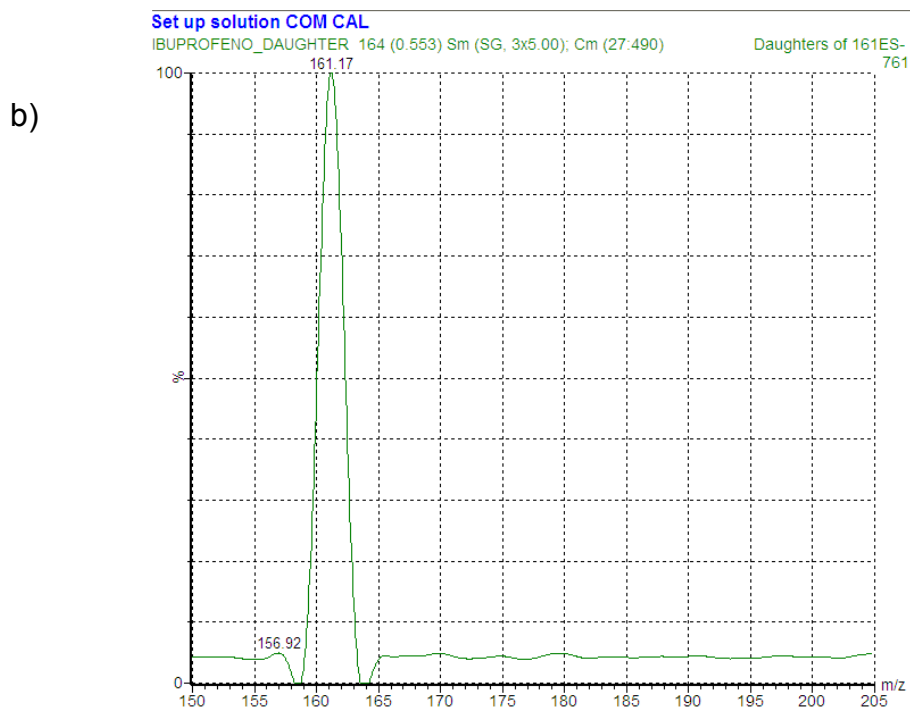
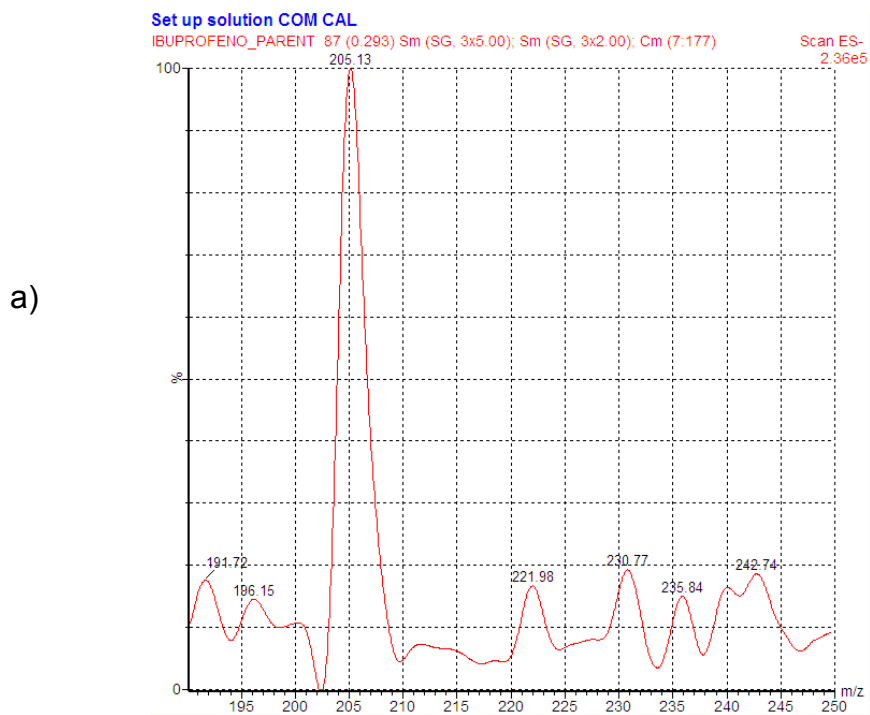


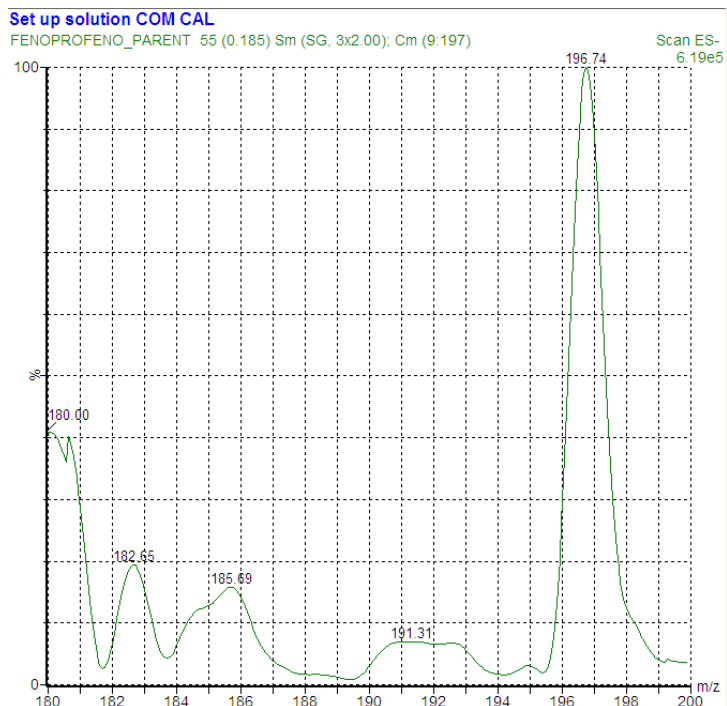
FIGURA 3.6: Espectros de Massas característicos do fármaco ibuprofeno:

a) íon precursor de massa/carga 205.13;

b) íon produto da fragmentação do íon precursor 205.13<161.17.

Modo de ionização negativo, padrão analítico de concentração $1\mu\text{g L}^{-1}$ em solução aquosa de água:metanol (1:1, v/v).

a)



b)

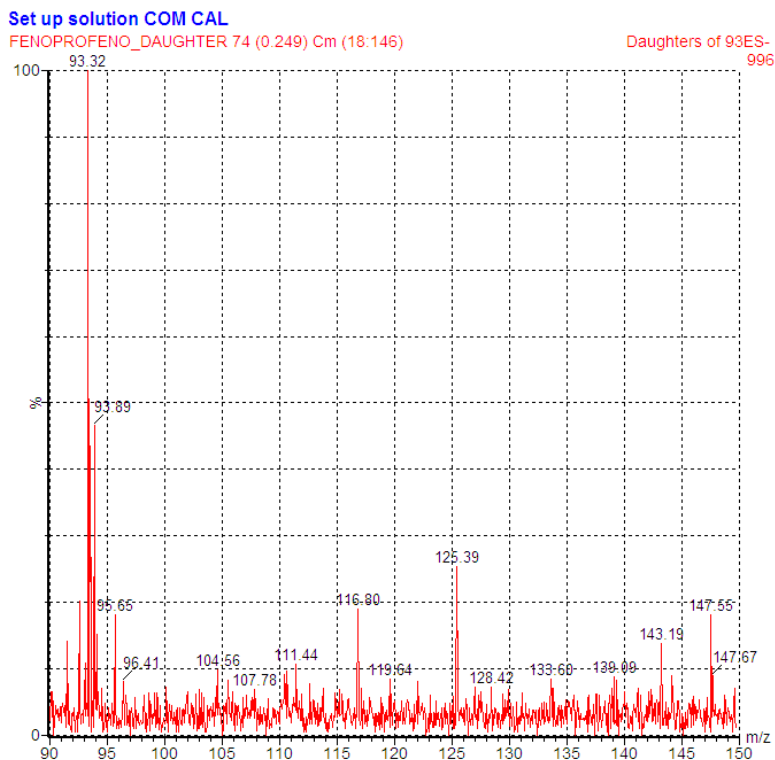


FIGURA 3.7: Espectros de Massas característicos do fármaco fenopropeno:

a) íon precursor de massa/carga 196.74;

b) íon produto da fragmentação do íon precursor 196.74 < 93.32.

Modo de ionização negativo, padrão analítico de concentração $1\mu\text{g L}^{-1}$ em solução aquosa de água:metanol (1:1, v/v).

Optou-se pelo desenvolvimento de dois métodos cromatográficos para a análise dos 5 fármacos deste estudo, para os fármacos diclofenaco e paracetamol que apresentaram melhor ionização pelo modo positivo denominou-se método 1. E para os fármacos ácido acetil salicílico, ibuprofeno e fenoprofeno que apresentaram melhor ionização pelo modo negativo, nomeou-se o método 2. Como aditivo de fase móvel utilizou-se o ácido fórmico para o modo de ionização positivo e o acetato de amônio para o modo negativo, Na tabela 3.2, foram listadas as condições dos dois métodos cromatográficos.

Tabela 3.4 Condições cromatográficas para determinação dos fármacos ácido acetil salicílico, diclofenaco de sódio, paracetamol, ibuprofeno e fenoprofeno.

| Método | Analito | Modo de Ionização | MRM Transição | Coluna Cromatográfica | Fluxo mL min ⁻¹ | Fase móvel |
|--------|-------------------------|-------------------|---------------|---|----------------------------|---|
| 1 | Diclofenaco de sódio | ESI+ | 319.1<199.9 | BEH C18 (50 X 2.1mm, d.i.) com partículas de 1,7 mm de diâmetro | 0.25 | MetanolÁgua (1:1, v/v), com adição de 1mL de ácido fórmico/1L de fase móvel |
| | Paracetamol | | 151.5<109.7 | | | |
| 2 | Ácido acetil salicílico | ESI- | 136.6<93.6 | BEH C18 (50 X 2.1mm, d.i.) com partículas de 1,7 mm de diâmetro | 0.25 | MetanolÁgua (1:1, v/v), com adição de 0.77g de acetato de amônio/1L de fase móvel |
| | Ibuprofeno | | 205.1<161.1 | | | |
| | Fenoprofeno | | 196.7<93.3 | | | |

3.3. VALIDAÇÃO

A validação é a comprovação, por meio do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos pretendidos foram atendidos (INMETRO, 2010).

Com a introdução da norma NBR ISO/IEC 17025, que estabelece requisitos gerenciais e técnicos para a implementação de sistema de gestão de qualidade em laboratório de ensaio e calibração, tornou-se obrigatória a evidência de que os métodos de análises utilizados em laboratórios são validados.

A literatura dispõe de vários trabalhos que relatam a validação de métodos analíticos e definem os critérios que devem ser seguidos durante seu desenvolvimento. Dentre esses, muitos são das áreas biológica, farmacêutica e química.

A validação de um método pode se obtida por meio da determinação dos parâmetros citados a seguir (EURACHEM, 1998; INMETRO, 2010):

- Especificidade e Seletividade
- Faixa de Trabalho
- Linearidade
- Limite de detecção
- Limite de quantificação
- Exatidão
- Precisão
- Robustez
- Incerteza de medição

3.3.1. ESPECIFICIDADE E SELETIVIDADE

Uma amostra, de maneira geral, consiste dos analitos a serem medidos, da matriz e de outros componentes que podem ter algum efeito na medição, mas que não se quer quantificar. A especificidade e a seletividade estão relacionadas ao evento da detecção. Um método que produz resposta para apenas um analito é chamado específico. Um método que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito da de outros, é chamado seletivo (INMETRO, 2010).

Várias são as formas de se evidenciar a especificidade e a seletividade de um método. Para este trabalho utilizou-se a análise de pureza do sinal cromatográfico e separação cromatográfica e canais de massas específicos para os compostos analisados e o tempo de retenção (EURACHEM, 1998; INMETRO, 2010).

3.3.2. FAIXA DE TRABALHO

Para qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentrações do analito ou valores da propriedade no qual o método pode ser aplicado. Dentro da faixa de trabalho pode existir uma faixa de resposta linear e dentro desta, a resposta do sinal terá uma relação linear com o analito ou valor da propriedade. A extensão dessa faixa pode ser estabelecida durante a avaliação da faixa de trabalho. A determinação da faixa de trabalho é iniciada pela escolha de uma faixa preliminar. A faixa de trabalho 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 situar no

centro da faixa de trabalho. Os valores medidos obtidos têm que estar linearmente correlacionados às concentrações. Isto requer que os valores medidos próximos ao limite inferior da faixa de trabalho possam ser distinguidos dos brancos do método (INMETRO,2010).

3.3.3. LINEARIDADE

Linearidade é a habilidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, em uma dada faixa de concentração. A quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito. A linearidade é obtida por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real.

A equação da reta que relaciona as duas variáveis é: $y = ax + b$

Onde:

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

x = concentração;

a = inclinação da curva analítica = sensibilidade;

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

A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito ou então calculados a partir da

equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrado (INMETRO,2010).

3.3.4. LIMITE DE DETECÇÃO

Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito ou de uma propriedade, como por exemplo, análise de traços, é importante saber qual o menor valor de concentração do analito ou da propriedade que pode ser detectado pelo método. O limite de detecção do equipamento (LDE) é definido como a concentração do analito que produz um sinal de três a cinco vezes a razão ruído/sinal do equipamento. O limite de detecção do método (LDM) é definido como a concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95% ou 99% de confiança de que a concentração do analito é maior que zero. O LDM é determinado através de análise completa de uma dada matriz contendo o analito. O procedimento de determinação do LDM é aplicado a uma grande variedade de tipos de amostras, desde a água reagente (branco) até águas residuárias, todas contendo o analito. O LDM para um procedimento analítico pode variar em função do tipo da amostra. É fundamental assegurar-se de que todas as etapas de processamento do método analítico sejam incluídas na determinação desse limite de detecção (INMETRO, 2003).

3.3.5. LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

O Limite de Quantificação é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão e veracidade (trueness). Pode ser considerado como sendo a concentração do analito correspondente ao valor da média do branco mais 5, 6 ou 10 desvios padrão. Algumas vezes é também denominado “Limite de Determinação”. Na prática, corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco). Este limite, após ter sido determinado, deve ser testado para averiguar se as exatidão e precisão conseguidas são satisfatórias (INMETRO, 2010).

Por se tratar de análise de contaminates, os limites de detecção e quantificação devem ser substituídos pelo limite de decisão e a capacidade de detecção (2002/657/EC).

3.3.6. EXATIDÃO

Exatidão é a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro. A determinação da exatidão pode ser realizada através de análises de material de referência, participação em comparações interlaboratoriais, comparações de resultados obtidos por diferentes métodos e ensaios de recuperação, realizados em pelo menos três níveis de concentrações (EURACHEM, 1998; INMETRO, 2003).

3.3.7. PRECISÃO

Precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. É normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição e as duas formas mais comuns de expressá-la são por meio da repetitividade e a reprodutibilidade, sendo usualmente expressa pelo desvio padrão. A precisão é geralmente expressa como desvio padrão ou desvio padrão relativo. Ambas repetitividade e reprodutibilidade, são geralmente dependentes da concentração do analito e, deste modo, devem ser determinadas para um diferente número de concentrações e, em casos relevantes, a relação entre precisão e a concentração do analito deve ser estabelecida. O desvio padrão relativo pode ser mais útil neste caso, pois foi normalizado com base na concentração e deste modo ele é praticamente constante ao longo da faixa de interesse, contanto que esta não seja muito grande (INMETRO, 2010).

3.3.8. ROBUSTEZ

O estudo da robustez de um procedimento analítico procura avaliar o quão sensível o resultado analítico é a variações nas condições experimentais do procedimento analítico, os chamados fatores ou tratamentos ou grandezas de influência. A robustez não é uma grandeza física ou química, assim não se pode atribuir-lhe um valor numérico. Para avaliar a robustez, verifica-se experimentalmente se a variação de cada fator estudado tem efeito significativo sobre a qualidade metrológica do resultado analítico. Se nenhum dos fatores estudados, e plausíveis de

afetar o resultado da medição, tiver efeito significativo o procedimento analítico é considerado robusto (INMETRO, 2010).

Um procedimento robusto produz resultados mais reproduzíveis ao longo do tempo e, principalmente, apresenta maior portabilidade para outro laboratório dentro da organização, no país ou até no exterior.

A portabilidade é a característica de um procedimento analítico que permite sua transferência para outro local, sem perda de suas características metrológicas e de desempenho analítico. Por isso, a implementação de um novo procedimento analítico reconhecidamente robusto se torna uma tarefa grandemente facilitada, e produzirá resultados tão confiáveis quanto no laboratório original onde foi desenvolvido e/ou validado. Assim, a robustez pode ser um dos fatores importantes a considerar, após a veracidade e a precisão, quando da escolha de um procedimento analítico novo para o laboratório.

3.3.9. INCERTEZA DE MEDIÇÃO

O Vocabulário internacional de metrologia – VIM define a incerteza como um parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando, com base nas informações utilizadas.

A incerteza (precisão) juntamente com a tendência (veracidade), constituem as duas mais importantes características (parâmetros) metrológicas e de qualidade de um resultado de medição, permitindo a comparabilidade e a avaliação da conformidade do resultado de medição em relação à normas, à limites legais ou contratuais ou à valores de referências

Portanto, a incerteza é a principal característica metrológica do resultado de uma medição para se estabelecer e se verificar o atendimento ao critério de adequação ao uso pretendido (INMETRO, 2010).

Os estudos de validação produzem dados de desempenho global do método e fatores de influência individuais que podem ser aplicados à estimativa da incerteza associada aos resultados do método em rotina.

Neste trabalho a validação das análises foi baseada nas orientações do Inmetro, 2003 (descritas anteriormente) e da Comunidade Européia (Directiva 2002/657/CE).

Baseando-se nestas recomendações, foram avaliados os parâmetros: Seletividade, Faixa de Trabalho e Faixa Linear de Trabalho, Limite de Detecção, Limite de Quantificação, Exatidão, Precisão e Robustez.

Para cada um destes parâmetros foram realizados uma série de experimentos e números estatisticamente significativos (N=8).

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO DA APLICAÇÃO DE FERRAMENTAS DE ANÁLISE MULTIVARIADA PARA PLANEJAMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO

4.1. DESEMPENHO ANALÍTICO

4.1.1. ESPECIFICIDADE E SELETIVIDADE

A seletividade da metodologia 1 foi primeiramente avaliada pela análise cromatográfica da solução dos fármacos em solução preparada com a mistura de solvente com água (H₂O:MeOH 1:1, v/v). Foram consideradas as propriedades da técnica analítica utilizada nesse trabalho: tempo de retenção e especificidade dos canais de massas em MRM. Os dados utilizados nestes testes foram os mesmos usados nos testes de precisão sob condições de reprodutibilidade. Os resultados das avaliações dos desvio de tempo de retenção estão apresentados na tabela 4.1.

Tabela 4.1: Avaliação dos parâmetros de tempo de retenção

| Parâmetros | | Paracetamol | Diclofenaco | Ac. Acetil Salicílico | Ibuprofeno | Fenoprofeno |
|-------------------|------------------|-------------|-------------|-----------------------|------------|-------------|
| Tempo de Retenção | Valor médio(min) | 1,03 | 1,93 | 2,30 | 3,93 | 4,60 |
| | DP | 0,06 | 0,09 | 0,07 | 0,1 | 0,06 |
| | CV | 2,1 | 2,7 | 2,5 | 3,4 | 2,2 |

Foram tabelados os valores de tempo de retenção dos compostos, avaliou-se as médias, desvio padrão e desvio padrão relativo. Os valores de variação dos tempos de retenção para cada composto, não ultrapassou 5% de desvio padrão relativo que é o valor máximo de variação recomendado pelos guias de validação do Inmetro e Eurachem.

Nos canais de massas selecionados para os fármacos deste estudo, não observou-se interferentes para a determinação dos resíduos em água. Na figura 4.1, demonstra-se um cromatograma típico da resposta da matriz água pura sob as condições deste método para os fármacos Paracetamol e Diclofenaco.

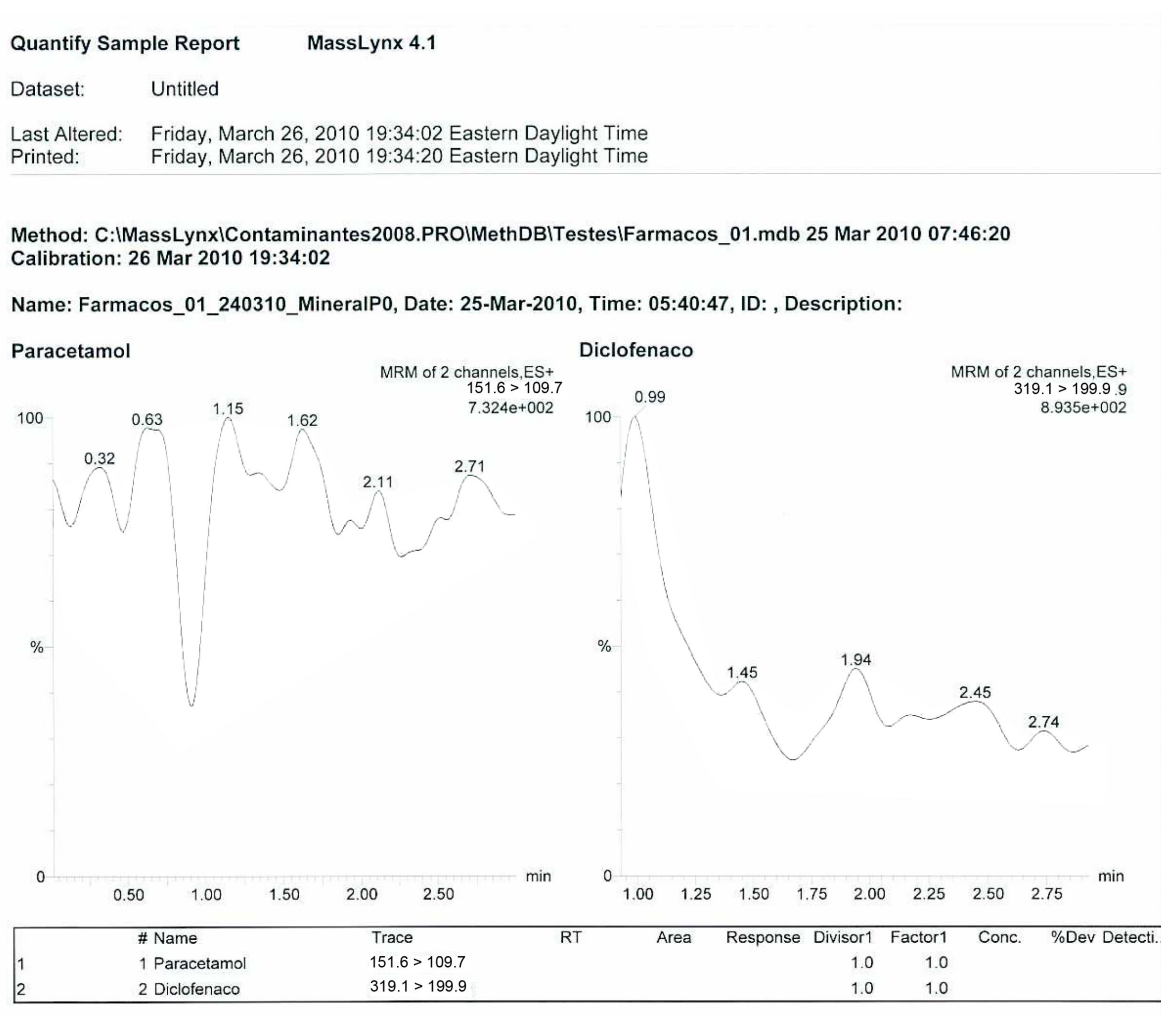


Figura 4.1: Cromatograma de uma amostra de água pura analisada pelo método 1, para os resíduos de Paracetamol e Diclofenaco.

Nas figuras 4.2, 4.3 e 4.4 estão demonstrados os cromatogramas dos fármacos Paracetamol, Diclofenaco de Sódio, Ácido Acetil Salicílico, Ibuprofeno e Fenopropeno em soluções padrões de $1\mu\text{g L}^{-1}$ em mistura de solução aquosa de água: metanol (1:1, v/v).

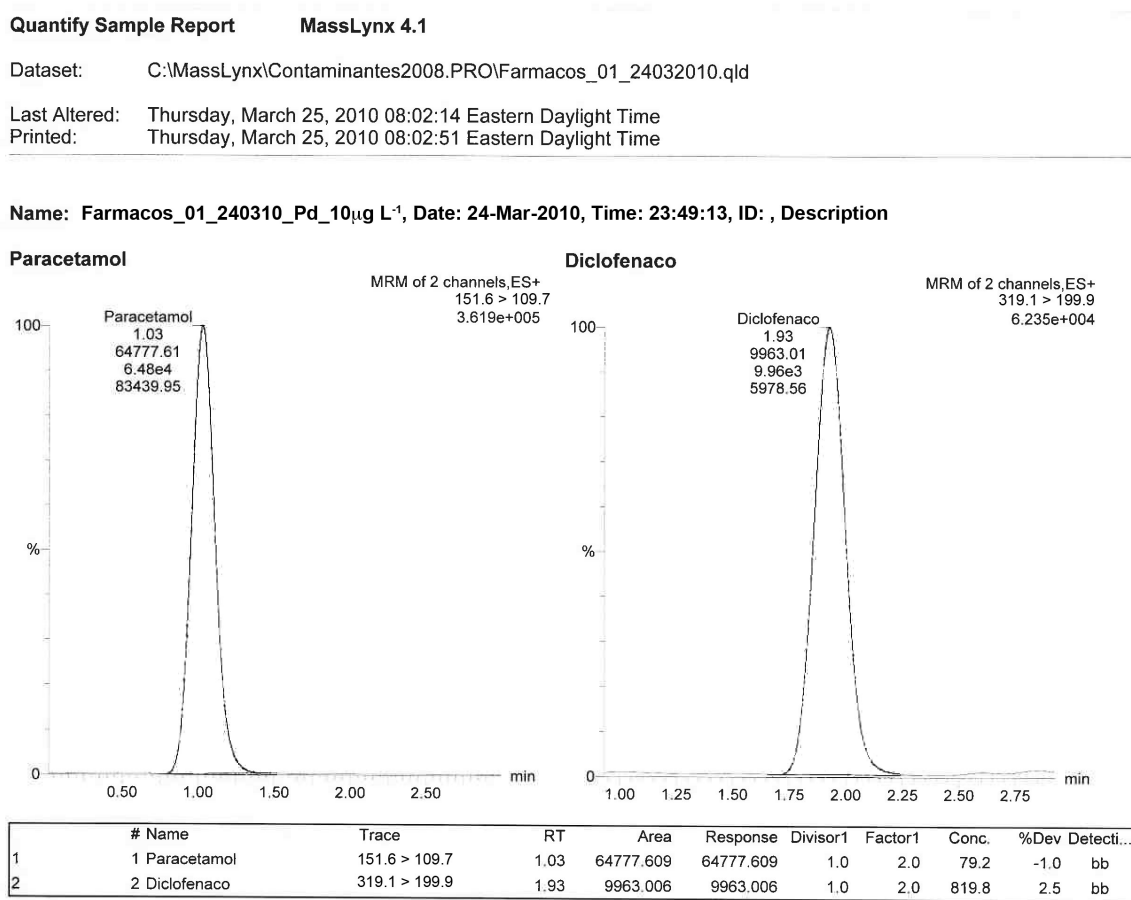


Figure 4.2: Cromatograma da solução aquosa de padrão de Paracetamol e Diclofenaco de Sódio na concentração de $1\mu\text{g L}^{-1}$

Quantify Sample Report **MassLynx 4.1**

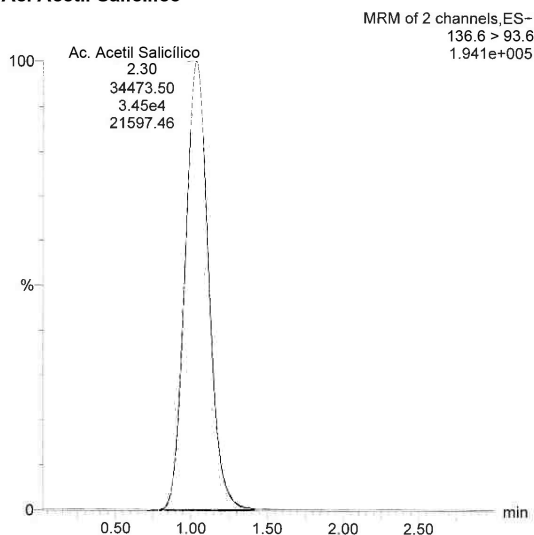
Dataset: Untitled

Last Altered: Friday, March 26, 2010 20:03:38 Eastern Daylight Time

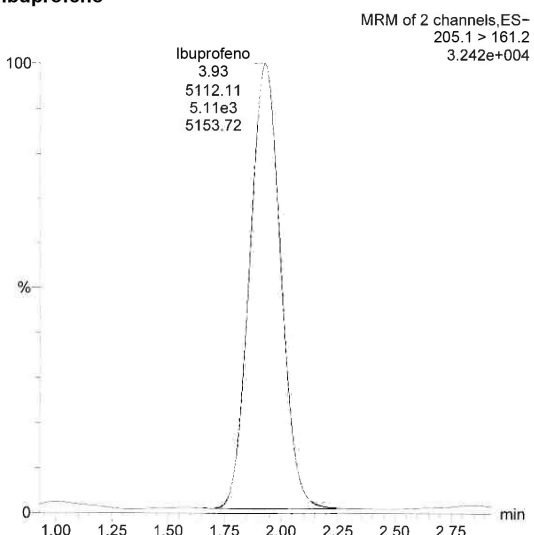
Printed: Friday, March 26, 2010 20:04:12 Eastern Daylight Time

Name: Farmacos_02_240310_Pd_10µg L⁻¹, Date: 24-Mar-2010, Time: 23:49:13, ID: , Description

Ac. Acetil Salicílico



Ibuprofeno



| # | Name | Trace | RT | Area | Response | Divisor1 | Factor1 | Conc. | %Dev | Detecti... |
|---|-------------------------|---------------|------|-----------|-----------|----------|---------|-------|------|------------|
| 1 | 1 Ac. Acetil Salicílico | 136.6 > 93.6 | 1.03 | 34473.500 | 34473.500 | 1.0 | 1.0 | 19.6 | -2.2 | bb |
| 2 | 2 Ibuprofeno | 205.1 > 161.2 | 1.93 | 5112.113 | 5112.113 | 1.0 | 1.0 | 196.6 | -1.7 | bb |

Figure 4.3: Cromatograma da solução aquosa de padrão de Ácido Acetil Salicílico e Ibuprofeno na concentração de 1µg L⁻¹

Quantify Sample Report **MassLynx 4.1**

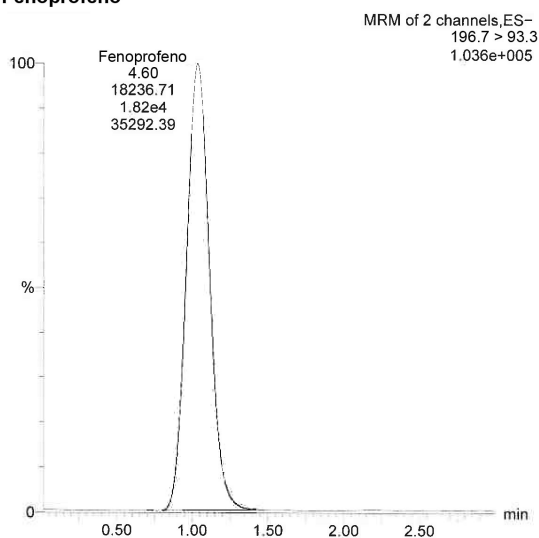
Dataset: Untitled

Last Altered: Friday, March 26, 2010 20:03:38 Eastern Daylight Time

Printed: Friday, March 26, 2010 20:04:12 Eastern Daylight Time

Name: Farmacos_02_240310_Pd_10 μ g L⁻¹, Date: 24-Mar-2010, Time: 23:49:13, ID: , Description

Fenoprofeno



| # | Name | Trace | RT | Area | Response | Divisor1 | Factor1 | Conc. | %Dev | Detecti... |
|---|---------------|--------------|------|-----------|-----------|----------|---------|-------|------|------------|
| 1 | 1 Fenoprofeno | 196.7 > 93.3 | 1.03 | 18236.711 | 18236.711 | 1.0 | 1.0 | 10.3 | 3.3 | bb |

Figure 4.4: Cromatograma da solução aquosa de padrão de Fenoprofeno na concentração de 1 μ g L⁻¹

O Efeito Matriz foi estudado para averiguar possíveis interferências causadas pelas diversas substâncias que compõem a matriz amostral gerando, basicamente, fenômenos de diminuição ou ampliação do sinal instrumental ou resposta instrumental.

Para o estudo de efeito matriz preparou-se 6 curvas de calibração em solução aquosa de metanol e água-ultra pura (1:1, v/v) com 6 níveis de concentração e mais 6 curvas de calibração em solução aquosa de água tratada (rio Paraíba do sul) e methanol na proporção (1:1, v/v).

Após os preparos analisaram-se as replicadas das curvas em solução de água ultra pura e água tratada. Os dados foram avaliados pelo teste de F (Fischer - Snedecor), de homogeneidade de variâncias, para verificar se as variâncias dos coeficientes de inclinação e linear das curvas preparadas em água ultra pura e água tratada podem ser considerados estatisticamente iguais, em cada nível de concentração.

Para todos os compostos o valor de F calculado foi superior ao valor de F tabelado, portanto considerou-se que existe efeito de matriz e portanto o método utilizou curva preparada em matriz fortificada.

Na figura 4.5 é apresentado o cromatograma de uma amostra de água superficial do rio Paraíba do Sul, fortificada com padrão de Paracetamol na concentração de $5\mu\text{g L}^{-1}$.

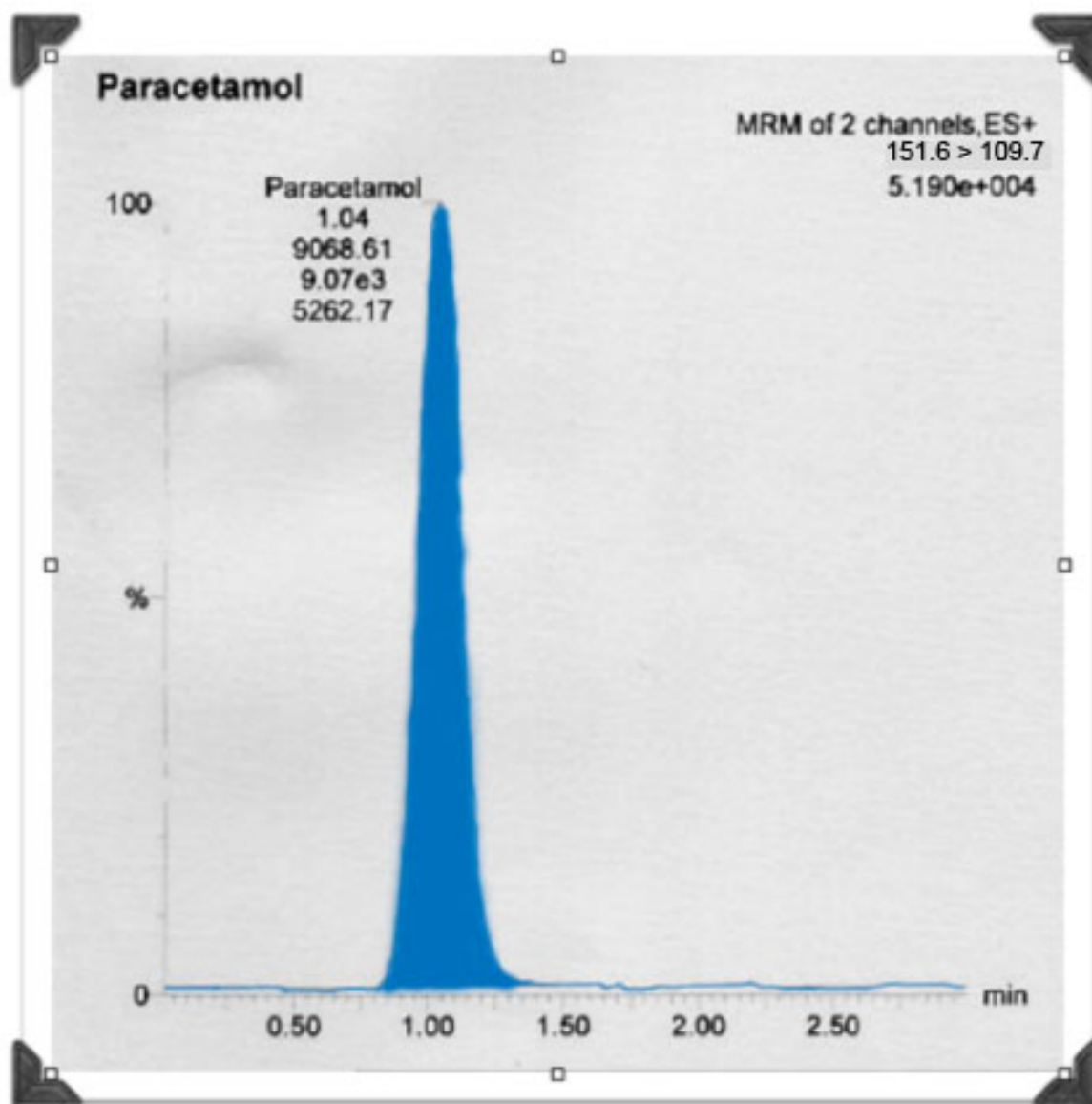


FIGURA 4.5. Cromatograma de uma amostra de água do rio Paraíba do Sul, fortificada com padrão de Paracetamol na concentração de $5\mu\text{g L}^{-1}$.

Foram analisadas 8 amostras de água ultra pura (MilliQ) e oito amostras de água mineral comercial, sendo observadas as respostas nos tempo de retenção dos analitos de interesse, bem como nos canais de massas monitorados para todos os fármacos. Não foram detectados traços de interferências para a quantificação pelo dois métodos selecionados.

4.1.2. FAIXA DE TRABALHO E LINEARIDADE

O parâmetro linearidade foi avaliado por meio das curvas analíticas. Foram considerados os coeficientes de determinação das retas (R^2) e a análise de resíduos pelo teste t (Student). Nas figuras 4.6 a 4.10 são apresentados os gráficos das faixas lineares de trabalho para os fármacos Paracetamol, Diclofenaco, Ácido acetil salicílico, Ibuprofeno e Fenopropeno. Os gráficos foram ajustados pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO).

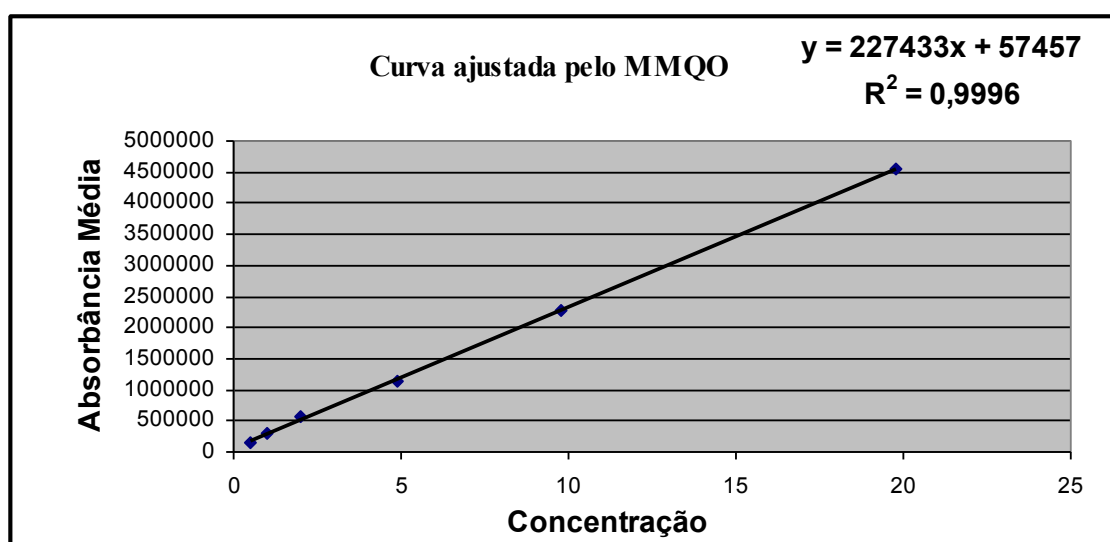


Figura 4.6: Gráfico da faixa linear de trabalho para o fármaco Paracetamol.

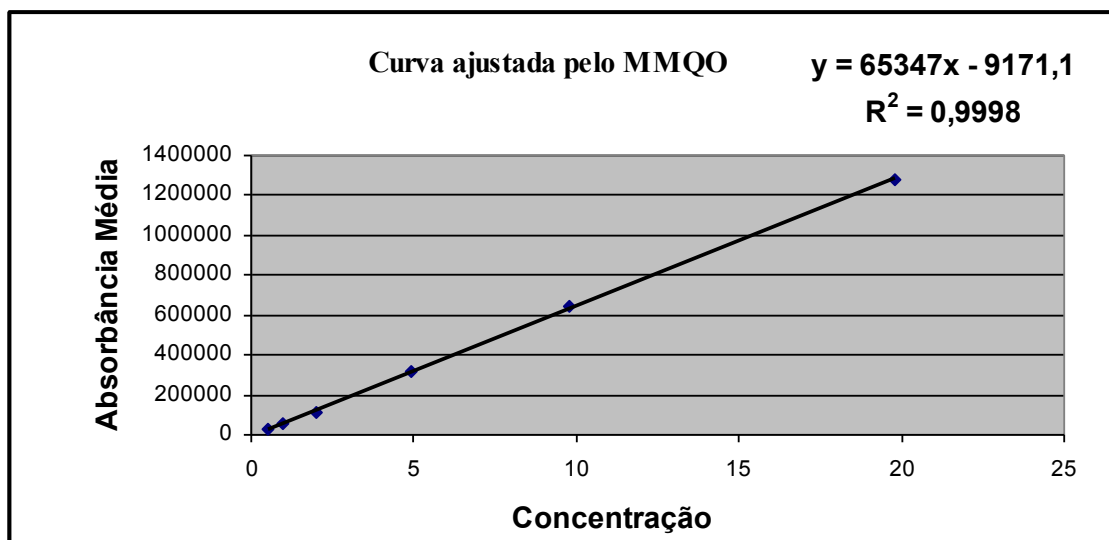


Figura 4.7: Gráfico da faixa linear de trabalho para o fármaco Diclofenaco de Sódio.

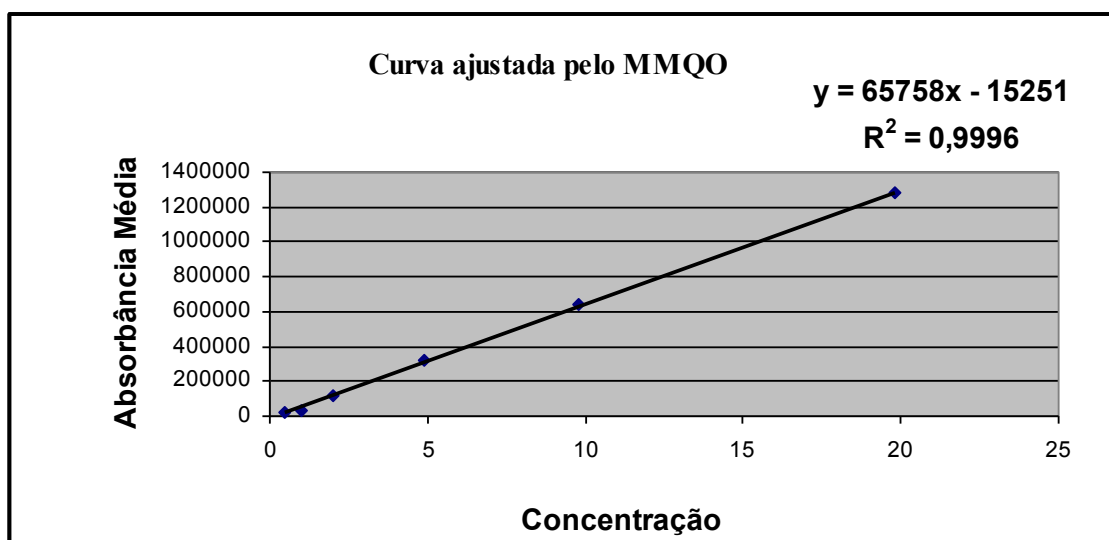


Figura 4.8: Gráfico da faixa linear de trabalho para o fármaco Ácido Acetil Salicílico.

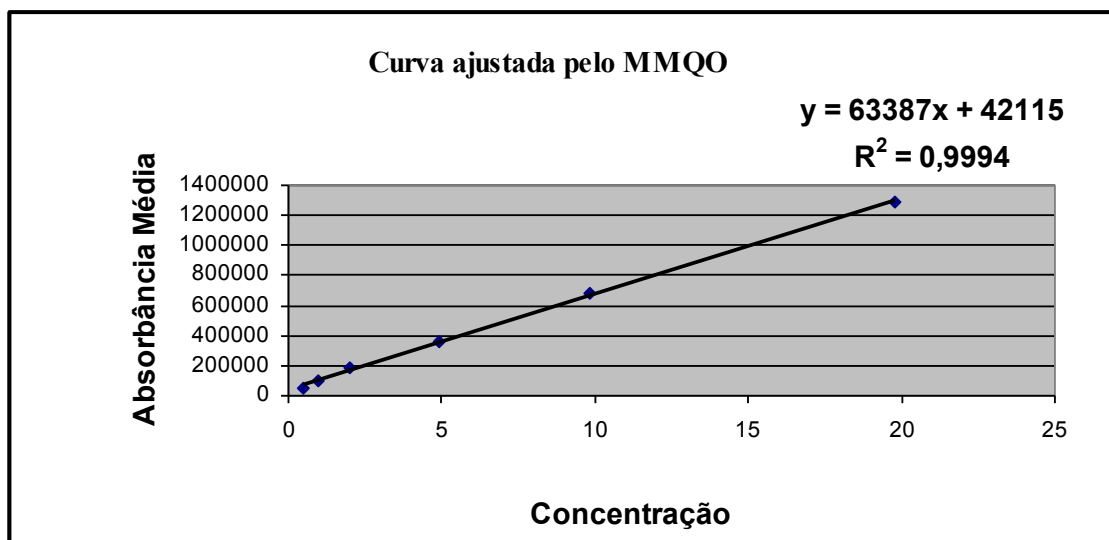


Figura 4.9: Gráfico da faixa linear de trabalho para o fármaco Ibuprofeno.

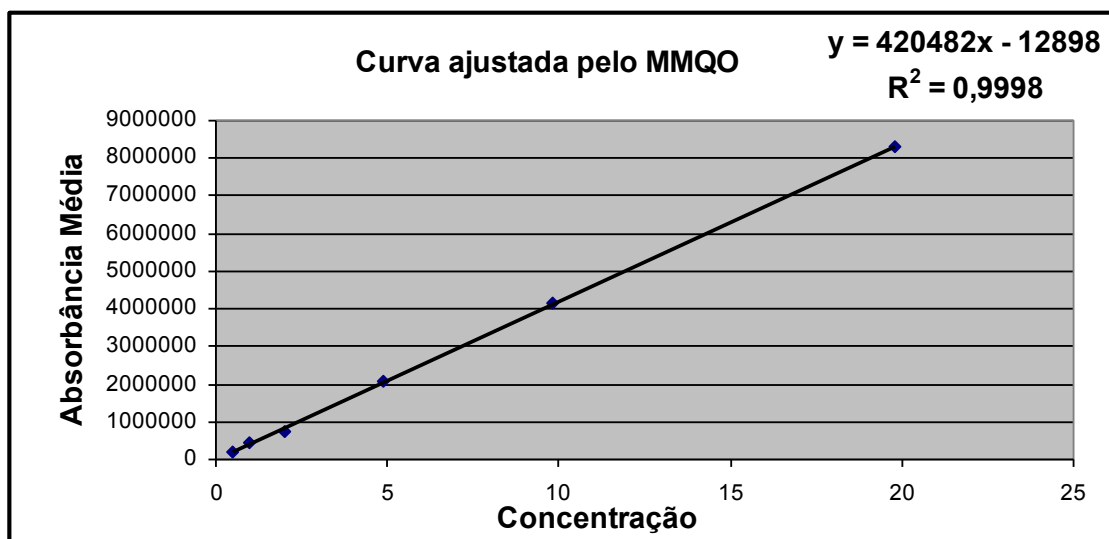


Figura 4.10: Gráfico da faixa linear de trabalho para o fármaco Fenoprofeno.

Os coeficientes de determinação das retas (R^2), foram superiores a 0,995 para todos os fármacos. Pela análise dos resíduos observou-se que as faixas de trabalho

são lineares para os fármacos Paracetamol, Diclofenaco, Ácido acetil salicílico, Ibuprofeno e Fenoprofeno.

4.1.3. LIMITES DE DECISÃO E DETERMINAÇÃO

O conceito de limite de decisão e limite de detecção foi introduzido pela norma ISO 11843 com o objetivo de propor um método para determinar o limite a partir do qual um sistema pode ser declarado diferente do seu estado básico.

Para cálculo do limite de quantificação, foram analisadas amostras de água, fortificadas no nível de $0,5 \mu\text{gL}^{-1}$.

Na tabela 4.2, foram listados os resultados de recuperações de amostras de água livre dos resíduos dos fármacos de interesse neste trabalho, as quais foram fortificadas com os fármacos em nível de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ e foram concentrados em equipamento de evaporação TurboVap™.

Tabela 4.2 – Amostras de recuperações dos fármacos em água, após sistema de concentração em sistema de evaporação TurboVap™.

| Parâmetros | | Paracetamol | Diclofenaco | Ac. Acetil Salicílico | Ibuprofeno | Fenoprofeno |
|-------------|-----------|-------------|-------------|-----------------------|------------|-------------|
| Recuperação | Média n=8 | 103% | 102% | 101% | 98% | 95% |

Todos os valores de recuperações, das oito replicatas de amostras de água fortificadas com os fármacos, ficaram entre 80 e 110%.

O Limite de decisão - $C_{c\alpha}$ e Capabilidade de detecção - CC_{β} , são parâmetros definidos na directiva europeia 2002/657/EC. Estes parâmetros medem o desempenho do procedimento analítico, levando em consideração a incerteza de

medição, no nível de concentração no qual se toma alguma decisão, o chamado nível de interesse.

Por se tratar de análises de contaminantes, os limites acima foram adotados. Para as determinações dos limites $Cc\alpha$ e $CC\beta$, a matriz água foi adicionada de padrão em 3 diferentes níveis de concentração, com 8 replicatas em cada nível. Este procedimento foi realizado em 3 diferentes ocasiões. Os dados para cálculo de limites de capacidade de detecção foram extraídos dos resultados obtidos sob as condições de reprodutibilidade intermediária. A avaliação dos dados obtidos foram realizadas utilizando planilha excell. Os valores de $Cc\alpha$ e $CC\beta$ obtidos para os fármacos encontram-se na tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Dados de $CC\alpha$ e $CC\beta$

| Composto | $Cc\alpha$ $\mu\text{g L}^{-1}$ Limite de decisão | $CC\beta$ $\mu\text{g L}^{-1}$ Capabilidade de detecção |
|----------------------|--|--|
| Paracetamol | 0,10 | 0,21 |
| Diclofenaco | 0,33 | 0,45 |
| Ác acetil salicílico | 0,42 | 0,51 |
| Ibuprofeno | 0,36 | 0,43 |
| Fenoprofeno | 0,26 | 0,39 |

4.1.4. EXATIDÃO

Para a determinação da exatidão do método foram analisadas sob condições de repetitividade, 8 tomadas de ensaio de água ultrapura (MilliQ), fotificadas em três

diferentes níveis de concentração dos fármacos. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 4.4.

Tabela 4.4 – Dados de Recuperação dos Fármacos – Dia 1

| Composto | Recuperação (%) | SD | Recuperação (%) | SD | Recuperação (%) | SD |
|--------------------------|-----------------|----|-----------------|----|-----------------|----|
| Dia 1 | Nível 1 | | Nível 2 | | Nível 3 | |
| Paracetamol | 105 | 5 | 93 | 6 | 95 | 4 |
| Diclofenaco | 99 | 10 | 97 | 5 | 102 | 3 |
| Ac. Acetil Salicílico | 98 | 3 | 98 | 4 | 101 | 2 |
| Ibuprofeno | 101 | 5 | 102 | 6 | 97 | 5 |
| Fenoprofeno | 102 | 8 | 89 | 8 | 99 | 3 |

As recuperações de todos os níveis encontram-se dentro da faixa estabelecida pela directiva da Comunidade Europeia 657, que para os valores dos níveis 1, 2 e 3 (1 a 10 μ g L⁻¹) é de 70 a 110%.

4.1.5. PRECISÃO

Para a determinação da precisão do método foram analisadas sob condições de repetitividade, 8 tomadas de ensaio de água MilliQ, fotificadas em três diferentes níveis de concentração dos fármacos. Os resultados obtidos encontram-se nas tabelas 4.5, 4.6 e 4.7 respectivamente divididos nos três dias de estudo de precisão dos fármacos.

Tabela 4.5 – Dados de Precisão dos Fármacos – Dia 1

| Composto | Valor Teórico $\mu\text{g L}^{-1}$ | Média (n=8) $\mu\text{g L}^{-1}$ | Mediana (n=8) $\mu\text{g L}^{-1}$ | Valor Teórico $\mu\text{g L}^{-1}$ | Média (n=8) $\mu\text{g L}^{-1}$ | Mediana (n=8) $\mu\text{g L}^{-1}$ | Valor Teórico $\mu\text{g L}^{-1}$ | Média (n=8) $\mu\text{g L}^{-1}$ | Mediana (n=8) $\mu\text{g L}^{-1}$ |
|-----------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| Dia 1 | Nível 1 | | | Nível 2 | | | Nível 3 | | |
| Paracetamol | 1,0 | 1,2 | 1,2 | 5,0 | 5,2 | 5,3 | 10,0 | 10,1 | 10,3 |
| Diclofenaco de Sódio | 1,0 | 1,1 | 1,1 | 5,0 | 5,3 | 5,5 | 10,0 | 10,2 | 10,2 |
| Ac. Acetil Salicílico | 1,0 | 1,0 | 1,1 | 5,0 | 5,1 | 5,4 | 10,0 | 10,3 | 10,3 |
| Ibuprofeno | 1,0 | 1,2 | 1,2 | 5,0 | 5,2 | 5,3 | 10,0 | 10,2 | 10,3 |
| Fenoprofeno | 1,0 | 1,1 | 1,2 | 5,0 | 5,2 | 5,2 | 10,0 | 10,3 | 10,4 |

Tabela 4.6 – Dados de Precisão dos Fármacos – Dia 2

| Composto | Valor Teórico $\mu\text{g L}^{-1}$ | Média (n=8) $\mu\text{g L}^{-1}$ | Mediana (n=8) $\mu\text{g L}^{-1}$ | Valor Teórico $\mu\text{g L}^{-1}$ | Média (n=8) $\mu\text{g L}^{-1}$ | Mediana (n=8) $\mu\text{g L}^{-1}$ | Valor Teórico $\mu\text{g L}^{-1}$ | Média (n=8) $\mu\text{g L}^{-1}$ | Mediana (n=8) $\mu\text{g L}^{-1}$ |
|-----------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| Dia 2 | Nível 1 | | | Nível 2 | | | Nível 3 | | |
| Paracetamol | 1,0 | 1,3 | 1,5 | 5,0 | 5,3 | 5,3 | 10,0 | 10,3 | 10,5 |
| Diclofenaco de Sódio | 1,0 | 1,2 | 1,3 | 5,0 | 5,2 | 5,5 | 10,0 | 10,1 | 10,2 |
| Ac. Acetil Salicílico | 1,0 | 1,1 | 1,3 | 5,0 | 5,2 | 5,4 | 10,0 | 10,4 | 10,5 |
| Ibuprofeno | 1,0 | 1,1 | 1,2 | 5,0 | 5,1 | 5,3 | 10,0 | 10,1 | 10,2 |
| Fenoprofeno | 1,0 | 1,2 | 1,4 | 5,0 | 5,2 | 5,4 | 10,0 | 10,3 | 10,4 |

Tabela 4.7 – Dados de Precisão dos Fármacos – Dia 3

| Composto | Valor Teórico $\mu\text{g L}^{-1}$ | Média (n=8) $\mu\text{g L}^{-1}$ | Mediana (n=8) $\mu\text{g L}^{-1}$ | Valor Teórico $\mu\text{g L}^{-1}$ | Média (n=8) $\mu\text{g L}^{-1}$ | Mediana (n=8) $\mu\text{g L}^{-1}$ | Valor Teórico $\mu\text{g L}^{-1}$ | Média (n=8) $\mu\text{g L}^{-1}$ | Mediana (n=8) $\mu\text{g L}^{-1}$ |
|-----------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| Dia 3 | Nível 1 | | | Nível 2 | | | Nível 3 | | |
| Paracetamol | 1,0 | 1,3 | 1,4 | 5,0 | 5,3 | 5,6 | 10,0 | 10,3 | 10,5 |
| Diclofenaco de Sódio | 1,0 | 1,2 | 1,4 | 5,0 | 5,4 | 5,7 | 10,0 | 10,2 | 10,5 |
| Ac. Acetil Salicílico | 1,0 | 1,1 | 1,3 | 5,0 | 5,3 | 5,5 | 10,0 | 10,4 | 10,7 |
| Ibuprofeno | 1,0 | 1,3 | 1,5 | 5,0 | 5,5 | 5,7 | 10,0 | 10,3 | 10,5 |
| Fenoprofeno | 1,0 | 1,2 | 1,3 | 5,0 | 5,3 | 5,6 | 10,0 | 10,1 | 10,2 |

Os desvios padrões das amostras de água em todos os níveis e em todos os dias encontram-se dentro da faixa estabelecida pela directiva da Comunidade Europeia 657.

4.1.6. ROBUSTEZ

Para avaliação da robustez do método, utilizou-se o teste de Youden, planejamentos fatoriais fracionários alternativos.

Selecionou-se os fatores a serem avaliados, seus valores nominais (desenvolvidos no método) e os respectivos valores de variação. Estão na tabela 4.8 os fatores selecionados para o estudo de robustez.

Tabela 4.8: Fatores selecionados para estudo de robustez

| Fator | Nominal | Varição |
|---|---------|---------|
| Volume de amostra (mL) (VA) | 1,0 | 1,5 |
| Volume de metanol (mL) (VM) | 1,0 | 2,0 |
| Fluxo de Fase Móvel (mLmin ⁻¹) (FL) | 0,25 | 0,30 |

Executou-se o ensaio com as combinações da tabela 4.8 em oito replicatas de uma amostra fortificada em 1µg L⁻¹ para cada composto e aleatoriamente, inclusive entre as replicatas de cada combinação. Na tabela 4.9, estão os valores obtidos para as respostas do fármaco Paracetamol.

Tabela 4.9: Fatores de resposta para a amostra de água tratada fortificada com 1µg L⁻¹ de Paracetamol.

| Replicata | (VA) mL | (VM) mL | (FL) mL min ⁻¹ | Resposta em µg L ⁻¹ |
|-----------|------------|------------|------------------------------|--------------------------------|
| | | | | |
| | | | | 1,1 |
| 1 | 1,0 | 1,0 | 0,25 | 1,2 |
| 2 | 1,5 | 1,0 | 0,25 | 1,3 |
| 3 | 1,0 | 2,0 | 0,25 | 1,2 |
| 4 | 1,5 | 2,0 | 0,25 | 1,1 |
| 5 | 1,0 | 1,0 | 0,30 | 1,2 |
| 6 | 1,5 | 1,0 | 0,30 | 1,1 |
| 7 | 1,0 | 2,0 | 0,30 | 1,2 |
| 8 | 1,5 | 2,0 | 0,30 | 1,1 |

Obs: VA = Volume de Amostra; VM= Volume de Solvente e FL = Fluxo da fase móvel

Avaliou-se para todos os compostos a mesma combinação com os fatores: volume de amostra (1) 1mL e 1,5 mL, volume do solvente metanol (2) = 1mL e 2mL e o fluxo de fase móvel (3) 0,25 mL min⁻¹ e 0,30 mL min⁻¹.

Para todos os compostos as respostas são as concentrações do analito em

cada experimento de extração.

Verificou-se pelo teste F que a variação dos resultados para as combinações são estatisticamente iguais ao nível de confiança de 95%.

4.1.7. INCERTEZA DE MEDIÇÃO

O cálculo utilizado para a determinação das incertezas do método proposta para as análises de fármacos em água foi baseado na calibração linear dos mínimos quadrados. Os dados analíticos obtidos a partir da validação do método durante os ensaios de linearidade repetitividade e reprodutibilidade foram às bases para os cálculos.

Os cálculos estatísticos para a medição da incerteza dos métodos 1 e 2 foram tabelados e como demonstrado no gráfico da figura 4.11.

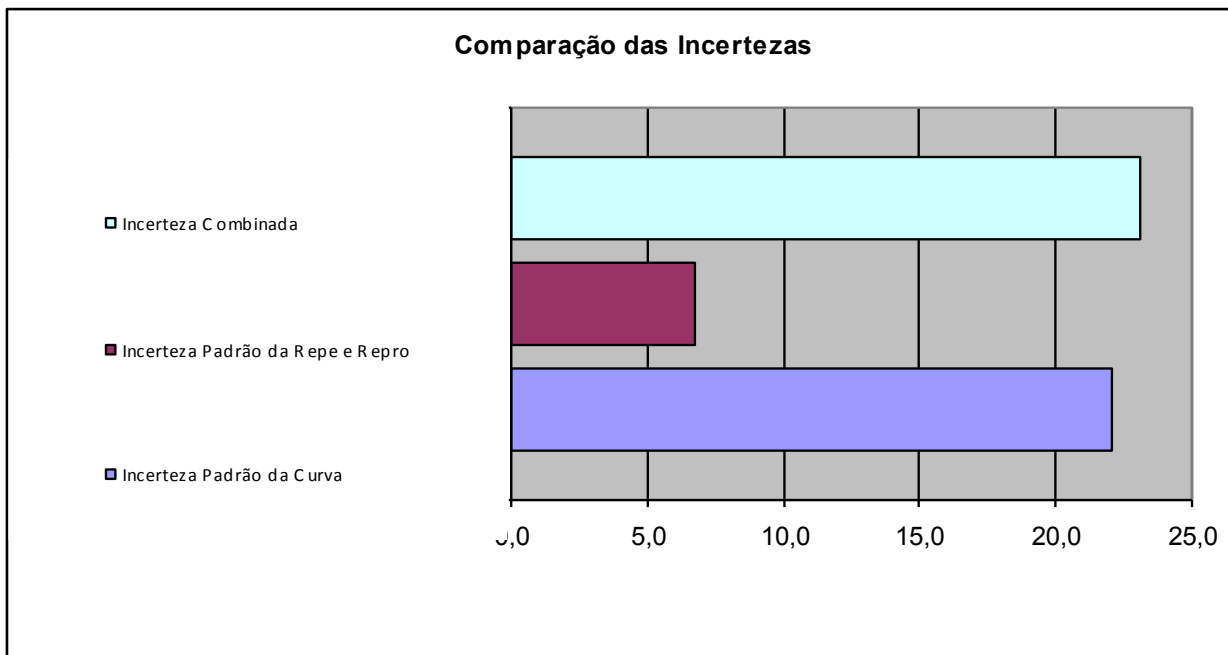


Figura 4.11: Gráficos das combinações das incertezas, em porcentagem, dos métodos 1 e 2.

Para os métodos 1 e 2, testados para os fármacos deste estudo, observou-se que a maior contribuição para a medição da incerteza provem da preparação e injeção da curva de calibração.

O resultado de uma medição é sempre usado para subsidiar alguma tomada de decisão, seja ela a conformidade de um produto ou serviço a alguma especificação, ao requisito de alguma norma nacional ou internacional ou à obediência a alguma lei. Essa tomada de decisão pode também constituir o atendimento a algum contrato ou critério interno ou externo de qualidade.

No entanto, o resultado de qualquer medição está sempre sujeito a erros, sejam eles sistemáticos ou aleatórios, os quais resultam na perda de sua acurácia.

Nesse sentido, é necessário que os laboratórios de ensaios que realizam tais medições disponham de orientações científicas e conceitualmente consistentes de

como proceder para reduzir os erros e aumentar a confiabilidade dos resultados das medições, reduzindo-se gradualmente os riscos da tomada de decisão. Particularmente no caso das medidas analíticas, são escassas as publicações com essas orientações, especialmente em língua portuguesa. Soma-se a isso o fato de que são muitas as divergências conceituais e as desarmonias de vocabulários entre as publicações existentes, sendo que várias não apresentam consistência estatística e metrológica. Considerando-se a necessidade de se dispor de orientações harmonizadas e cientificamente consistentes dentro do cenário nacional de controle de resíduos e contaminantes em alimentos, assim como atender as crescentes exigências de qualidade dos resultados analíticos (MAPA 2011). Foi com base nos requisitos necessários para validação de metodologia analítica que o método para determinação dos fármacos ácido acetil salicílico, diclofenaco, paracetamol, ibuprofeno e fenoprofeno foi elaborado e validado. A técnica analítica utilizada foi de cromatografia de ultraperformance acoplada a espectrometria de massas tipo Tandem (LC-MS/MS). A metodologia foi aplicada na caracterização de amostras de água superficial (bruta) e tratada proveniente de áreas de captação e de tratamento de água da bacia hidrográfica do Paraíba do Sul. Foram realizadas duas coletas distintas, setembro/ 2010 e novembro/ 2010, nos municípios de Guararema, São José dos Campos, Taubaté e Pindamonhangaba, todos pertencentes à bacia hidrográfica do Rio Paraíba do Sul.

Os dados das incertezas de medição para cada um dos fármacos nos três níveis de estudo de precisão do método, estão demonstrados nas tabelas 4.10, 4.11, 4.12, 4.13 e 4.14.

Tabela 4.10 – Dados de cálculo de incerteza de medição para a determinação do

fármaco ácido acetil salicílico.

| Descrição | Níveis de Estudo de Precisão - Àc Acetil Salicílico | | |
|-----------------------------|---|-------------------------|-------------------------|
| | 1 µg L ⁻¹ | 10 µg L ⁻¹ | 100 µg L ⁻¹ |
| Incerteza combinada | 0,07 µg L ⁻¹ | 0,15 µg L ⁻¹ | 2,59 µg L ⁻¹ |
| Fator de Abrangência | 2 | 2 | 2 |
| Incerteza Expandida | 0,14 µg L ⁻¹ | 0,30 µg L ⁻¹ | 5,18 µg L ⁻¹ |
| | 14% | 3,0% | 5,2% |

Tabela 4.11– Dados de cálculo de incerteza de medição para a determinação do fármaco diclofenaco.

| Descrição | Níveis de Estudo de Precisão - Diclofenaco | | |
|-----------------------------|--|-------------------------|-------------------------|
| | 1 µg L ⁻¹ | 10 µg L ⁻¹ | 100 µg L ⁻¹ |
| Incerteza combinada | 0,05 µg L ⁻¹ | 0,22 µg L ⁻¹ | 4,90 µg L ⁻¹ |
| Fator de Abrangência | 2 | 2 | 2 |
| Incerteza Expandida | 0,10 µg L ⁻¹ | 0,44 µg L ⁻¹ | 9,80 µg L ⁻¹ |
| | 10% | 4,4% | 9,8% |

Tabela 4.12 – Dados de cálculo de incerteza de medição para a determinação do fármaco paracetamol.

| Descrição | Níveis de Estudo de Precisão - Paracetamol | | |
|-----------------------------|--|-------------------------|-------------------------|
| | 1 µg L ⁻¹ | 10 µg L ⁻¹ | 100 µg L ⁻¹ |
| Incerteza combinada | 0,04 µg L ⁻¹ | 0,17 µg L ⁻¹ | 3,56 µg L ⁻¹ |
| Fator de Abrangência | 2 | 2 | 2 |
| Incerteza Expandida | 0,08 µg L ⁻¹ | 0,34 µg L ⁻¹ | 7,12 µg L ⁻¹ |
| | 8% | 3,4% | 7,1% |

Tabela 4.13 – Dados de cálculo de incerteza de medição para a determinação do fármaco ibuprofeno.

| Descrição | Níveis de Estudo de Precisão - Ibuprofeno | | |
|-----------------------------|---|-------------------------|--------------------------|
| | 1 µg L ⁻¹ | 10 µg L ⁻¹ | 100 µg L ⁻¹ |
| Incerteza combinada | 0,09 µg L ⁻¹ | 0,45 µg L ⁻¹ | 8,9 µg L ⁻¹ |
| Fator de Abrangência | 2 | 2 | 2 |
| Incerteza Expandida | 0,18 µg L ⁻¹ | 0,90 µg L ⁻¹ | 17,80 µg L ⁻¹ |
| | 18% | 9,0% | 17,8% |

Tabela 4.14 – Dados de cálculo de incerteza de medição para a determinação do fármaco fenoprofeno.

| Descrição | Níveis de Estudo de Precisão - Fenoprofeno | | |
|-----------------------------|--|-------------------------|-------------------------|
| | 1 µg L ⁻¹ | 10 µg L ⁻¹ | 100 µg L ⁻¹ |
| Incerteza combinada | 0,07 µg L ⁻¹ | 0,32 µg L ⁻¹ | 3,7 µg L ⁻¹ |
| Fator de Abrangência | 2 | 2 | 2 |
| Incerteza Expandida | 0,14 µg L ⁻¹ | 0,64 µg L ⁻¹ | 7,40 µg L ⁻¹ |
| | 14% | 6,4% | 7,4% |

Concluiu-se que o presente estudo foi idealizado e concebido visando fornecer referências conceituais consistentes e pormenorizadas dos critérios analíticos que foram evidenciadas na validação do método analítico desenvolvido para a determinação dos fármacos ácido acetil salicílico, diclofenaco, paracetamol, ibuprofeno e fenoprofeno. As tabelas 4.15, 4.16, 4.17, 4.18 e 4.19, resumem os critérios e resultados obtidos no trabalho de validação da metodologia analítica.

Tabela 4.15 – Resumo dos parâmetros de validação do fármaco ASS

| Parâmetro | Resultado Obtido | Critério* | Avaliação |
|-------------------------|--|--|------------------|
| Seletividade | Ausência de interferentes nos níveis acima de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ | Sinais < 30% do sinal do analito menor nível de precisão calibrado | Conforme |
| Linearidade | $R^2=0,9996$ | $R^2>0,995$ | Conforme |
| Limites de determinação | $Cc\alpha = 0,42 \mu\text{g L}^{-1}$ | Não Estabelecido | Conforme |
| | $CC\beta = 0,51 \mu\text{g L}^{-1}$ | | |
| Veracidade/ Recuperação | Em $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$, Rec média = 98% | Entre 70 e 110% | Conforme |
| | Em $10 \mu\text{g L}^{-1}$, Rec média = 98% | Entre 70 e 110% | Conforme |
| | Em $100 \mu\text{g L}^{-1}$, Rec média = 101% | Entre 80 e 110% | Conforme |
| Repetitividade | Em $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$, SD = 3 | SD < 45 | Conforme |
| | Em $10 \mu\text{g L}^{-1}$, SD = 4 | SD < 32 | Conforme |
| | Em $100 \mu\text{g L}^{-1}$, SD = 2 | SD < 23 | Conforme |
| Reprodutibilidade | Em $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$, CV = 10 | CV < 20 | Conforme |
| | Em $10 \mu\text{g L}^{-1}$, CV = 12 | CV < 20 | Conforme |
| | Em $100 \mu\text{g L}^{-1}$, CV = 9 | CV < 20 | Conforme |
| Robustez | Em $1,0 \mu\text{g L}^{-1} = \text{ok}$ | "Procedimento Analítico Robusto e adequado para as análises de rotina" | Conforme |
| | Em $10 \mu\text{g L}^{-1} = \text{ok}$ | | |
| | Em $100 \mu\text{g L}^{-1} = \text{ok}$ | | |

* 2002/657/EC. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretations of results. Official Journal of the European Communities., L 221/8, 2002.

Tabela 4.16 – Resumo dos parâmetros de validação do fármaco paracetamol

| Parâmetro | Resultado Obtido | Critério* | Avaliação |
|-------------------------|--|--|------------------|
| Seletividade | Ausência de interferentes nos níveis acima de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ | Sinais < 30% do sinal do analito menor nível de precisão calibrado | Conforme |
| Linearidade | $R^2=0,9996$ | $R^2>0,995$ | Conforme |
| Limites de determinação | $Cc\alpha = 0,10 \mu\text{g L}^{-1}$ | Não Estabelecido | Conforme |
| | $CC\beta = 0,21 \mu\text{g L}^{-1}$ | | |
| Veracidade/Recuperação | Em $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$, Rec média = 105% | Entre 70 e 110% | Conforme |
| | Em $10 \mu\text{g L}^{-1}$, Rec média = 93% | Entre 70 e 110% | Conforme |
| | Em $100 \mu\text{g L}^{-1}$, Rec média = 95% | Entre 80 e 110% | Conforme |
| Repetitividade | Em $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$, SD = 5 | SD < 45 | Conforme |
| | Em $10 \mu\text{g L}^{-1}$, SD = 6 | SD < 32 | Conforme |
| | Em $100 \mu\text{g L}^{-1}$, SD = 4 | SD < 23 | Conforme |
| Reprodutibilidade | Em $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$, CV = 8 | CV < 20 | Conforme |
| | Em $10 \mu\text{g L}^{-1}$, CV = 5 | CV < 20 | Conforme |
| | Em $100 \mu\text{g L}^{-1}$, CV = 6 | CV < 20 | Conforme |
| Robustez | Em $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ = ok | "Procedimento Analítico Robusto e adequado para as análises de rotina" | Conforme |
| | Em $10 \mu\text{g L}^{-1}$ = ok | | |
| | Em $100 \mu\text{g L}^{-1}$ = ok | | |

* 2002/657/EC. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretations of results. Official Journal of the European Communities., L 221/8, 2002.

Tabela 4.17 – Resumo dos parâmetros de validação do fármaco diclofenaco

| Parâmetro | Resultado Obtido | Critério* | Avaliação |
|-------------------------|--|--|------------------|
| Seletividade | Ausência de interferentes nos níveis acima de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ | Sinais < 30% do sinal do analito menor nível de precisão calibrado | Conforme |
| Linearidade | $R^2=0,9998$ | $R^2>0,995$ | Conforme |
| Limites de determinação | $Cc\alpha = 0,33 \mu\text{g L}^{-1}$ | Não Estabelecido | Conforme |
| | $CC\beta = 0,45 \mu\text{g L}^{-1}$ | | |
| Veracidade/ Recuperação | Em $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$, Rec média = 99% | Entre 70 e 110% | Conforme |
| | Em $10 \mu\text{g L}^{-1}$, Rec média = 97% | Entre 70 e 110% | Conforme |
| | Em $100 \mu\text{g L}^{-1}$, Rec média = 102% | Entre 80 e 110% | Conforme |
| Repetitividade | Em $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$, SD = 10 | SD < 45 | Conforme |
| | Em $10 \mu\text{g L}^{-1}$, SD = 5 | SD < 32 | Conforme |
| | Em $100 \mu\text{g L}^{-1}$, SD = 3 | SD < 23 | Conforme |
| Reprodutibilidade | Em $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$, CV = 12 | CV < 20 | Conforme |
| | Em $10 \mu\text{g L}^{-1}$, CV = 9 | CV < 20 | Conforme |
| | Em $100 \mu\text{g L}^{-1}$, CV = 5 | CV < 20 | Conforme |
| Robustez | Em $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ = ok | "Procedimento Analítico Robusto e adequado para as análises de rotina" | Conforme |
| | Em $10 \mu\text{g L}^{-1}$ = ok | | |
| | Em $100 \mu\text{g L}^{-1}$ = ok | | |

* 2002/657/EC. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretations of results. Official Journal of the European Communities., L 221/8, 2002.

Tabela 4.18 – Resumo dos parâmetros de validação do fármaco ibuprofeno

| Parâmetro | Resultado Obtido | Critério* | Avaliação |
|-------------------------|--|---|------------------|
| Seletividade | Ausência de interferentes nos níveis acima de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ | Sinais < 30% do sinal do analito menor nível de precisão calibrado | Conforme |
| Linearidade | $R^2=0,9994$ | $R^2>0,995$ | Conforme |
| Limites de determinação | $Cc\alpha = 0,36 \mu\text{g L}^{-1}$ | Não Estabelecido | Conforme |
| | $CC\beta = 0,43 \mu\text{g L}^{-1}$ | | |
| Veracidade/ Recuperação | Em $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$, Rec média = 101% | Entre 70 e 110% | Conforme |
| | Em $10 \mu\text{g L}^{-1}$, Rec média = 102% | Entre 70 e 110% | Conforme |
| | Em $100 \mu\text{g L}^{-1}$, Rec média = 97% | Entre 80 e 110% | Conforme |
| Repetitividade | Em $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$, SD = 5 | SD < 45 | Conforme |
| | Em $10 \mu\text{g L}^{-1}$, SD = 6 | SD < 32 | Conforme |
| | Em $100 \mu\text{g L}^{-1}$, SD = 5 | SD < 23 | Conforme |
| Reprodutibilidade | Em $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$, CV = 9 | CV < 20 | Conforme |
| | Em $10 \mu\text{g L}^{-1}$, CV = 6 | CV < 20 | Conforme |
| | Em $100 \mu\text{g L}^{-1}$, CV = 5 | CV < 20 | Conforme |
| Robustez | Em $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ = ok | "Procedimento Analítico Robusto e adequado para as análises de rotina | Conforme |
| | Em $10 \mu\text{g L}^{-1}$ = ok | | |
| | Em $100 \mu\text{g L}^{-1}$ = ok | | |

* 2002/657/EC. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretations of results. Official Journal of the European Communities., L 221/8, 2002.

Tabela 4.19 – Resumo dos parâmetros de validação do fármaco fenoprofeno

| Parâmetro | Resultado Obtido | Critério* | Avaliação |
|-------------------------|--|--|------------------|
| Seletividade | Ausência de interferentes nos níveis acima de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ | Sinais < 30% do sinal do analito menor nível de precisão calibrado | Conforme |
| Linearidade | $R^2=0,9998$ | $R^2>0,995$ | Conforme |
| Limites de determinação | $Cc\alpha = 0,26 \mu\text{g L}^{-1}$ | Não Estabelecido | Conforme |
| | $CC\beta = 0,39 \mu\text{g L}^{-1}$ | | |
| Veracidade/ Recuperação | Em $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$, Rec média = 102% | Entre 70 e 110% | Conforme |
| | Em $10 \mu\text{g L}^{-1}$, Rec média = 89% | Entre 70 e 110% | Conforme |
| | Em $100 \mu\text{g L}^{-1}$, Rec média = 99% | Entre 80 e 110% | Conforme |
| Repetitividade | Em $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$, SD = 8 | SD < 45 | Conforme |
| | Em $10 \mu\text{g L}^{-1}$, SD = 8 | SD < 32 | Conforme |
| | Em $100 \mu\text{g L}^{-1}$, SD = 3 | SD < 23 | Conforme |
| Reprodutibilidade | Em $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$, CV = 11 | CV < 20 | Conforme |
| | Em $10 \mu\text{g L}^{-1}$, CV = 7 | CV < 20 | Conforme |
| | Em $100 \mu\text{g L}^{-1}$, CV = 7 | CV < 20 | Conforme |
| Robustez | Em $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ = ok | "Procedimento Analítico Robusto e adequado para as análises de rotina" | Conforme |
| | Em $10 \mu\text{g L}^{-1}$ = ok | | |
| | Em $100 \mu\text{g L}^{-1}$ = ok | | |

* 2002/657/EC. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretations of results. Official Journal of the European Communities., L 221/8, 2002.

CAPÍTULO 5

Aplicação da metodologia em amostras de água bruta e tratada das águas do rio Paraíba do Sul

5.1. ÁREA DE ESTUDO

Para conhecer a distribuição destes fármacos no ambiente aquático e possibilitar a aplicação da metodologia desenvolvida neste estudo foram escolhidas as áreas de captação de água destinadas ao abastecimento público das estações de tratamento de água (ETA) dos municípios de Guararema, São José dos Campos, Taubaté e Pindamonhangaba, da Unidade de Gerenciamento de Recursos-Hídricos da Bacia do Rio Paraíba do Sul, UGRHI 2, umas das regiões mais desenvolvidas do Estado de São Paulo.

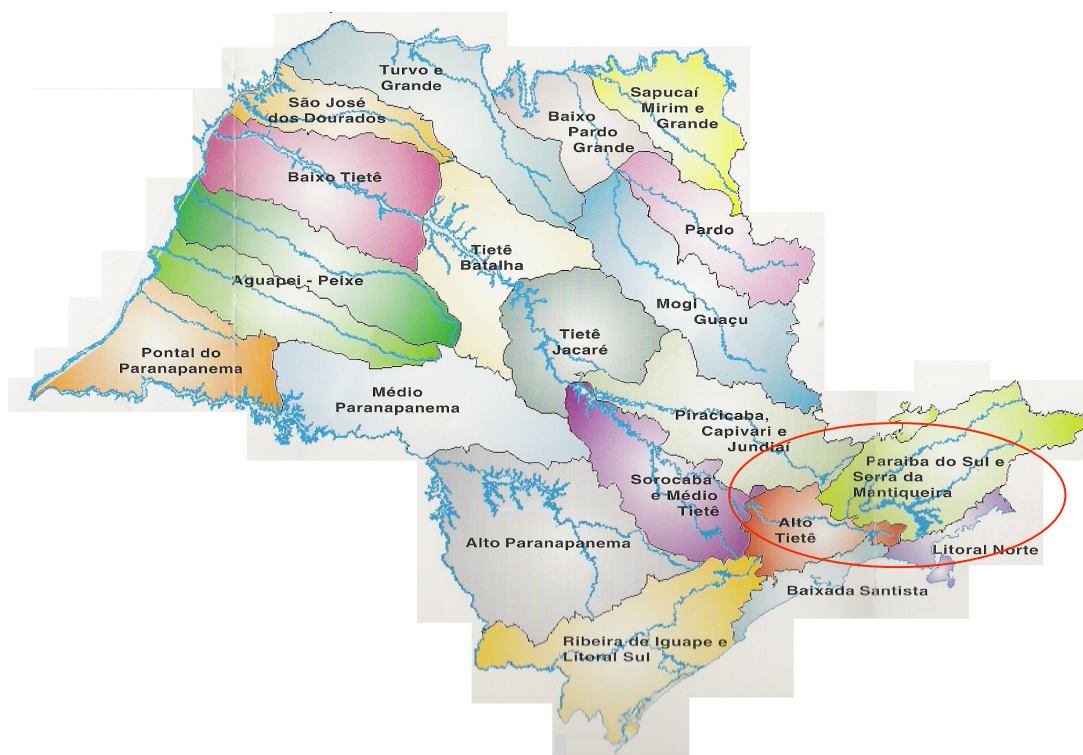


Figura 5.1. Localização da área de estudo: A Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos da Bacia do Rio Paraíba do Sul UGRHI 2.

O Sistema de Saneamento do Vale do Paraíba, denominados de Unidades de Negócio, são geridos e operados pela Companhia de Saneamento do Estado de São Paulo – SABESP. A Sabesp está presente em 367 municípios, dos 645 do estado de São Paulo, operando 800 unidades de produção, 16 laboratórios de controle de qualidade acreditados pela NBR ISO / IEC 17025, 04 diretorias, 07 Unidades de Negócio Metropolitanas e 10 Unidades de Negócio Regionais (interior e litoral).

A Bacia do Rio Paraíba do Sul

A Unidade de Gerenciamento de recursos hídricos da bacia do Rio Paraíba do Sul (UGRHI- 2) está localizada na Região Nordeste do estado de São Paulo e possui uma área de aproximadamente 55.000 km². Essa bacia drena uma das regiões mais desenvolvidas do país, abrangendo parte do Estado de São Paulo, na região conhecida como Vale do Paraíba Paulista, parte do Estado de Minas Gerais, denominada Zona da Mata Mineira, e metade do Estado do Rio de Janeiro. Em toda sua extensão há atualmente 180 municípios, 36 dos quais estão parcialmente inseridos na bacia. O rio Paraíba do Sul resulta da confluência dos rios Paraibuna e Paraitinga no estado de São Paulo, a 1.800 metros de altitude e percorre 1.150 km até desaguar no norte fluminense, no município de São João da Barra (Coppetec, 2006).

A bacia do Rio Paraíba do Sul é limitada ao Norte pelas bacias dos rios Grande e Doce e pelas serras da Mantiqueira, Caparaó e Santo Eduardo. A Nordeste, a bacia do rio Itabapoana estabelece o limite da bacia. Ao Sul, o limite é formado pela Serra dos Órgãos e pelos trechos paulista e fluminense da Serra do

Mar. A Oeste, pela bacia do rio Tietê, da qual é separada por meio de diversas ramificações dos maciços da Serra do Mar e da Serra da Mantiqueira (Gruben, 2002).

A região pode ser considerada um território quase que completamente antrópico, com a Mata Atlântica original restrita a parques e reservas florestais. Cerca de 50% das florestas existentes na bacia do rio Paraíba do Sul encontra-se em Unidades de Conservação, algumas de grande destaque nacional e internacional, como o Parque Nacional de Itatiaia (primeiro Parque Nacional criado no Brasil), o Parque Nacional da Serra dos Órgãos e a Reserva da Biosfera da Mata Atlântica. Unindo os três estados da bacia, destaca-se a APA Federal da Serra da Mantiqueira. Suas águas são utilizadas para abastecimento industrial, preservação da flora e fauna e disposição final de esgotos (Coppetec, 2006; Gruben, 2002).

As principais atividades econômicas na bacia são as indústrias e o setor de agropecuária. A pecuária é a atividade mais representativa do meio rural, podendo-se encontrar áreas de pasto distribuídas por toda a bacia, embora boa parte do que se classifica como campo/pastagem seja de terras degradadas, com pouca ou nenhuma atividade agropecuária. No Estado do Rio de Janeiro, as pastagens representam mais de 70% da cobertura vegetal da bacia do Paraíba do Sul. A criação de gado leiteiro em regime extensivo é a de maior importância econômica na região (Vale do Paraíba, 2008).

É expressivo o número de empresas de grande porte e alto potencial poluente na região. No trecho paulista, desde de 2002 são cerca de 2.500 empresas registradas na CETESB, entre as quais as 19 químicas, 26 metalúrgicas e siderúrgicas, 4 de material elétrico/ eletrônico, uma petroquímica, 3 de papel e

celulose, localizadas principalmente nos municípios de São José dos Campos, Jacareí, Pindamonhangaba, Taubaté, Guaratinguetá, Caçapava, Aparecida e Cruzeiro (Gruben, 2002).

A Sabesp, por intermédio da Unidade de Negócio Vale do Paraíba, opera os 24 municípios e com sede em São José dos Campos.

Estudos recentes na região apontam uma forte incidência de contaminação por cafeína na água tratada, onde a concentração máxima foi de $0,351 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e em água bruta com concentração máxima de $0,632 \mu\text{g.mL}^{-1}$, observando-se uma contaminação principalmente em períodos secos e nas amostras de água bruta (Otomo, 2010).

Este projeto de pesquisa está vinculado a uma parceria IPEN/SABESP, que visa conhecer o comportamento dos disruptores endócrinos no sistema hídrico e nos processos de tratamento de águas e esgotos, bem como a qualidade da água na bacia do rio Paraíba do Sul, SP e do Reservatório Paraibuna – Paraitinga, sob responsabilidade da CESP (Otomo, 2010; Mattos, 2009). O IPEN foi à responsável pela coleta e preservação das amostras, bem como seu transporte.

5.2. ANÁLISE QUANTITATIVA DOS RESÍDUOS DE FÁRMACOS NO AMBIENTE AQUÁTICO

A metodologia desenvolvida foi aplicada na avaliação da qualidade da água bruta e tratada quanto à presença dos fármacos paracetamol, diclofenaco, ácido acetil salicílico, ibuprofeno e fenoprofeno na bacia hidrográfica do Rio Paraíba do Sul.

Foram analisadas as águas superficiais coletadas nas áreas de captação de água destinadas ao abastecimento público e das estações de tratamento de água (ETA's) dos municípios de Guararema, São José dos Campos, Taubaté e Pindamonhangaba, da Unidade de Gerenciamento de Recursos-Hídricos da Bacia do Rio Paraíba do Sul, UGRHI 2. As amostras de água foram concentradas 10 vezes e analisados conforme os métodos 1 e 2. Os resultados das análises dos resíduos estão demonstrados na tabela 5.1.

TABELA 5.1 - Resultados da análise dos resíduos de fármacos nas amostras de água bruta e tratada da região do Vale do Paraíba, referentes às coletas de 07 e 08/09/2010 e 03 e 04/11/2010.

1° COLETA* (concentração em $\mu\text{g.L}^{-1}$)

| Composto | LQ ($\mu\text{g.L}^{-1}$) | IDENTIFICAÇÃO DA ETA/MUNICÍPIO AMOSTRAS ÁGUA TRATADA | | | | AMOSTRAS ÁGUA BRUTA | | | |
|--------------------|--------------------------------|---|--------------------------------------|------------------|----------------|---------------------|-------------------------------|------------------|----------------|
| | | GUARAREMA (ATG) | SÃO JOSÉ DOS CAMPOS (ATSJC) | TAUBATÉ (ATT) | PINDA (ATP) | GUARAREMA (ABG) | SÃO JOSÉ CAMPOS (ABSJC) | TAUBATÉ (ABT) | PINDA (ABP) |
| Paracetamol | 0,10 | ND | ND | ND | ND | 0,20±0,03 | 0,10±0,03 | 0,20±0,03 | 0,50±0,03 |
| Diclofenaco | 0,33 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| AAS | 0,42 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| Ibuprofeno | 0,36 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| Fenoprofeno | 0,26 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |

(*)08/09/2010

(ND) Não detectado resíduos do fármaco até o limite de detecção do método.

2° COLETA (concentração em $\mu\text{g.L}^{-1}$)**

| Composto | LQ ($\mu\text{g.L}^{-1}$) | IDENTIFICAÇÃO DA ETA/MUNICÍPIO AMOSTRAS ÁGUA TRATADA | | | | AMOSTRAS ÁGUA BRUTA | | | |
|--------------------|--------------------------------|---|----------|---------|-------|---------------------|-----------|---------|-------|
| | | GUARAREMA | SÃO JOSÉ | TAUBATÉ | PINDA | GUARAREMA | SÃO JOSÉ | TAUBATÉ | PINDA |
| Paracetamol | 0,10 | ND | ND | ND | ND | ND | 0,20±0,03 | ND | ND |
| Diclofenaco | 0,33 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| AAS | 0,42 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| Ibuprofeno | 0,36 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| Fenoprofeno | 0,26 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |

(**) 04/11/2010

(ND) Não detectado resíduos do fármaco até o limite de detecção do método.

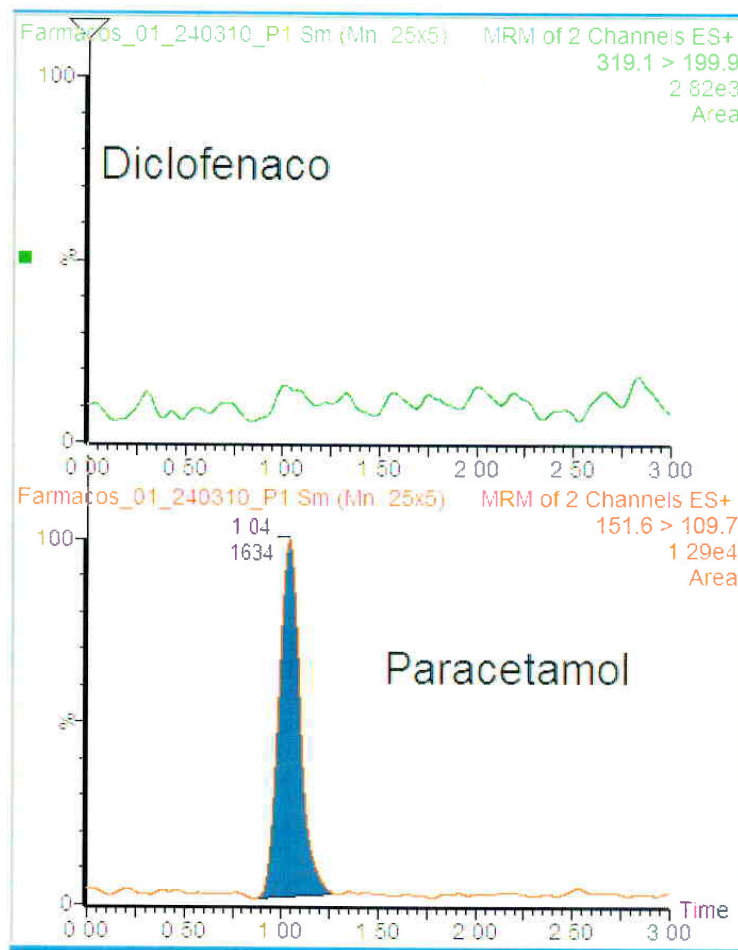


Figura 5.2: Cromatograma de uma amostra de água bruta contaminada por $0,20\mu\text{g L}^{-1}$ de Paracetamol.

Em 31,2 % das amostras, cinco amostras de água bruta das 16 amostras analisadas, foram encontrados resíduos de paracetamol. Os resultados obtidos apresentaram-se em uma faixa de concentração de $0,10$ a $0,50 \mu\text{g L}^{-1}$, com incerteza de medição de $0,03 \mu\text{g L}^{-1}$, para este nível de concentração.

Todos os resultados obtidos, com exceção dos resíduos do fármaco Paracetamol, ficaram abaixo do limite de quantificação dos fármacos analisados.

Para as condições da análise, os resultados indicam um índice de contaminação por Paracetamol nas águas Brutas dos municípios do Vale do Paraíba.

Segundo dados da literatura, a concentração de Paracetamol reportada para águas superficiais estão coerentes.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES FINAIS DO ESTUDO

CONCLUSÃO

O presente trabalho procurou determinar os resíduos de fármacos em amostras de águas bruta e tratada, explorando e validando a técnica de UPLC-MS/MS.

A validação da metodologia desenvolvida para a quantificação dos fármacos: paracetamol, ácido acetil salicílico, diclofenaco de sódio, fenoprofeno e ibuprofeno em água, foi avaliada segundo aos critérios do Inmetro, Eurachem e Directiva Européia. Todos os parâmetros avaliados: especificidade/seletividade, exatidão, precisão, linearidade, limite de quantificação e detecção, robustez e incerteza de medição foram adequados, conforme demonstrados nas tabelas 4.15, 4.16, 4.17, 4.18 e 4.19.

Os resultados apresentados para a aplicação da metodologia para caracterizar os níveis dos resíduos dos fármacos em amostras de águas provenientes de áreas de captação de água para abastecimento público e de estações de tratamento de água, operadas pela Sabesp, foram confiáveis e adequados à qualidade pretendida.

Os resultados permitem concluir que o objetivo de desenvolver, validar e aplicar uma metodologia analítica para a quantificação de múltiplos resíduos dos fármacos ácidos em água foi atingido com a validação de um método de extração e concentração dos fármacos utilizando a determinação por técnica de cromatografia líquida de ultra eficiência com detecção por espectrometria de massas Tandem (UPLC-MS/MS).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária – “Resolução nº 33, de 25/02/2003”. Disponível em <http://www.anvisa.gov/legis/resol/2003/rdc/3303rdc.htm> Acessado em maio de 2009.

ALMEIDA, G. A.; WEBER, R. R. Os fármacos na Represa Billings. **Revista Saúde e Ambiente / Health and Environment Journal**, v. 6, n. 2, 2005.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M.; Fármacos no meio ambiente. **Quim. Nova**, V. 26, nº 4, p. 523-530, 2003

CHAPMAN, J. R. **Practical organic mass spectrometry: a guide for chemical and biochemical analysis**. NY, EUA, 2. ed. New York: John Wiley, 1993. 330 p. AOKI, Y.; HAKAMATA, H.; IGARASHI, Y.; UCHIDA, K.; KOBAYASHI, H.

CLAYDON, M.; DAVEY, S.; EDWARD-JONES, V.; GORDON, D. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. **Nature Biotechnology**, v. 14, n. 11, p. 1584-1586, 1996.

COPPETEC. Associação Pró-Gestão das águas da Bacia Hidrográfica do rio Paraíba do Sul – AGEVAP. **Diagnóstico dos recursos hídricos - Relatório final, 2006**.

EURACHEM, The fitness for purpose of analytical methods- **A laboratory guide to method validation and related topics, Eurachem Guide, 1998**.

FENSELAU, C.; DEMIREV, P. A. Characterization of intact microorganism by MALDI mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 20, n. 4, p. 157-171, 2001.

FENT K., WESTON A.A; CAMINADA D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. **Aquat Toxicol**. 2006 Jun 15;78(2):207.

GROS R ; PERRODI Y; GOBBEY A; GRELIER-VOLATIER L; CANIVET V; FRUGET JF; GIBERT J; TEXIER C; CLUZEAU D; POLY F; JOCTEUR-MONROZIER L. **Waste Manag**. 2002;22(2):215-28

GRUBEN, A.; LOPES, P. D.; JOHNSON, R. M. F. A Bacia do rio Paraíba do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais – 2001. Projeto Marca d'água. Relatórios preliminares 2001. 2002.

HAO C. , ZHAO X. ; YANG, P. GC-MS and HPLC-MS analysis of bioactive pharmaceuticals and personal-care products in environmental matrices. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, Volume 26, Issue 6, June 2007, P. 569-580
Pharmaceutical-residue analysis.

H.P.SINGER, C.TIXIER, S. OELLENS, S.R.MULLER. Occurrence and quantification of six widely used pharmaceuticals in surface Waters, in: Poster presented at **SETAC Conference on Challenges in Environmental RISK Assessment and Modelling Linking** (Conducted by EAWAG). Vienna, Austria 12-16. May 2002.

HIRAYAMA, N.; KOTANI, A.; KUSU, F. Simultaneous determination of azaperone and azaperol in animal tissues by HPLC with confirmation by electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, v. 877, n. 3, p. 166-172, 2009.

HIRSCH, R.; TERNES, T.; HABERER, K.; KRATZ, K.-L.; **Sci. Total Environ.** 1999, 225, 109.

HOFFMANN, E.; STROOTBART, V. **Mass spectrometry: principles and applications. 3.** Ed. West Sussex, England: Wiley-Interscience, 2007. 502 p.

INMETRO. Orientações sobre validação de métodos de ensaio químicos, DOQ-CGCRE-008. Revisão 03 – FEV/2010

INMETRO (2), Vocabulário Internacional de Metrologia: Conceitos Fundamentais e Gerais e Termos Associados (VIM 2008), 1ª Edição Brasileira, Rio de Janeiro, 2009 – [VIM 2009]. Portaria INMETRO nº 319 de 23 de outubro de 2009. 1ª edição brasileira do VIM 2008 (Tradução autorizada pelo BIPM da 3ª edição internacional do VIM - International Vocabulary of Metrology — Basic and general concepts and associated terms - JCGM 200:2008)

KOLPIN, D. W.; FURLOG, E. T.; MEYER, M. T.; THURMAN, E. M.; ZAUGG, S. D.; BARBER, L. B.; BUXTON, H. T.; **Environ. Sci. Technol.** 2002, 36, 1202.

K.V. THOMAS, M.J.HILTON. Target Monitoring Programme for Pharmaceuticals in the Aquatic Environment, R&D Technical Report P6-012/6, Environmental Agency, Bristol, UK,2003.

MARQUES M.N. **Avaliação do impacto de agrotóxico em áreas de proteção ambiental, pertencentes a Bacia Hidrográfica do Rio Ribeira de Iguape, SP. Uma contribuição a análise crítica da legislação sobre padrão de potabilidade.** Tese de doutorado, IPEN, USP, 2005.

M.J.HILTON, K.V.THOMAS. Determination of selected human pharmaceutical compounds in effluent and surface water samples by high-performance liquid chromatography – electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1015 (2003) 129-141.

MORACCI, L.F. **Resíduos de agrotóxicos em lodo de estação de tratamento de água para consumo humano: validação de metodologia analítica utilizando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em Tandem (LC/MS/MS).** Dissertação de mestrado, IPEN - USP. A ser defendida em agosto de 2008.

MULROY A **Water Environ. Technol.** 13: 32. (2001).

N.J.AYSCOUGH, J. FAWHEEL, G.FRANKLIN, W.YOUNG. Review of human Pharmaceutical in the Environment, **R&D Technical Report P390**, Environment Agency, Bristol UK,2000

PARAIBA DO SUL. Disponível em:
http://pt.wikipedia.org/wiki/Rio_Para%C3%ADba_do_Sul. Acessado em: 03 de fevereiro de 2008

RICHARDSON, M. L.; BOWRON, J. M. The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment. **J Pharm Pharmacol**. 1985 Jan;37(1):1-12.

STUMPF, M.; TERNES, T. A.; WILKEN, R.; RODRIGUES, S. V.; BAUMANN, W.; **Sci. Total Environ**. 1999, 225, 135.

SUCHARA, E. A. **Desenvolvimento de metodologias analíticas para a determinação de fármacos em fluidos biológicos e amostras ambientais por cromatografia líquida e gasosa**. Tese de Doutorado, apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.

SWARTZ, M. E. UPLC TM : An Introduction and Review. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, 28: 1253–1263, 2005.

TERNES, T. A.; STUMPF, M.; MUELLER, J.; HABERER, K.; WILKEN, R.-D.; SERVOS, M.; **Sci. Total Environ**. 1999, 225, 81.

UEDA, J.; TAVERANO, R.; MAROSTEGA, V.; PAVAN, W. Impacto ambiental do descarte de fármacos e estudo da conscientização da população a respeito do problema. **Revista Ciências do Ambiente On-Line Julho, 2009 Volume 5, Número 1**.

VERTZONI, M.V. ARCHONTAKI, H.A.; GALANOPOULOU, P. Development and optimization of a reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the determination of acetaminophen and its major metabolites in rabbit plasma and urine the a toxic dose. **Journal of Pharmaceutical and biomedical analysis**, V. 32, p 487-493, 2003.

2002/657/EC. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretations of results. Official Journal of the European Communities., L 221/8, 2002.
<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:221:0008:0036:EN:PDF>

BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTAR

ABNT - NBR ISO/IEC 17025:2005 Requisitos Gerais para a Competência de laboratórios de ensaio e calibração. Associação Brasileira de Normas Técnicas. ABNT, 2005.

ANA – Agência Nacional de Águas. “Legislação Nacional e Internacional. Disponível em: <http://www.ana.gov.br/Institucional/Legislacao/linksLegNacional2.asp>. Acesso em 04/03/2008.

ANKLEY, G.; MIHAICH, E.; STAHL, R.; TILLITT, D.; COLBORN, T.; MCMASTER, S.; MILLER, R.; BANTLE, J.; CAMPBELL, P.; DENSLOW, N.; DICKERSON, R.; FOLMAR, L.; FRY, M.; GIESY, J.; GRAY, L.E.; GUINEY, P.; HUTCHINSON, TH.; KENNEDY, S.; KRAMER, V.; LEBLANC, G.; MAYES, M.; NIMROD, A.; PATINO, R.; PETERSON, R.; PURDY, R.; RINGER, R.; THOMAS, P.; TOUART, L.; VAN DER KRAAK, G.; ZACHAREWSKI, T. Overview of a workshop o screening methods for detecting potential (anti-)estrogenic/androgenic chemicals in wildlife. **Environ. Toxicol. Chem.** 1998, v.17, n°1, p. 68-87.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária – “Resolução nº 105, de 19/05/1999”.

BIRKETT, J. W.; LESTER, J. N.; **Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Processes**, 1st ed., IWA Publishing, Lewis Publishers CRC Press LLC: USA, 2003.

CERVINI, P.; CAVALHEIRO, E.T.G. Determination of Paracetamol at a Graphite-Polyurethane Composite Electrode as an Amperometric Flow Detector. **J. Braz. Chem. Soc.**, Vol. 19, No. 5, 836-841, 2008.

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Guia de coleta e preservação de amostras de água**. 1987.

CONAMA – Ministério de desenvolvimento urbano e meio ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. “Resolução nº 357” de 17/03/2005.

EUROPEAN COMMISSION (1997,1998, 2000, 001).Intercomparison study of two multi-residue methods for the enforcement of EU MRLs for pesticides in fruit, vegetables and grain. REYNOLDS, S.L., FUSSEL R., CALDOW M., JAMES R.,

NAWAZ S., EBDEN C., PENDLINGTON D., LOVELL S., STIJVE T., DISERENS, H. **Progress Reports EUR 17870, EUR 18639, EUR 19306 and EUR 19443**, edited by the European Commission (Directorate General XII, Science, Research and Development), Luxembourg.

GHISELLI, G. e JARDIM, W.F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Quím. Nova.** v.30, n°3, p. 695-706, 2007.

GOETTLICH, P. What are Endocrine Disruptors? in *Fundamentals of Naturopathic Endocrinology*. Dr Friedman Michael Edit. CCNM Press 2005. Rev.8aug(2006) (Disponível em <http://www.mindfully.org/Pesticide/EDs-PWG-16jun01.htm>)

HERNANDO, M.D.; MEZCUA, M.; GÓMEZ, M.J.; MALATO, O.; AGÜERA, A.; FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. Comparative study of analytical methods involving gás chromatography-mass spectrometry after derivatization and gás-chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of selected endocrine disrupting compounds in wastewaters. **J. Chromatogr. A.**, v. 1047, p. 129-135, 2004.

JING, T; RONGHUA, Z; RUIKE ,Z, GANG ,C; WENXING,Peng. Ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of lacidipine in human plasma and its application in a pharmacokinetic study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Volume 47, Issues 4-5, 5 August. 2008, Pages 923-928

JURGEN,M.; MARK, N.; JEF, A.; ANOUCHE, M.; CLAIRE, M., PATRICK, A.; MARCUS,E.B. Novel generic UPLC/MS/MS method for high throughput analysis applied to permeability assessment in early Drug Discovery. **Journal of Chromatography B**, Volume 847, Issue 2, 1 March 2007, Pages 182-187

KAVLOCK, R. J.; DASTON, G.P.; DEROSA, C.; FENNER-CRISP, P. ; GRAY, L.E.; KAATTARI, S.; LUCIER, G.; LUSTER, M.; MAC, M. J.; MACZKA, C.; MILLER, R.; MOORE, J.; ROLLAND, R.; SCOTT, G.; SHEEHAN, D.M.; SINKS, T.; TILSON, H.A. Research Needs for the Risk Assessment of Health and Environmental Effects of Endocrine Disruptors: **A Report of the U.S. EPA-sponsored Workshop Environmental Health Perspectives**, v.104, n°.4, 1996 (Disponível em <http://www.mindfully.org/Pesticide/RJ-Kavlock-et-al-Aug96.htm>)

LINTELMANN, J.; KATAYAMA, A.; KURIHARA, N.; SHORE, L.; WENZEL, A.; Endocrine disruptors in the environment – IUPAC **Technical Report**. Pure Appl. Chem. v. 75 (5), p. 631-681, 2003.

RODRIGUES, J.; CARPINTEIRO, J.B.; QUINTANA, A. M.; CARRO, R. A. LORENZO, R. C. Solid-phase microextraction with on-fiber derivatization for the (neutral) pH and their determination by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1023, p. 183–195, 2004.

SANCO/1085/2000 Rev.2 of 4th December 2000. Laying down performance criteria for the analytical methods to be used for certain substances and residues thereof in live animals and animal products according to Council Directive 96/23/EC.

SANTOS, L.O. dos. **Estudo comparativo entre as técnicas de voltametria em pulso diferencial, espectrofotometria no ultra-violeta e visível e cromatografia líquida de alta eficiência como metodologias analíticas no doseamento da substância química paracetamol**. Dissertação de Mestrado, Fiocruz, RJ, 2003.

SHIMADA, K.; MITAMURA, K.; HIGASHI, T. Gas chromatography and high-performance liquid chromatography of natural steroids; **Journal of Chromatography A**, v. 935, p. 141–172, 2001.

SHUANG, C.; TAOGUANG,H.; WANYU.F.; LINGY, C.; FENG,Q.; FAMEI, L. Quantitative determination of mitiglinide in human plasma by ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry **Journal of Chromatography B**, Volume 868, Issues 1-2, 1 June 2008, Pages 83-87

USEPA-United States Environmental Protection Agency; Research Plan for Endocrine Disruptors, Washington, 1998.

U.S. FOOD and DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Pesticide Analytical Manual (PAM), Volume I**. U.S. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Plant and Dairy Foods and Beverages, 3rd edition (1994, updated in October 1999), chapter 2.

VALE do Paraíba. Disponível em < <http://www.valedoparaiba.com/>>. Acessado em 07de fevereiro de 2008.