

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

CÉSAR AUGUSTO MARASCO JÚNIOR

**DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS COMO CONTAMINANTES EM
ÁGUAS RESIDUÁRIAS UTILIZANDO PREPARO DE AMOSTRA ON-
LINE E LC-MS/MS E APLICAÇÃO DA TÉCNICA MRM-PROFILING
NA AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS DE RELEVÂNCIA AMBIENTAL
(EXPOSOMA)**

ARARAQUARA
2020

CÉSAR AUGUSTO MARASCO JÚNIOR

**DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS COMO CONTAMINANTES EM
ÁGUAS RESIDUÁRIAS UTILIZANDO PREPARO DE AMOSTRA ON-
LINE E LC-MS/MS E APLICAÇÃO DA TÉCNICA MRM-PROFILING
NA AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS DE RELEVÂNCIA AMBIENTAL
(EXPOSOMA)**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Química, área de concentração
Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Clairmont Feitosa de
Lima Gomes

Coorientadora: Dr.^a Bianca Ferreira da Silva

ARARAQUARA
2020

FICHA CATALOGRÁFICA

M298d Marasco Júnior, César Augusto
Determinação de fármacos como contaminantes em águas
residuárias utilizando preparo de amostra on-line e LC-MS/MS e
aplicação da técnica MRM-Profilig na avaliação de compostos de
relevância ambiental (exposoma) / César Augusto Marasco Júnior. –
Araraquara : [s.n.], 2020
161 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto
de Química
Orientador: Paulo Clairmont Feitosa de Lima Gomes
Coorientador: Bianca Ferreira da Silva

1. Preparo de amostras (Química). 2. Cromatografia líquida.
3. Espectrometria de massa. 4. Fármacos. 5. Esgotos - Aspectos
ambientais. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS COMO CONTAMINANTES EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS UTILIZANDO PREPARO DE AMOSTRA ON-LINE E LC-MS/MS, E APLICAÇÃO DA TÉCNICA MRM-PROFILING NA AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS DE RELEVÂNCIA AMBIENTAL (EXPOSOMA)"

AUTOR: CÉSAR AUGUSTO MARASCO JÚNIOR

ORIENTADOR: PAULO CLAIRMONT FEITOSA DE LIMA GOMES

COORIENTADORA: BIANCA FERREIRA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. PAULO CLAIRMONT FEITOSA DE LIMA GOMES (Participação Virtual)
Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof.^a Dr.^a MARIA VALNICE BOLDRIN (Participação Virtual)
Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. MAGNO APARECIDO GONÇALVES TRINDADE (Participação Virtual)
Departamento de Química / Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD - Dourados

Araraquara, 25 de novembro de 2020

DADOS CURRICULARES

Dados Pessoais

Nome: César Augusto Marasco Júnior

Nome em citações bibliográficas: MARASCO JUNIOR, C.A.

Nascimento: 06/11/1995

Nacionalidade: Brasileiro

Naturalidade: Catanduva-SP

Filiação: César Augusto Marasco

Márcia Aparecida Catarino Marasco

E-mail: cesaraugustojunior1@gmail.com

Endereço profissional: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química de Araraquara – Departamento de Química Analítica. Rua Professor Francisco Degni, 55, Quitandinha, CEP: 14800-060-Araraquara, SP – Brasil.

Formação Acadêmica/Titulação

2020 - 2022 Graduação em Tecnologia Gestão da Qualidade
Universidade Paulista

2018 - 2020 Mestrado em Química
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP–Instituto de Química-Araraquara
Dissertação: Determinação de fármacos como contaminantes em águas residuárias utilizando preparo de amostra on-line e LC-MS/MS e aplicação da técnica MRM-Profiling na avaliação de compostos de relevância ambiental (Exposoma)
Orientador: Prof. Dr. Paulo Clairmont Feitosa de Lima Gomes
Coorientadora: Dr.^a Bianca Ferreira da Silva
Bolsista: FAPESP (processo n° 2018/11700-7)

2014 - 2017 Graduação em Licenciatura em Química
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo – Campus Catanduva
Monografia: Efeito da estabilização de cargas nas propriedades luminescentes de hidróxidos duplos lamelares (HDLs) de zinco e alumínio dopados com íons Eu^{3+} e intercalados com ânions orgânicos
Orientador: Prof. Dr. João Henrique Saska Romero
Vínculo: Voluntário

2012 - 2013 Técnico em Química
Escola Técnica Estadual Elias Nechar–Catanduva/São Paulo
Monografia: Composição química das tintas e suas tendências tecnológicas
Orientadora: Prof.^a Ms. Adriana Cossu Vallejo

Formação Complementar

- 2020** Lean Seis Sigma White Belt (Carga horária: 8h)
FM2S Treinamentos – Unicamp/Campinas/SP-Brasil.
- 2020** Gerenciamento de resíduos (Carga horária: 60h)
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia-Bento Gonçalves/RS-Brasil.
- 2017** Segurança em laboratórios (Carga horária: 12h)
TreinoLab, Brasil.
- 2015** Metodologias analíticas para açúcar e etanol (Carga horária: 16h)
Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), Brasil.
- 2015** Boas práticas de laboratório (BPL) (Carga horária: 8h)
AllQuality, Brasil.
- 2014** Operações unitárias e aplicações industriais (Carga horária: 48h)
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia-Catanduva/SP-Brasil.

Atuação Profissional

- 2014-2018** Analista de Controle de Qualidade-COFCO International-Catanduva (SP),
Brasil.
- 2014-2015** Projeto de extensão (voluntário)
Levantamento e disponibilização de banco de dados com propriedades físicas de reagentes químicos e frases de advertência quanto ao seu manuseio, via aplicativo para dispositivos móveis
Orientador: Prof. Ms. Rafael Lilli Fernandes
- 2016-2017** Iniciação Científica (voluntário)
Efeito da estabilização de cargas nas propriedades luminescentes de hidróxidos duplos lamelares (HDLs) de zinco e alumínio dopados com íons Eu^{3+} e intercalados com ânions orgânicos
Orientador: Prof. Dr. João Henrique Saska Romero
- 07/2018-12/2018** Estágio docência (carga horária: 60h)
Química analítica quantitativa (experimental) – Engenharia química
Supervisor: Prof. Dr. Paulo Clairmont Feitosa de Lima Gomes
- 05/2019-10/2019** Estágio de pesquisa - Aston Labs, Purdue University, West Lafayette (Indiana), USA.
MRM-profiling: uma nova ferramenta para detecção de biomarcadores
Orientador: Prof. Dr. R. Graham Cooks
Bolsista: FAPESP (processo n° 2019/03385-7)

Prêmios

2015 Aluno inovador, recebido durante o II Encontro de Inovação e Empreendedorismo do IFSP Campus Catanduva.

Artigos publicados em periódicos

Marasco Junior, C.A.; Luchiari, N.C.; Lima Gomes, P.C.F. Occurrence of caffeine in wastewater and sewage and applied techniques for analysis: a review. *Eclética Química Journal*. 2019;44(4):11-26. DOI: 10.26850/1678-4618eqj.v44.4.11-26.

Luchiari, N.C.; Silva, G.A.; **Marasco Junior, C.A.;** Lima Gomes, P.C.F. Development of miniaturized fluorimetric device for caffeine determination using a smartphone. *RSC Advances*. 2019;9:35033-35038. DOI: 10.1039/c9ra06220c.

Participações em congressos

Junho 02-06, 2019 67th American Society for Mass Spectrometry (ASMS), Atlanta, GA-USA. Determination of pharmaceuticals in wastewater using online extraction by LC-MS/MS.

Outubro 04, 2019 Bindley-Waters Omics Symposium, Purdue University, West Lafayette, IN-USA.

Organizações de eventos

Setembro 18-21, 2019 12nd Center for Analytical Instrumentation Development (CAID) Workshop, Purdue University, West Lafayette, IN-USA.

Trabalhos apresentados em congressos (pôster)

Marasco Junior, C.A.; Silva, B.F.; Lima Gomes, P.C.F. Determination of pharmaceuticals in wastewater using online extraction by LC-MS/MS. In: 67th American Society for Mass Spectrometry (ASMS), 2019, Atlanta, GA-USA.

Fonsêca, M.C.; **Marasco Junior, C.A.;** Dias, D.S.; Silva, B.F.; Lima Gomes, P.C.F. Removal of caffeine in water using sugarcane bagasse biomass as biochar. In: XVIII MRS Meeting (SBPMat), 2019, Balneário Camboriú, SC-BR.

Freitas, G.; **Marasco Junior, C.A.;** Oliveira, R.C. Relato de experiência envolvendo a prática como componente curricular. In: XVI Evento de Educação em Química (EVEQ), 2018, Araraquara, SP-BR.

Trabalhos apresentados em congressos (oral)

Martins, G.S.; **Marasco Junior, C.A.;** Lamarca, R.S.; Fonsêca, M.C.; Silva, B.F.; Lima Gomes, P.C.F. Caffeine transformation products formed during wastewater treatment using a horizontal flow-anaerobic immobilized biomass bioreactor. In: XIV Latin American Symposium on Environmental Analytical Chemistry (LASEAC), 2019, Bento Gonçalves, RS-BR.

Dedico este trabalho a DEUS, por ser autor do meu destino, me guiar durante esta caminhada, sempre me amparar nas horas difíceis, e principalmente, por me dar oportunidade de seguir em busca dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, pois se tive a oportunidade de seguir em busca dos meus sonhos foi por ELE, que permitiu que tudo isso acontecesse ao longo da minha vida. Afinal, DEUS é o maior mestre que alguém pode conhecer e que se apresenta, principalmente, quando parece que não há mais saída.

Gostaria de agradecer aos meus pais César e Márcia, pelo incentivo, amor e carinho. Pelos valores transmitidos e pelos exemplos de pais dedicados, resilientes e de pessoas de bem. Agradeço por sempre me apoiarem e estarem ao meu lado nas minhas decisões, me proporcionando aquilo que eles não puderam ter.

Agradeço também aos meus avós paternos e maternos (Cleoci, Euclides, Olavo e Dirce) e aos meus tios Edson e Michele, pela contribuição valiosa durante todo meu crescimento pessoal e profissional. Claro, não poderia deixar de lembrar da minha prima Isabela, quem acompanhei desde o nascimento e que hoje me proporciona muitos momentos de alegria e descontração.

Agradeço à minha namorada Gabriele que sempre esteve ao meu lado durante o meu percurso acadêmico e por se manter firme e resiliente durante meu estágio de pesquisa nos Estados Unidos, apesar de todas as adversidades enfrentadas durante este período.

Sou grato ao meu orientador Dr. Paulo Clairmont Feitosa de Lima Gomes pela confiança depositada na minha proposta de projeto. Obrigado por me manter motivado durante todo o processo e por me acolher em seu grupo de pesquisa. Agradeço também à minha coorientadora Dr.^a Bianca Ferreira da Silva pelos ensinamentos, incentivo e por indicar a direção correta a seguir para elaboração deste trabalho.

Ao professor Dr. Álvaro José dos Santos-Neto do Instituto de Química de São Carlos e ao Douglas M. Sartore, pelos ensinamentos e troca de experiências na operação do sistema on-line de preparo de amostra, e também por ter cedido toda a infraestrutura do laboratório para preparo e empacotamento da coluna RAM, essencial para andamento deste projeto de pesquisa.

Gostaria de agradecer imensamente ao professor Dr. R. Graham Cooks por me receber em seu grupo de pesquisa na Purdue University, ainda que por um curto período, para realização de um estágio de pesquisa em seu laboratório, fornecendo toda estrutura necessária para realização do projeto e compartilhando um pouco de sua vasta experiência em espectrometria de massas. Não poderia deixar de agradecer também a Dr.^a Christina R. Ferreira, por me acompanhar durante meus experimentos, orientar sobre o andamento do projeto e por compartilhar sua experiência em análises de amostras biológicas, em especial em lipidômica.

Estendo meus agradecimentos a Dr. Jackeline F. Marmolejo, pela grande ajuda com meus experimentos e tratamento de dados e também a Madison, Edwin, Zhuoer e demais integrantes do grupo Aston Labs.

Gostaria de agradecer aos meus companheiros de grupo, em especial ao Mateus, Rafaela e Natália, pelas discussões e ajuda no direcionamento do trabalho, sem falar nos nossos momentos de descontração.

Meus agradecimentos aos meus amigos Josiel, Lilian e Bia, companheiros de trabalho e irmãos na amizade que fizeram parte da minha formação e que vão continuar presentes em minha vida. Em especial, gostaria de agradecer ao João Pedro pelas valiosas discussões e ensinamentos, ao João Ângelo, com quem discutia os melhores jogos para jogar no PlayStation 4, ao João Carlos, por me auxiliar nos momentos de dúvida e, inclusive, me ajudar na coleta de amostras e à minha grande amiga (*big friend*) Kallyni, com quem passei momentos muito bons de descontração, alegria e aprendizado. Muito obrigado a todos por tudo!

Ao Instituto de Química de Araraquara pelo ambiente criativo e amigável que proporciona, e também pelo apoio e infraestrutura necessária para realização e desenvolvimento deste projeto de pesquisa. Ao INCT-DATREM (Processo nº 2014/50945-4) pelo incentivo, pelo apoio financeiro e por proporcionar a utilização dos equipamentos multiusuários necessários para realização deste projeto de pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Processo nº 2018/11700-7) pela bolsa concedida e pelo apoio financeiro para realização desta pesquisa.

Novamente, gostaria de agradecer à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Processo nº 2019/03385-7) pela concessão da bolsa de estágio de pesquisa no exterior – BEPE, no Departamento de Química da Universidade Purdue (West Lafayette, IN-USA) no laboratório de pesquisa Aston Labs coordenado pelo Dr. R. Graham Cooks, e pelo apoio financeiro à pesquisa.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

“Science is a way to satisfy curiosity. And I think that is the best way to be productive.”

(R. Graham Cooks)

“Santo Anjo do Senhor, meu zeloso guardador, se a ti me confiou a piedade divina, sempre me rege, guarda, governa e ilumina. Amém. ”

(Oração ao Anjo da Guarda)

RESUMO

Compostos farmacêuticos e produtos de cuidado pessoal (PPCPs) são substâncias amplamente presentes na sociedade moderna. Estes compostos, conhecidos como contaminantes emergentes, são encontrados no ambiente em níveis de concentração que variam de ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$. Assim, faz-se necessário o desenvolvimento de estudos e métodos analíticos para determinar compostos psicoativos, antibióticos e marcadores de atividade antropogênica em países em desenvolvimento, como no Brasil, onde as condições de saneamento ainda são precárias, seja pela falta de estações de tratamento de esgoto (ETEs) e/ou tratamento adequado dos efluentes. A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa sequencial (LC-MS/MS) tem sido a técnica de escolha para detecção e quantificação desses compostos a baixos níveis de concentração (i.e., ng L^{-1}). Tendo em vista a complexidade das amostras ambientais, é necessário a aplicação da extração em fase sólida (SPE) e/ou de materiais de acesso restrito (RAM) para pré-concentrar os analitos. Estas abordagens, aliado ao modo on-line de preparo de amostras, constituem uma alternativa para diminuir a contaminação cruzada, além de permitir automatização e realização do procedimento de forma sequencial. Os métodos analíticos desenvolvidos foram validados de acordo com diretivas nacionais e internacionais de validação utilizando apenas 50 μL de volume de injeção em água ultrapura e esgoto lab-made, sendo a primeira abordagem considerada para quantificação em virtude do uso de padrões isotópicos individuais. Figuras de mérito como limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), linearidade, precisão intra- e inter-dia e efeito matriz foram avaliadas. Análise de variância (ANOVA) foi aplicada para verificar possível falta de ajuste. Além disso, a fim de verificar a eficiência cromatográfica, resolução (R_s) e assimetria de pico (A_s) foram consideradas; o efeito de memória do sistema também foi avaliado a fim de garantir a confiabilidade da análise e reutilização da coluna de pré-concentração. Com tempos de análise de 24 min (para o cartucho OASIS HLB[®] da Waters) e 16 min (para coluna RAM feita em laboratório), esses métodos mostraram ser alternativas rápidas e viáveis para análise simultânea dos compostos alvo. A linearidade de ambos os métodos mostrou ser adequada, visto que $r^2 > 0,99$ foi obtido para todos os compostos em água ultrapura ou esgoto lab-made (exceto para CBZ em esgoto lab-made no cartucho OASIS e para FLX também em esgoto lab-made na coluna RAM). Os valores de precisão intra- e inter-dia foram inferiores a 10 e 17 %, respectivamente, para o cartucho OASIS e inferiores a 5,8 e 14,1 % para a coluna RAM. Em ambos os métodos, cafeína foi o composto amplamente detectado, atingindo concentração máxima de 715 $\mu\text{g L}^{-1}$ na análise utilizando o cartucho de pré-concentração OASIS e 392 $\mu\text{g L}^{-1}$ na análise utilizando a coluna RAM. Uma estratégia exploratória simples e informativa aplicada à análise de produtos químicos de exposição ambiental em amostras biológicas foi desenvolvida utilizando a técnica MRM-profiling, que apontou e confirmou a presença de quatro compostos alvo dentre os 87 avaliados em amostras de urina humana, sendo eles metformina, acrilamida, acetaminofeno e metoprolol.

Palavras-chave: contaminantes emergentes; cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa sequencial; preparo de amostra on-line; águas residuárias; material de meio de acesso restrito; exposoma; MRM-profiling.

ABSTRACT

Pharmaceutical compounds and personal care products (PPCPs) are substances widely present in modern society. These compounds, known as emerging contaminants, are found in the environment at concentration levels ranging from ng L^{-1} to $\mu\text{g L}^{-1}$. Thus, it is necessary to develop studies and analytical methods to determine psychoactive compounds, antibiotics and markers of anthropogenic activity in developing countries, such as Brazil, where sanitation conditions are still precarious, either due to the lack of wastewater treatment plants (WWTPs) and/or suitable effluents treatment. High performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) has been the technique of choice for detecting and quantifying these compounds at background concentrations (i.e., ng L^{-1}). Due the complexity of the environmental samples, it is necessary to apply solid phase extraction (SPE) and/or restricted access media (RAM) to pre-concentrate the analytes. These approaches combined with the online method of sample preparation are an alternative to decrease cross-contamination, in addition to allowing automation and carrying out the procedure sequentially. The analytical methods developed were validated according to national and international validation guidelines using only 50 μL of injection volume in ultrapure water and lab-made sewage, being the first approach being considered for quantification due to the use of individual isotopic labeled standards. Figures of merit such as limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), linearity, intra- and inter-day precision and matrix effect were evaluated. Analysis of variance (ANOVA) was applied to verify possible lack of fit. In addition, in order to verify the chromatographic efficiency, resolution (R_s) and peak asymmetry (A_s) were considered; carryover was also evaluated in order to ensure analysis reliability and reuse preconcentration column reusability. With analysis times of 24 min (for Waters' OASIS HLB® cartridge) and 16 min (for RAM column), the methods proved to be fast and viable alternatives for simultaneous analysis of the target compounds. The methods' linearity proved to be suitable, since $r^2 > 0,99$ was obtained for all compounds in ultrapure water and lab-made sewage (except for CBZ in lab-made sewage on OASIS cartridge and for FLX also in lab-made sewage on RAM column). The intra- and inter-day precision values were less than 10 and 17 %, respectively, for the OASIS cartridge and less than 5,8 and 14,1 % for the RAM column. In both methods, caffeine was the compound widely detected, reaching a maximum concentration of $715 \mu\text{g L}^{-1}$ in the analysis using the OASIS pre-concentration cartridge and $392 \mu\text{g L}^{-1}$ in the analysis using the RAM column. A simple and informative exploratory strategy applied to the analysis of environmental exposure chemicals in biological samples was developed using the MRM-profiling mass spectrometry, which suggested and confirmed the presence of four target compounds among the 87 evaluated in human urine samples, being them metformin, acrylamide, acetaminophen and metoprolol.

Keywords: emerging contaminants, liquid chromatography tandem mass spectrometry, online sample preparation, wastewaters, restricted access media material, exposome, MRM-profiling.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Fluxograma de rota de entrada de fármacos no ambiente.	26
Figura 1.2 - Levantamento bibliográfico para trabalhos brasileiros que continham os termos “emerging contaminants and wastewater” no título, abstract e/ou palavras-chave no período de 2010-2020 na plataforma Scopus.	31
Figura 1.3 - Etapas analíticas de preparo de amostra utilizando extração em fase sólida: 1) condicionamento; 2) carregamento da amostra; 3) limpeza (clean-up); 4) eluição.	52
Figura 1.4 - Sistema de comutação de colunas no modo backflush (eluição ocorre em sentido reverso ao de pré-concentração).	54
Figura 2.1 - Pontos de amostragem de Araraquara-SP (A), Bueno de Andrada-SP (B) e São Carlos-SP (C).	77
Figura 2.2 - Cromatograma de íons extraídos (XIC) de solução padrão 150 µg L ⁻¹ : CAF (195>138), NOR (320>276), CIP (332>288), VEN (278>58), CBZ (237>194), and FLX (310>148) com os respectivos tempos de retenção dos analitos.	79
Figura 2.3 - Efeito matriz observado para cada composto alvo em amostras de esgoto lab-made.	85
Figura 2.4 - Cromatograma de íons extraídos (XIC) de amostra de água residuária: CAF (195>138), NOR (320>276), CIP (332>288), VEN (278>58), CBZ (237>194), and FLX (310>148).	87
Figura 2.5 - Variação da concentração (µg L ⁻¹) por mês dos fármacos analisados nas amostras de afluente das ETEs A e B.	91
Figura 2.6 - Gráfico comparativo de concentração total dos analitos alvo do estudo, em µg L ⁻¹ , nos meses de outubro a janeiro, para as amostras de afluente e efluente das ETEs A e B.	93
Figura 3.1 - Cromatograma de íons extraídos (XIC) de solução padrão 200 µg L ⁻¹ : CAF (195>138), NOR (320>276), CIP (332>288), VEN (278>58), CBZ (237>194), and FLX (310>148) com os respectivos tempos de retenção dos analitos.	112
Figura 3.2 - Cromatograma de íons extraídos (XIC) de amostra de água residuária: CAF (195>138), VEN (278>58), CBZ (237>194), and FLX (310>148).	119
Figura 4.1 - Visão geral do arranjo experimental realizado para as amostras de urina humana (310 MRMs selecionados para analisar 12 amostras de urina humana).	135
Figura 4.2 - Programação de eluição de gradiente baseada no eluente B (acetonitrila com 0,1 % de ácido fórmico), com vazão de 0,6 mL min ⁻¹ , utilizada na separação cromatográfica de metformina, metoprolol, acetaminofeno, acrilamida e paraxantina.	139
Figura 4.3 - Cromatograma de íons totais (TIC) de solução padrão 300 µg L ⁻¹ : METF (130>71); ACRL (72>55); PRXT (181>124); ACTM (152>110) e METP (268>116).	142
Figura 4.4 - Cromatograma de íons extraídos (XIC) dos compostos detectados nas amostras de urina humana: METF (130>71); ACRL (72>55); ACTM (152>110) e METP (268>116).	143

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Propriedades dos analitos em estudo.....	36
Tabela 1.2 - Ocorrência de fármacos em águas residuárias em estudos anteriormente publicados.....	39
Tabela 1.3 - Ocorrência de fármacos em águas residuárias em estudos nacionais anteriormente publicados.....	42
Tabela 1.4 - Correlação das características dos sistemas de SPE on-line e off-line.....	53
Tabela 2.1 - Lista de compostos com íons precursores e produtos, bem como os parâmetros para detecção de MS e tempo de retenção do método SRM.	72
Tabela 2.2 - Programação de eluição gradiente utilizada na bomba 1.	73
Tabela 2.3 - Programação de eluição gradiente utilizada na bomba 2.	74
Tabela 2.4 - Valores de linearidade, precisão intra-dia e inter-dia e pesos empíricos obtidos na validação do método em água ultrapura.	83
Tabela 2.5 - Valores de linearidade, precisão intra-dia e inter-dia e pesos empíricos obtidos na validação do método em esgoto lab-made.....	84
Tabela 2.6 - Valores de pH e condutividade obtidos das amostras analisadas.....	86
Tabela 2.7 - Concentrações de compostos farmacêuticos ($\mu\text{g L}^{-1}$) e relação sinal/ruído (S/N), entre parênteses, obtidas através da análise de afluente e efluente das ETEs A e B.....	88
Tabela 2.8 - Concentrações de compostos farmacêuticos ($\mu\text{g L}^{-1}$) obtidas através da análise de esgoto doméstico (São Carlos, SP, Brasil) e efluente hospitalar (HCRP, Ribeirão Preto, SP, Brasil).	89
Tabela 2.9 - Ocorrência dos compostos alvo em amostras de águas residuárias.	90
Tabela 3.1 - Lista de compostos com íons precursores e produtos, bem como os parâmetros para detecção de MS e tempo de retenção do método SRM.	107
Tabela 3.2 - Programação de eluição gradiente utilizada na bomba 1.	109
Tabela 3.3 - Valores de linearidade, precisão intra-dia e inter-dia e pesos empíricos obtidos na validação do método em água ultrapura.	116
Tabela 3.4 - Valores de linearidade, precisão intra-dia e inter-dia e pesos empíricos obtidos na validação do método em esgoto lab-made.....	117
Tabela 3.5 - Efeito matriz observado para cada composto alvo em amostras de esgoto lab-made.	118
Tabela 3.6 - Concentrações de compostos farmacêuticos ($\mu\text{g L}^{-1}$) e relação sinal/ruído (S/N), entre parênteses, obtidas através da análise de afluente e efluente das ETEs A e B.....	120
Tabela 3.7 - Concentrações de compostos farmacêuticos ($\mu\text{g L}^{-1}$) obtidas através da análise de esgoto doméstico (São Carlos, SP, Brasil) e efluente hospitalar (HCRP, Ribeirão Preto, SP, Brasil).	121
Tabela 3.8 - Ocorrência dos compostos alvo em amostras de águas residuárias.	123
Tabela 3.9 - Comparação entre os métodos desenvolvidos em água ultrapura para a FLX..	124
Tabela 4.1 - Lista de compostos com íons precursores e produtos, bem como os parâmetros para detecção de MS e tempo de retenção (RT) usados para o método SRM.....	138
Tabela 4.2 – Fold change, mudança observada entre a medida original (branco) e a medida real (amostra), para os compostos METF, METP, ACTM, PRXT e ACRL, possivelmente, presentes nas amostras de urina humana.	140

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

GAO: Government Accountability Office

ETEs: estações de tratamento de esgoto

PCBs: bifenilas policloradas

ONU: Organização das Nações Unidas

UNICEF: Fundo das Nações Unidas para a Infância

ANA: Agência Nacional de Águas

SNIS: Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento

EUA/US: Estados Unidos

EU: União Europeia

EPA: Environmental Protection Agency

CWA: Clean Water Act

SDWA: Safe Drinking Water Act

PPCPs: fármacos e produtos de cuidado pessoal

FQPA: Food Quality Protection Act

CCL: Contaminant Candidate List

UCMR: Unregulated Contaminant Monitoring Rule

EDSP: Endocrine Disruptor Screening Program

EEA: European Environment Agency

EU WFD: European Water Framework Directive

REACH: Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals

NORMAN: Network of reference laboratories, research centres and related organisations for monitoring of emerging environmental substances

CETESB: Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

ABES: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental

K_{ow} : coeficiente de partição octanol/água

CAF: cafeína

CBZ: carbamazepina

CIP: ciprofloxacina

NOR: norfloxacina

PAHO: Pan American Health Organization

WHO: World Health Organization

FLX: fluoxetina

VEN: venlafaxina

ToxCast: Toxicity Forecaster

Embrapa: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

RAFA: reator anaeróbio de fluxo ascendente

UASB: upflow anaerobic sludge blanket

MBR: biorreator de membrana

HAIB: anaeróbio horizontal de leito fixo

AOPs: processos oxidativos avançados

UV: ultravioleta

Q: quadrupolo com armadilha de íons linear

QTrap: quadrupolo com armadilha de íons linear

QToF: quadrupolo com tempo de voo

LIT: ion trap linear

LC-MS/MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial

GC-MS: cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

SPE: extração em fase sólida

LLE: extração líquido-líquido

PVP-DVB: polivinilpirrolidona-divinilbenzeno

SPDE: extração dinâmica em fase sólida

MEPS: microextração por sorvente empacotado

SBSE: extração sortiva por barra de agitação

MSPD: dispersão da matriz em fase sólida

SPME: microextração em fase sólida

RAM: materiais de acesso restrito

BSA: albumina do soro bovino/ albumina sérica bovina

CAF-¹³C₃: cafeína-trimetil-¹³C₃

CBZ-D₁₀: carbamazepina-D₁₀

CIP-D₈: ciprofloxacina-D₈

FLX-D₆: fluoxetina-D₆

NOR-D₅: norfloxacina-D₅

VEN-D₆: venlafaxina-D₆

MeOH: metanol

ACN: acetonitrila

LC/HPLC: cromatografia líquida de alta performance
ESI: electrospray
FIA: análise por injeção em fluxo
CUR: gás de cortina
CAD: gás de colisão
TEM: temperatura da fonte
IS: voltagem do íon spray
GS1: gás de nebulização
GS2: gás secante
DP: potencial de decaimento
CE: energia de colisão
EP: potencial de entrada
CEP: potencial de entrada da célula de colisão
CXP: potencial de saída de célula de colisão
ESI+: ionização positiva
SRM: monitoramento de reação selecionado
Q1: primeiro quadrupolo
Q3: terceiro quadrupolo
 m/z : relação massa/carga
TCC: compartimento de coluna termostatizado
As: assimetria
Rs: resolução
Q: transição para quantificação
q: transição para confirmação
LD: limite de detecção
LQ: limite de quantificação
WLSLR: regressão linear de mínimos quadrados ponderados
ANOVA: análise de variância
RSD: desvio padrão relativo
S/N: relação sinal/ruído
EM: efeito da matriz
DQO: demanda química de oxigênio
HCRP: Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto

XIC: cromatograma de íons extraídos

Tf: fator de cauda

QC: controle de qualidade

TSCA: Toxic Substances Control Act

NIOSH: National Institute for Occupational Safety and Health

MS: espectrometria de massas

CE: energia de colisão

METF: metformina

METP: metoprolol

ACTM: acetaminofeno

ACRL: acrilamida

PRXT: paraxantina

TIC: cromatograma de íons totais

HRMS: espectrometria de massas de alta resolução

ID: identificação

Prec: varreduras de íon precursor

NL: varreduras de perda neutra

MRM: monitoramento de reação múltipla

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	21
INTRODUÇÃO	22
OBJETIVOS GERAIS	24
Capítulo 1	25
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: CONTAMINANTES EMERGENTES EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS E ASPECTOS RELACIONADOS AO TEMA	26
1.1 Contaminantes emergentes e legislação.....	26
1.2 Fármacos como contaminantes emergentes e a ocorrência em águas residuárias.....	33
1.3 Efeitos ecotoxicológicos relacionados à presença dos contaminantes emergentes no ambiente	44
1.4 Breve discussão acerca das tecnologias de remoção.....	46
1.5 Do preparo de amostra a técnicas aplicadas para análise de contaminantes emergentes	49
REFERÊNCIAS	56
Capítulo 2	67
2 MÉTODO AUTOMATIZADO PARA DETERMINAR COMPOSTOS FARMACÊUTICOS EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS UTILIZANDO EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA ON-LINE ACOPLADA A LC-MS/MS.....	68
2.1 INTRODUÇÃO	68
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	70
2.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	70
2.3.1 Reagentes.....	70
2.3.2 Método on-line SPE-LC-MS/MS	71
2.3.2.1 Parâmetros instrumentais MS/MS.....	71
2.3.2.2 Cromatografia líquida.....	72
2.3.3 Validação do método	75
2.3.4 Coleta e preparo de amostra	77

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
2.4.1 On-line SPE-LC-MS/MS.....	78
2.4.2 Validação do método	81
2.4.3 Aplicação em amostras de águas residuárias.....	86
2.4.3.1 Determinação de fármacos em amostras de ETEs.....	86
2.4.3.2 Variação dos compostos alvo em diferentes meses.....	91
2.5 CONCLUSÃO.....	93
REFERÊNCIAS	95
Capítulo 3	103
3 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA ON-LINE DE BAIXO CUSTO ACOPLADA A LC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FARMACÊUTICOS EM AMOSTRAS DE ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS (AFLUENTES E EFLUENTES).....	104
3.1 INTRODUÇÃO	104
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	105
3.3 MATERIAIS E MÉTODOS	105
3.3.1 Reagentes.....	105
3.3.2 Método on-line RAM-LC-MS/MS.....	106
3.3.2.1 Parâmetros instrumentais MS/MS	106
3.3.2.2 Preparo de coluna RAM	108
3.3.2.3 Cromatografia líquida.....	108
3.3.3 Validação do método	110
3.3.4 Amostragem e preparo de amostra	111
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	112
3.4.1 SPE on-line RAM-LC-MS/MS	112
3.4.2 Validação do método	114
3.4.3 Aplicação nas amostras	118
3.5 CONCLUSÃO.....	125

REFERÊNCIAS	126
Capítulo 4	132
4 UMA ABORDAGEM RÁPIDA E ALTERNATIVA PARA DETECTAR COMPOSTOS DE EXPOSIÇÃO AMBIENTAL UTILIZANDO MRM-PROFILING PARA ANÁLISE EXPLORATÓRIA EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	133
4.1 INTRODUÇÃO	133
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	134
4.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	134
4.3.1 Preparo de amostra	134
4.3.2 Fundamentação da técnica MRM-profiling para análise de exposoma.....	134
4.3.3 Análise e tratamento de dados	137
4.3.4 Validação de método por LC-MS/MS.....	137
4.3.4.1 Reagentes.....	137
4.3.4.2 Condições espectrometria de massas.....	137
4.3.4.3 Análises por cromatografia líquida.....	138
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	139
4.4.1 MRM-profiling aplicado nas amostras de urina humana	139
4.4.1.1 Etapa de identificação nas amostras de urina	141
4.4.2 Validação analítica por LC-MS/MS	141
4.5 CONCLUSÃO.....	144
REFERÊNCIAS	145
APÊNDICE A – Lista de compostos selecionados para o estudo de exposoma.....	149
APÊNDICE B – Varreduras de íons produto	156
Capítulo 5	159
5.1. CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS	160

APRESENTAÇÃO

A presente dissertação apresenta o desenvolvimento e validação de método cromatográfico acoplado a espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) utilizando automatização na etapa de preparo de amostra para determinação de cafeína, carbamazepina, ciprofloxacina, norfloxacina, venlafaxina e fluoxetina em águas residuárias (afluente e efluente de estações de tratamento de esgoto, efluente doméstico e hospitalar), visando contribuir para os estudos de determinação de contaminantes emergentes em matrizes aquáticas no país. Para melhor compreensão, este estudo foi dividido em seis capítulos.

O capítulo 1 apresenta um panorama da literatura científica e o estado da arte dos contaminantes emergentes no mundo e no Brasil, abordando ocorrência e aspectos regulatórios, efeitos ecotoxicológicos, tecnologias de remoção e uma explanação sobre preparo de amostra a técnicas aplicadas para análise de contaminantes emergentes.

O capítulo 2 descreve o desenvolvimento e validação do método, e posterior quantificação dos analitos nas amostras de águas residuárias, utilizando na etapa de preparo de amostra o cartucho OASIS HLB® da Waters. De maneira similar, o capítulo 3 descreve as mesmas etapas, no entanto a discussão deu-se com a utilização de uma coluna de pré-concentração de material de acesso restrito (RAM) feita em laboratório.

O capítulo 4 apresenta os resultados obtidos de um estágio no exterior financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP BEPE n° 2019/03385-7) que trata de um estudo da utilização da técnica MRM-profiling aplicada na análise de compostos de exposição ambiental em amostras biológicas, estando inserido no campo de exposoma, cuja estratégia exploratória simples e informativa pode ser facilmente aplicada à análise exploratória de produtos químicos ambientais existentes e novos oferecendo um screening rápido da amostra.

Por fim, o capítulo 5 apresenta uma conclusão geral sobre os estudos apresentados e descritos nos capítulos anteriores e as perspectivas quanto a utilização e aplicação futura dos mesmos.

INTRODUÇÃO

A presença de fármacos de diversas classes terapêuticas no ambiente tem gerado imensa preocupação na comunidade científica. Trata-se de compostos desenvolvidos para que em baixas concentrações possam ter efeitos terapêuticos eficazes tanto na medicina como animal. Entretanto, apesar de serem eficientes no tratamento, os fármacos não são totalmente absorvidos pelo organismo, sendo excretados na forma de metabólitos ou na sua forma administrada, ou até mesmo, descartados incorretamente após o vencimento.

São encontrados no ambiente em níveis de concentração que variam de ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$ em afluentes/efluentes de estações de tratamento de efluente (ETEs), esgotos não tratados ou em outros corpos d'água. Conhecidos como contaminantes emergentes, estes compostos podem representar risco a saúde humana e ao ambiente, visto que não há nenhuma legislação estabelecida que regulamente o descarte e controle destes compostos, e também devido ao fato de que as atuais ETEs não foram projetadas para tratar e/ou remover completamente compostos nestes níveis de concentração ^{1,2}.

Diante do intenso consumo de medicamentos devido ao aumento populacional e da presença destes compostos no ambiente, faz-se necessário o desenvolvimento de estudos e métodos analíticos para determinar compostos psicoativos, antibióticos e marcadores de atividade antropogênica em países em desenvolvimento, como no Brasil, onde as condições de saneamento ainda são precárias, seja pela falta de ETEs e/ou tratamento adequado dos efluentes.

A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa sequencial (LC-MS/MS) tem sido a técnica de escolha para separação, detecção e quantificação desses compostos, visto que é uma técnica com elevada sensibilidade e seletividade que permite atingir os níveis de concentração exigidos para determinação destes contaminantes ³.

Tendo em vista a complexidade das amostras ambientais, é necessário a aplicação da extração em fase sólida (SPE) e/ou de meios de acesso restrito (RAM) para pré-concentrar os analitos. Estas abordagens aliado ao modo on-line de preparo de amostras constituem uma alternativa para diminuir a contaminação cruzada, além de permitir automatização e realização do procedimento de forma sequencial ⁴. Por exemplo, ao nosso relativo conhecimento, podemos considerar que esta é a primeira vez que um método automatizado com injeção direta de amostras de águas residuárias foi descrito para a determinação simultânea dos seis fármacos cafeína, ciprofloxacina, norfloxacina, carbamazepina, venlafaxina e fluoxetina usando sorvente RAM no modo on-line de preparo de amostras para análises de águas residuárias no Brasil.

(1) MONTAGNER, C. C.; VIDAL, C.; ACAYABA, R. *Química Nova*, v. 40, n. 9, p. 1094-1110, 2017.

(2) CHINNAIYAN, P. et al. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 190, n. 5, p. 288, 2018.

(3) GUSMAROLI, L.; INSA, S.; PETROVIC, M. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 410, n. 17, p. 4165-4176, 2018.

(4) BORGES, K. B.; FIGUEIREDO, E. C. DE; QUEIROZ, M. E. C. 1. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2015.

Outra estratégia utilizada, sabendo da presença destes contaminantes no ambiente, se deu na tentativa de tentar identificá-los previamente em amostras biológicas. Para isso, uma estratégia exploratória simples e informativa aplicada à análise de produtos químicos de exposição ambiental em amostras biológicas foi desenvolvida utilizando o MRM-profiling (Multiple Reaction Monitoring-profiling), que apontou e confirmou a presença de quatro compostos alvo dentre os 87 avaliados (ainda que os compostos anteriores estivessem inseridos na investigação) em amostras de urina humana, sendo eles metformina, acrilamida, acetaminofeno e metoprolol.

OBJETIVOS GERAIS

O presente estudo tem como objetivo principal determinar os fármacos ciprofloxacina, norfloxacin, fluoxetina e venlafaxina e dos marcadores de atividade antropogênica, cafeína e carbamazepina, possivelmente presentes em águas residuárias. Como parte integrante do trabalho, objetiva-se também:

- ❖ Desenvolver método para determinação de fármacos em águas residuárias utilizando LC-MS/MS e validar seguindo diretrizes nacionais e internacionais;
- ❖ Comparar SPE on-line usando fase comercial (OASIS HLB[®] da Waters) versus colunas de meio de acesso restrito (RAM) feitas em laboratório;
- ❖ Aplicar o método em amostras de afluente e efluente de estação de tratamento de esgoto da cidade e região de Araraquara (SP, Brasil), esgoto doméstico coletado em São Carlos (SP, Brasil) e efluente hospitalar coletado do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (SP, Brasil);
- ❖ Avaliar a uso da técnica de MRM-profiling mass spectrometry como ferramenta exploratória e informativa aplicada à análise de produtos químicos de exposição ambiental em amostras biológicas.

Capítulo 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: CONTAMINANTES EMERGENTES EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS E ASPECTOS RELACIONADOS AO TEMA

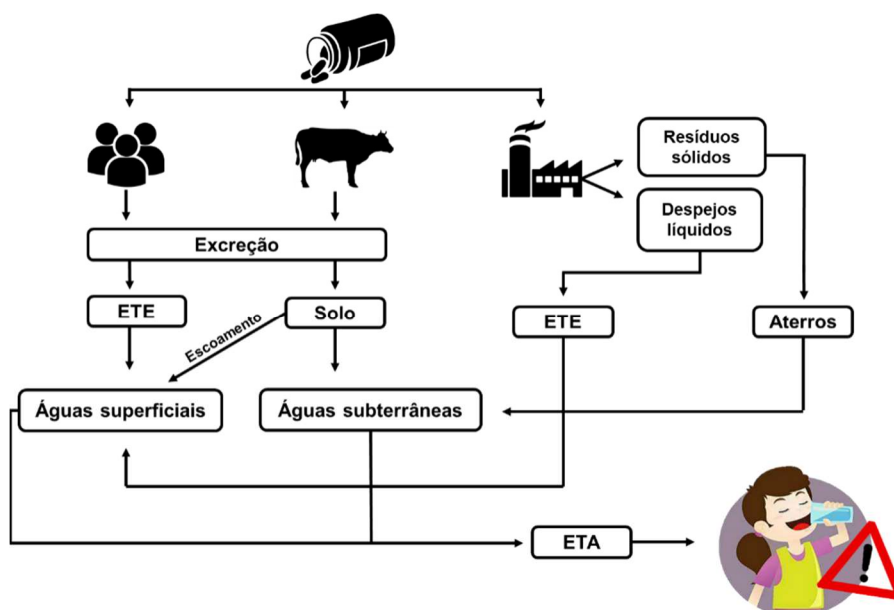
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: CONTAMINANTES EMERGENTES EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS E ASPECTOS RELACIONADOS AO TEMA

1.1 Contaminantes emergentes e legislação

O desenvolvimento de diversos segmentos industriais, principalmente da indústria farmacêutica, impulsionado pelo aumento populacional, tem culminado no consumo cada vez mais elevado de fármacos e de produtos de higiene pessoal ^{1,2}. Segundo o Government Accountability Office (GAO), cerca de 1500 novos compostos químicos são inseridos a cada ano no ambiente ³.

Após a ingestão, e de acordo com a farmacodinâmica e farmacocinética inerente a cada fármaco, eles são metabolizados pelo corpo e uma parte significativa acaba por ser excretado no esgoto doméstico. Outra forma com que estes compostos atingem o ambiente é por meio das águas residuárias, através do descarte inadequado do medicamento na rede de esgoto após o vencimento. O mesmo processo ocorre quando os medicamentos são usados no tratamento veterinário, seja para fins profiláticos ou como promotores de crescimento. Ainda, resíduos gerados pelas indústrias farmacêuticas durante o processo de produção dos medicamentos podem implicar na contaminação direta dos recursos hídricos caso não haja tratamento prévio adequado para posterior descarte ^{1,4,5}. A **Figura 1.1** ilustra as inúmeras fontes das quais estas substâncias são provenientes:

Figura 1.1 - Fluxograma de rota de entrada de fármacos no ambiente.



Fonte: Adaptado de Quesada et al. (2019) ⁶.

Conhecidos como contaminantes emergentes, esses compostos estão presentes diariamente na sociedade moderna, e os potenciais efeitos nocivos que podem acarretar ao ser humano e ao meio ambiente tem gerado atenção e alerta, visto que não possuem uma legislação específica, cujas autoridades e órgãos competentes possuam a obrigatoriedade de controlá-los no ambiente ^{1,7,8}.

São encontrados no ambiente em concentrações que variam de ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$, presentes em afluentes e efluentes de estações de tratamento de esgoto (ETEs) e águas subterrâneas ^{6,9}. Aliado a este fato, outro fator importante que permite com que estes compostos sejam persistentes, se deve pelo fato de que as atuais estações de tratamento de esgoto foram projetadas para diminuir e/ou remover os microrganismos patógenos, tais como coliformes termotolerantes, vírus entéricos e a carga de poluentes orgânicos/inorgânicos a fim de evitar a eutrofização de lagos e rios nos quais estas águas residuárias são despejadas ¹⁰.

Em relação a carga de poluentes orgânicos, os fenóis clorados e não clorados, ftalatos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, benzeno clorados e poluentes orgânicos persistentes, como os praguicidas e bifenilas policloradas (PCBs), são algumas das classes de substâncias potencialmente tóxicas a serem determinadas segundo a resolução CONAMA¹ 375/2006. Já os poluentes inorgânicos constantes na mesma legislação são, em geral, metais como arsênio, cádmio, chumbo, mercúrio, cobre e cromo.

No Brasil, estima-se que 99 % das ETEs operem baseadas no tratamento convencional ⁸. Isso significa que as estações foram projetadas baseadas em uma espécie de tratamento preliminar destinada à remoção de sólidos grosseiros através da etapa de gradeamento, seguido de sedimentação em caixa de areia e medição de vazão do efluente através de calha Parshall. Após o tratamento preliminar, inicia-se o tratamento primário, na qual tanques decantadores são responsáveis pela eliminação de sólidos suspensos restantes da etapa anterior, bem como de óleos e graxas. Finalmente, visando acelerar a remoção de matéria orgânica, o tratamento secundário, sob condições controladas, é responsável pela degradação de matéria orgânica por meio de reações bioquímicas realizadas por microrganismos encontrados no efluente.

A discussão a respeito da preocupação com os contaminantes emergentes tem se concentrado no impacto que a presença desses contaminantes pode causar à qualidade da água e ao risco potencial que representam em relação ao equilíbrio dos ecossistemas, visto que podem causar danos irreversíveis aos organismos que vivem nesse ambiente.

¹ CONAMA 375/2006: resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente que define critérios e procedimentos, para o uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados. Disponível em: <http://www2.mma.gov.br/port/conama/res/res06/res37506.pdf>.

Tal argumento tem como base o relatório apresentado em 2017 pela Organização das Nações Unidas (ONU) e pelo Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) relacionado ao progresso na água potável, saneamento e higiene, que relata que cerca de 2,1 bilhões de pessoas em todo o mundo não têm acesso a água potável e 2,3 bilhões não têm acesso à saneamento adequado ¹¹.

No Brasil, de acordo com Agência Nacional de Águas (ANA), 9,1 toneladas de esgoto são geradas por dia, resultando em um cenário atual no qual 43 % da população possui esgoto coletado e tratado. Ainda nesta estatística, cerca de 55 % da população possui tratamento considerado adequado, 18 % têm seu esgoto coletado e não tratado, o que pode ser considerado uma precariedade no oferecimento do serviço de saneamento público, e 27 % não possuem coleta, e muito menos tratamento, isto é, sem atendimento ao serviço de coleta sanitário ¹². Ainda, segundo apontado pelo 24º Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgoto (2018) publicado pelo Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (SNIS), aproximadamente 60,9 % da população das áreas urbanas é atendida por uma rede de coleta de esgoto. Com relação ao tratamento dos esgotos, observa-se que o índice médio do país chega a 46,3 % para a estimativa do volume total de esgoto gerado e 74,5 % para os esgotos que são coletados ¹³.

Esses números revelam a falta de efetividade pública nas políticas de coleta e tratamento de esgotos, demonstrando o precário serviço de saneamento básico oferecido a população. Dessa forma, grande parte do esgoto não tratado é despejado diretamente no meio ambiente, causando problemas ambientais e sanitários, pois a presença de contaminantes no meio ambiente pode ser considerada um risco para a fauna e a flora, podendo causar danos irreversíveis aos organismos expostos a essas substâncias ¹. Conforme previamente mencionado, esses contaminantes não estão incluídos em programas de monitoramento e para serem considerados candidatos a uma futura legislação são necessárias informações como concentração no ambiente, potencial de bioacumulação, ecotoxicidade, entre outros parâmetros ^{8,14}.

Os autores Sauvé and Desrosiers apontam o livro “Primavera Silenciosa” de Rachel Carson, publicado em 1962, como um marco na história da gestão ambiental e sustentabilidade, e também como primeiro alerta para a questão de contaminantes emergentes ¹⁵.

A discussão se torna ainda mais relevante, apoiado pelo Relatório Mundial das Nações Unidas sobre Desenvolvimento de Recursos Hídricos (2017), que exige e ressalta a importância da pesquisa para entender a dinâmica dos contaminantes emergentes (fontes, transformações e

destinos) e aprimorar as tecnologias para remoção desses compostos presentes em águas residuárias ^{8,16}.

Então, baseados nos aspectos levantados pela comunidade científica e por órgãos reconhecidos internacionalmente, muitos países têm regulamentos legais implementados para algumas substâncias prioritárias de acordo com efeitos adversos que causam em organismos como em peixes da espécie *Danio rerio* e molusco *Mytilus galloprovincialis* ⁸. A exemplo, os Estados Unidos (US) e a União Europeia (EU) têm demonstrado alguma preocupação com esse problema criando diretrizes para regular ou controlar a eliminação dessas substâncias.

A Environmental Protection Agency (EPA) é a agência americana responsável pela regulamentação legal do descarte de substâncias no meio ambiente. Esta regulamentação ocorre por duas leis federais: a Clean Water Act (CWA) e a Safe Drinking Water Act (SDWA) ^{8,17}.

Um dos primeiros passos da agência americana para tentar estabelecer limites e regulamentos sobre os fármacos e produtos de cuidado pessoal (PPCPs) ocorreu pela Food Quality Protection Act (FQPA), e reformulações na SDWA. Essas alterações autorizaram a EPA a rastrear produtos químicos e formulações que poderiam mostrar algum tipo de atividade endócrina caso atingissem algum corpo hídrico ¹⁸.

A EPA se utiliza de dois regulamentos principais para monitorar contaminantes emergentes na água: a Contaminant Candidate List (CCL) e a Unregulated Contaminant Monitoring Rule (UCMR).

A CCL elenca contaminantes da água que não são sujeitos a quaisquer regulamentos, estabelecendo prioridades para avaliar a ocorrência e toxicidade desses contaminantes. Já a SDWA regula que a EPA publique uma atualização da CCL a cada cinco anos, com contaminantes que são conhecidos ou previstos para ocorrer em sistemas públicos de abastecimento de água e não estão atualmente sujeitos aos regulamentos de água potável da EPA ¹⁷. No final de 2016, a EPA anunciou a CCL-4, a quarta atualização de uma lista de contaminantes candidatos a futura regulamentação baseados nos termos da SDWA. Nela estão incluídos, dentre os cem compostos ou grupos químicos, estrogênios, fármacos, produtos de higiene pessoal e praguicidas ^{8,19}. Além disso, a quinta atualização dessa lista (CCL-5) já está em desenvolvimento.

O segundo mecanismo é a UCMR, desenvolvido em coordenação com a CCL. A agência americana coleta dados sobre contaminantes suspeitos de estar presente na água potável e que não tem limites definidos pelo SDWA. Os resultados são comparados com pesquisa

ecotoxicológica e avaliação de risco para determinar se um contaminante deve ter um limite estabelecido e, portanto, ser inserido no CCL ⁸.

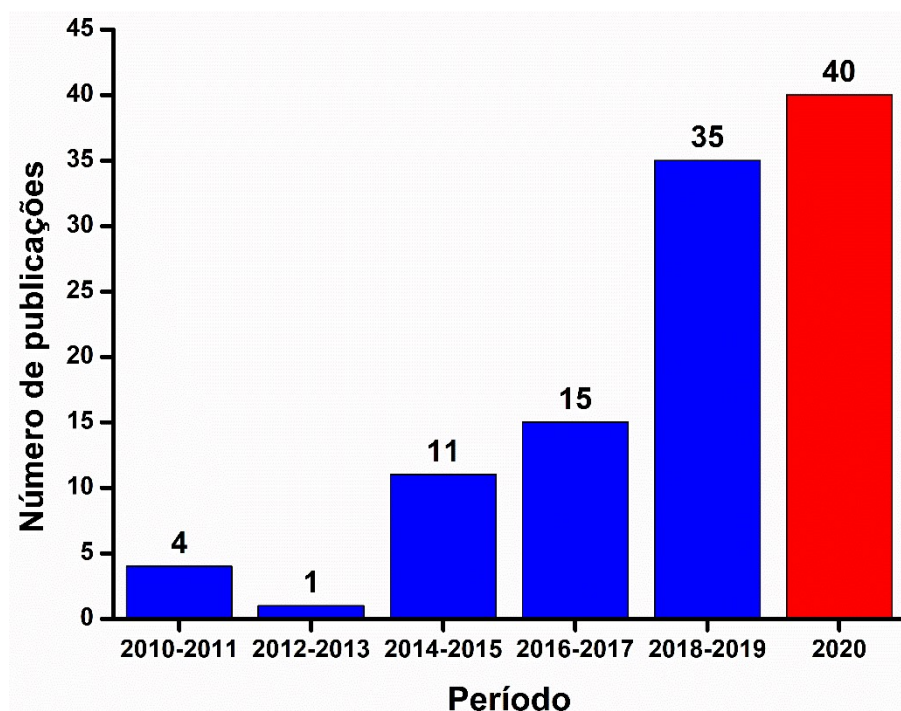
Outro programa da EPA denominado Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP), visa fazer uma classificação de compostos com relação à perturbação endócrina. Esse programa é dividido em níveis (conhecidas como Tier 1 Screening e Tier 2 Testing). A primeira estratégia (Tier 1 Screening) visa identificar substâncias com potencial para interagir com o sistema endócrino. Em seguida, os compostos que apresentaram interferência endócrina são selecionados para os testes de efeito no sistema endócrino (Tier 2 Testing) ⁸.

Do mesmo modo, a European Environment Agency (EEA) auxilia os países membros da EU nas medidas políticas adotadas visando minimizar o impacto que podem causar no ambiente garantindo a qualidade ambiental ²⁰. A EEA trabalha sustentada pela European Water Framework Directive (EU WFD) com o objetivo de garantir a qualidade de todas as águas dos países integrantes da EU. Dado o grande número de produtos químicos liberados no meio ambiente, Von der Ohe et al. apresentaram uma nova abordagem para avaliar o risco ecotoxicológico usado para priorizar 500 contaminantes orgânicos ²¹.

Na União Europeia, o levantamento dos compostos prioritários a serem legislados iniciaram em 1999 ⁸. Tomando os regulamentos da União Europeia como exemplo, o REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) regula o uso de quase todos os produtos químicos no países pertencentes à União Europeia (Regulamento EC n.º 1907/2006) ¹⁴. Para facilitar esse estudo, em 2005, a Comissão Europeia financiou o projeto NORMAN (Network of reference laboratories, research centres and related organisations for monitoring of emerging environmental substances) para promover uma rede permanente de laboratórios de referência e centros de pesquisa para apoiar os países membros da EU nos impactos ambientais. Pela rede NORMAN, ao menos 700 substâncias já foram detectadas e identificadas no ambiente aquático europeu ^{14,22}.

No Brasil, não existem medidas oficiais voltadas para a problemática dos contaminantes emergentes, muito embora as discussões e as pesquisas têm aumentado significativamente (**Figura 1.2**), fornecendo subsídios para os órgãos governamentais competentes, empresas e para a população.

Figura 1.2 - Levantamento bibliográfico para trabalhos brasileiros que continham os termos “emerging contaminants and wastewater” no título, abstract e/ou palavras-chave no período de 2010-2020 na plataforma Scopus²³.



Obs.: a última coluna em vermelho indica que estudos estão em andamento.

Fonte: autoria própria.

A **Figura 1.2** evidencia que estudos de monitoramento desses contaminantes em águas e efluentes ainda são incipientes, com poucos trabalhos nacionais publicados relatando a presença e o destino desses compostos durante o tratamento de água e esgoto.

Conforme demonstrado na **Figura 1.1**, os efluentes gerados pelos processos industriais constituem-se em uma fonte de contaminação ambiental. A resolução CONAMA² 430/2011, que altera e complementa a resolução CONAMA³ 357/2005 é responsável por especificar valores máximos permitidos para alguns metais (como chumbo, cádmio, bário, arsênio, entre outros), óleos e solventes orgânicos, assim como parâmetros físico-químicos, mas não especifica demais classes de substâncias.

Outro aspecto de extrema importância a ser considerado é o fato da quantidade permitida de nutrientes a ser lançada no efluente, em especial, nitrogênio e fósforo, principais fontes causadoras do fenômeno de eutrofização de corpos hídricos. A resolução CONAMA 430/2011, estabelece que o valor máximo de lançamento para nitrogênio amoniacal é de 20 mg L⁻¹.

² CONAMA 430/2011: Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes. Disponível em: <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>.

³ CONAMA 357/2005: Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes. Disponível em: <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>.

Já para o fósforo, o artigo 17 da resolução supracitada estabelece que a definição de padrões específicos para o lançamento de fósforo em efluentes ficará a cargo do órgão ambiental competente à captação para abastecimento público. Ou seja, a resolução estabelece que o despejo de efluentes tratados em rios não podem comprometer a qualidade das águas, entretanto apenas algumas substâncias orgânicas são monitoradas, desconsiderando a presença dos contaminantes emergentes, os quais, conseqüentemente, acabam sendo lançados para os corpos d'água ^{8,24}.

Ainda tratando de legislação a nível nacional, o Brasil possui a Lei do Saneamento Básico (Lei nº 11.445) promulgada em 2007. Entretanto, quando promulgada, essa lei não contemplava a questão dos contaminantes emergentes e ainda não sofreu nenhuma atualização a fim de abordar esta questão ambiental.

Restringindo a discussão a nível estadual, mais especificamente no estado de São Paulo, a lei nº 7.750 de 1992 dispõe sobre as ações prioritárias em programas de saúde pública e estabelece diretrizes para o saneamento básico e, mais uma vez, os contaminantes emergentes não estavam inseridos na discussão. Apesar dos esforços dispensados pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), e também pela Câmara Técnica de Saúde Pública da Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental (ABES), ao tentar estabelecer critérios baseados no uso e recorrência de algumas substâncias, destacando-se principalmente praguicidas e herbicidas, a legislação brasileira ainda permanece deficitária em seus critérios de qualidade relativos aos contaminantes emergentes. Dentre os mais variados compostos considerados como contaminantes emergentes, apenas cerca de 30 praguicidas são contemplados pela Portaria MS 2914/2011 e/ou nas Resoluções CONAMA 357/2005 e 396/2008, sendo que somente no ano de 2019, cerca de 474 praguicidas tiveram seu registro aprovado pelo governo brasileiro, colocando o Brasil como o maior consumidor mundial de praguicidas ⁸.

Dessa forma, a criação de leis e regulamentos se apresenta como uma maneira viável de auxiliar no controle desses contaminantes. Atualmente, a maioria desses compostos não é regulamentada em muitas partes do mundo, inclusive no Brasil, mas, como discutido anteriormente, existem algumas tentativas na União Europeia e nos Estados Unidos de tentar reduzir a contaminação ambiental por essas substâncias. Portanto, acredita-se que regulamentos eficazes sejam a base para um gerenciamento eficiente dos recursos hídricos.

1.2 Fármacos como contaminantes emergentes e a ocorrência em águas residuárias

A quantidade de fármacos e metabólitos bioativos que são introduzidas no ambiente pode ser considerada relativamente baixa, dados os níveis de concentração que podem ser encontrados, da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ a ng L^{-1} . Entretanto, o despejo contínuo no ambiente pode fazer com que as mudanças não sejam perceptíveis a curto prazo até que se tornem irreversíveis a longo prazo.

Em vista disso, a contaminação produzida por produtos farmacêuticos em águas superficiais e subterrâneas tem sido encarada como um problema ambiental e, inclusive, levou ao estabelecimento de um campo de pesquisa conhecido como “Pharmaceuticals in the Environment”²⁵.

Diferentes classes de fármacos podem ser detectadas em matrizes aquáticas como analgésicos, antidepressivos, antiepilépticos, β -bloqueadores, antibióticos, drogas ilícitas entre outros. Muitos destes compostos são resistentes à degradação, altamente persistentes em meio aquoso e potencialmente prejudiciais aos organismos aquáticos e a saúde humana²⁵.

Assim, informações sobre propriedades físico-químicas, como coeficiente de partição octanol/água (K_{ow}), constantes de dissociação, entre outras podem indicar se um composto é suscetível a biomagnificação^{26,27}. Ademais, fatores como condições climáticas, pH e uma variedade de outros fatores, podem influenciar na persistência desses contaminantes²⁸.

Resíduos de fármacos não metabolizados ou os metabólitos correspondentes, quando lixiviados ou eliminados pela excreta humana e/ou animal, atingem o ambiente aquático e podem ser degradados por bactérias em intermediários recalcitrantes e tóxicos, além de contribuir para a seleção e aumento da resistência bacteriana^{8,29}. Além deste aspecto, as águas, muitas vezes contaminadas pela presença dessas substâncias, são reutilizadas para irrigação, e assim, acaba por tornar vicioso o ciclo de contaminação dos diversos compartimentos ambientais.

Tal afirmação pode ser confirmada por Białk-Bielińska et al.³⁰, visto que nos EUA, cerca de $3,6 \text{ Gm}^3$ de águas residuárias tratadas seriam reutilizadas para irrigação, representando um aumento anual de 15 % na reutilização de recursos hídricos.

Assim, é essencial avaliar a qualidade das águas e observar possíveis contaminações pelos efluentes produzidos por ação antrópica, definindo substâncias que sejam capazes de indicar a fonte de exposição, além de estabelecer uma relação quantitativa com a contaminação. Entre esses marcadores, destaca-se a cafeína (CAF), utilizada como indicador de atividade

antropogênica, pois está presente em diversos produtos de amplo consumo humano e possui características físico-químicas que facilitam sua determinação, muitas vezes substituindo marcadores biológicos como o *Escherichia coli* ^{8,31-33}.

Além desses aspectos, o que viabiliza seu uso como indicador de atividade antropogênica está no fato de que cerca de 80-90 % da população mundial ingere cafeína diariamente presente em alimentos, bebidas, fármacos e produtos de cuidado pessoal e aproximadamente 5 % da cafeína ingerida não é metabolizada, sendo excretada pela urina ^{34,35}. Segundo Gonçalves, Rodrigues e Silva-Filho (2016), o consumo global médio por dia de cafeína é de aproximadamente 70,0 mg por pessoa ³². No entanto, países como Suíça, Reino Unido e Estados Unidos da América têm esse consumo médio por pessoa estimado em 300 mg, 440 mg e 210 mg, respectivamente ³⁶.

A carbamazepina (CBZ) também pode ser considerada como possível marcador de atividade antropogênica ³⁷, além de ser altamente persistente no meio ambiente e resistente à degradação ^{28,38}. Foi introduzida no mercado farmacêutico como anticonvulsivante e indicada para tratamento de nevralgia do trigêmeo. Posteriormente, descobriu-se seu efeito antiepilético, e no tratamento de outras disfunções como déficit de atenção e hiperatividade, esquizofrenia, estresse pós-traumático e outras. No corpo humano esse fármaco é transformado em vários metabólitos e 13 % do composto ativo é excretado sem sofrer biotransformação ³⁹.

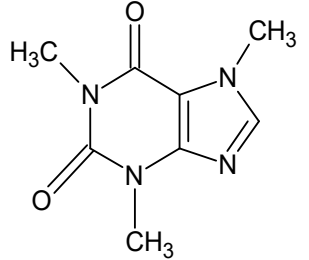
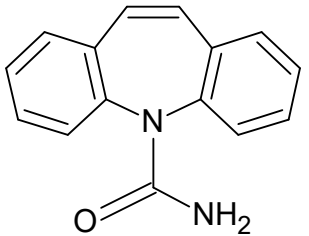
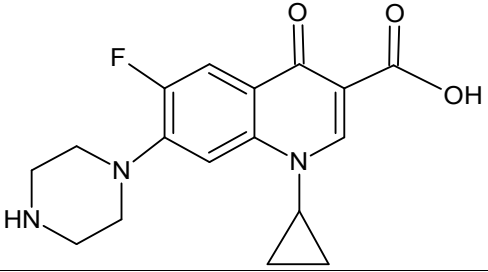
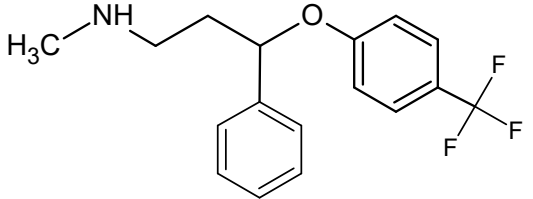
Além desses compostos, o presente estudo também teve como alvo dois antibióticos do grupo das fluoroquinolonas que foram a ciprofloxacina (CIP) e a norfloxacina (NOR). A primeira, antibiótico utilizado historicamente como ferramenta de combate a arma biológica antraz, também utilizado no trato de infecções urinárias - cabe ressaltar que cerca de 45 a 62 % da ciprofloxacina ingerida é excretada para os efluentes sanitários ⁴⁰ - e na medicina veterinária como antibacteriano ⁴¹. Já a norfloxacina, é uma fluoroquinolona de segunda geração utilizada no tratamento de doenças provocadas por organismos gram-positivos e no tratamento de infecções urinárias.

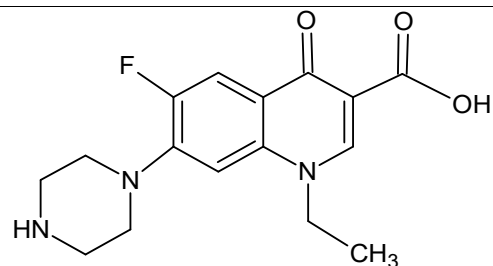
Segundo a Pan American Health Organization (PAHO) e a World Health Organization (WHO) a depressão é um transtorno mental que acomete cerca de 300 milhões de pessoas ao redor do mundo independentemente de idade e classe social ⁴². Com isso, o consumo de medicamentos antidepressivos tem aumentado vertiginosamente. Apenas no Brasil, no período de 2014 a 2018, o consumo de antidepressivos no país cresceu 23 % ⁴³. Devido a esse aumento, a detecção dessa classe de compostos farmacêuticos no ambiente, principalmente em matrizes

aquáticas, tem se tornado recorrente. Desta classe, dois fármacos de uso difundido e também alvo desse trabalho são a fluoxetina (FLX) e a venlafaxina (VEN).

A fluoxetina é um antidepressivo que age sobre o sistema nervoso central como inibidor seletivo da recaptação de serotonina, e também é conhecida por agir na recaptação de norepinefrina ⁴⁴. É um fármaco muito difundido por mostrar-se eficaz no tratamento da depressão, síndrome do pânico, irritabilidade e outras desordens psiquiátricas ⁴⁵. Por fim, a venlafaxina é conhecida por promover a inibição seletiva da recaptação de serotonina e noradrenalina no sistema nervoso central, além disso, é utilizada no tratamento de dores neuropáticas ⁴⁶. A **Tabela 1.1** contém a estrutura e informações sobre os fármacos supracitados.

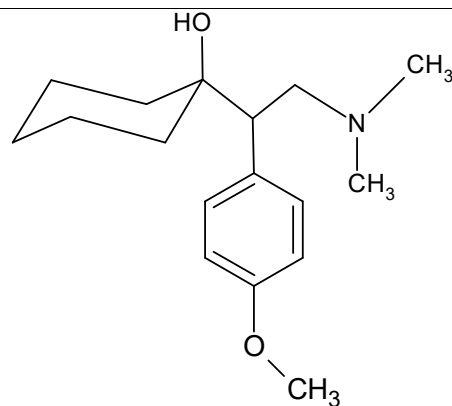
Tabela 1.1 - Propriedades dos analitos em estudo.

Composto	Estrutura	Fórmula molecular	Massa molar (g mol ⁻¹)	CAS
Cafeína (CAF)		C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	194,19	58-08-2
Carbamazepina (CBZ)		C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O	236,27	298-46-4
Ciprofloxacina (CIP)		C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃	331,33	85721-33-1
Fluoxetina (FLX)		C ₁₇ H ₁₈ F ₃ NO	309,33	54910-89-3

Norfloxacina (NOR) $C_{16}H_{18}FN_3O_3$

319,33

70458-96-7

Venlafaxina (VEN) $C_{17}H_{27}NO_2$

277,40

93413-69-5

O desenvolvimento da indústria farmacêutica, impulsionado pelo aumento da população e, conseqüentemente, pelo consumo de medicamentos, fez com que os fármacos se enquadrassem na classe de contaminantes emergentes, sendo encontrados em afluentes e efluentes de estações de tratamento de esgoto em concentrações variando de ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$, e mesmo nessas concentrações podem afetar o equilíbrio do ecossistema aquático^{9,27,47-49}.

Muitos estudos envolvendo o tema tem sido realizado ao redor do mundo, explorando a determinação de contaminantes emergentes de diferentes classes em diversas matrizes ambientais. A **Tabela 1.2** revela um breve panorama de trabalhos previamente publicados envolvendo a determinação dos contaminantes emergentes alvos desse estudo em diversos países.

Tabela 1.2 - Ocorrência de fármacos em águas residuárias em estudos anteriormente publicados.

Analito	Matriz	Método	Concentração (ng L⁻¹)	País	Referência
Ciprofloxacina	Afluente (ETE)	LC-MS/MS	2831,00	Espanha	Biel-Maeso et al. (2018) ⁴⁸
	Efluente (ETE)		564,000		
	Água residuária	LC-MS/MS	1440,00	Estados Unidos	Bhandari et al. (2008) ⁵⁰
Norfloxacina	Afluente (ETE)	LC-MS/MS	385,000	Espanha	Gros et al. (2013) ⁵
	Efluente (ETE)		149,000		
	Água residuária	LC-MS/MS	8,32000	Irã	Kafaei et al. (2018) ⁵¹
Cafeína	Afluente (ETE)	LC-MS/MS	82844,0	Espanha	Biel-Maeso et al. (2018) ⁴⁸
	Efluente (ETE)		186,000		
	Água residuária	LC-MS/MS	17,6000-67,6000	Itália	Senta et al. (2015) ⁵²
	Água residuária	LC-MS/MS	71,3000	Antártida	González-Alonso et al. (2017) ⁵³
Carbamazepina	Afluente (ETE)	LC-MS/MS	291,000	Espanha	Biel-Maeso et al. (2018) ⁵⁴
	Efluente (ETE)		232,000		
	Efluente (ETE)	HPLC-UV	132000	Tunísia (Tunes)	Khazri et al. (2019) ⁵⁵
Fluoxetina	Água residuária	LC-MS/MS	4,90000-175,900	Inglaterra	Baker et al. (2013) ⁵⁶
	Afluente (ETE)	LC-MS/MS	326,000	Espanha	Biel-Maeso et al. (2018) ⁵⁴
	Efluente (ETE)		326,000		
	Afluente (ETE)	LC-MS/MS	24,0000	Alemanha	Schlüsener et al. (2015) ⁵⁷
	Efluente (ETE)		8,00000		

Venlafaxina	Água residuária	LC-MS/MS	28,8000-446,100	Inglaterra	Baker et al. (2013) ⁵⁶
	Água residuária	LC-MS/MS	116,000	Alemanha	Rúa-Gómez et al. (2012) ⁵⁸
	Afluente (ETE)	LC-MS/MS	260,000	Alemanha	Schlüsener et al. (2015) ⁵⁷
	Efluente (ETE)		220,000		

Fonte: autoria própria.

Inicialmente, as pesquisas pioneiras abordando contaminantes emergentes no Brasil eram focadas nas análises de praguicidas. Em meados de 1999, os fármacos começaram a se tornar tema de investigações científicas ^{59,60}. Tratando-se do comportamento e destino dos contaminantes emergentes em estações de tratamento de esgoto do Brasil a presença de hormônios ⁶¹⁻⁶⁴, bisfenol A ^{65,66}, fármacos ⁶⁷, drogas ilícitas ^{68,69} e praguicidas ^{61,64,67,70,71} também tem sido relatadas.

Tendo como foco os fármacos alvo desse estudo, a **Tabela 1.3** elenca alguns trabalhos de relevância nacional envolvendo a determinação de contaminantes emergentes em amostras ambientais.

Tabela 1.3 - Ocorrência de fármacos em águas residuárias em estudos nacionais anteriormente publicados.

Analito	Matriz	Método	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Estado	Referência
Cafeína	Água superficial (Baía de Guanabara)	HPLC-UV	0,13400-0,14700	Rio de Janeiro	Ferreira (2005) ⁷²
	Água superficial (Rio Dourados)	LC-MS/MS	1,0400	Mato Grosso do Sul	Sposito et al. (2018) ⁷³
	Água superficial (Rio Paquequer)	HPLC-UV	0,15000-47,500	Rio de Janeiro	Gonçalves, Rodrigues e Silva-Filho (2017) ³²
	Água superficial (Rio Monjolinho)	LC-MS/MS	129,59	São Paulo	Campanha et al. (2015) ⁷⁴
	Água superficial (Rio Atibaia)	HPLC-UV-DAD HPLC-FLD	0,12700-0,17400	São Paulo	Montagner e Jardim (2011) ⁷⁵
Carbamazepina	Água superficial (Rio Monjolinho)	LC-MS/MS	0,12740	São Paulo	Campanha et al. (2015) ⁷⁴
	Água superficial (Lagos Paranoá e Corumbá)	UPLC-QToF/MS	0,0054000-0,025000	Distrito Federal	Sodré e Cavalcanti (2018) ⁷⁶
Ciprofloxacina	Efluente hospitalar	LC-FLD LC-MS/MS	32,000-99,000	Rio Grande do Sul	Martins et al. (2008) ⁷⁷
	Efluente hospitalar	SPE-UHPLC-MS/MS	1,3000-33,900	São Paulo	Rodrigues-Silva et al. (2019) ⁷⁸

Norfloxacin	Afluente (ETE)	UHPLC-MS/MS	0,38500	Rio Grande do Sul	Bisognin et al. (2019) ⁷⁹
	Efluente (ETE)		0,064000		
	Efluente hospitalar	SPE-UHPLC-MS/MS	0,80000-4,4000	São Paulo	Rodrigues-Silva et al. (2019) ⁷⁸
	Água superficial (Córrego Arroio Dilúvio)	LC-MS/MS	0,030000-0,054000	Rio Grande do Sul	Jank et al. (2014) ⁸⁰

Fonte: autoria própria.

A busca na literatura científica demonstrada na **Tabela 1.3** foi realizada na plataforma Scopus® seguindo critério de busca para trabalhos que apresentassem o nome do fármaco em matrizes aquáticas seja no título, abstract e/ou palavras-chave, como por exemplo, “caffeine in wastewater” e/ou “caffeine in environmental matrices”. Vale ressaltar que o mesmo critério de busca foi adotado para todos os compostos do estudo. Para os fármacos fluoxetina e venlafaxina, não foi possível encontrar trabalhos nacionais que contemplassem esse critério, evidenciando uma necessidade de pesquisas que demonstrem a determinação desses compostos em matrizes ambientais no Brasil.

1.3 Efeitos ecotoxicológicos relacionados à presença dos contaminantes emergentes no ambiente

A presença de fármacos em amostras ambientais fez com que esta classe de compostos se estabelecesse como uma das classes de contaminantes emergentes mais estudadas mundialmente, cujos primeiros registros acerca do tema terem surgido em meados da década de 70 ⁸.

O alerta da comunidade científica para a presença de fármacos no ambiente se dá, principalmente, para àqueles de origem hormonal, devido ao seu potencial de interferência endócrina, para os psicoterápicos, que agem no sistema nervoso central e para os antimicrobianos, por promoverem aumento da resistência bacteriana ^{8,81}.

Em vista do exposto na sentença acima e tendo como definição da EPA de que risco é “a possibilidade de um agente físico, químico ou biológico em induzir efeitos adversos à saúde humana a outros sistemas biológicos coexistentes” ⁸², avaliar a exposição a determinado risco é de suma importância a fim de garantir a integridade da saúde humana e dos ecossistemas. Por sua vez, os contaminantes emergentes tem ameaçado a integridade desses ecossistemas pelos impactos adversos que podem causar nos organismos, tornando-se alvo de recentes e importantes avaliações toxicológicas ⁸³⁻⁸⁵.

Os efeitos ecotoxicológicos sobre os organismos aquáticos, relatados por Al-Khazrajy e Boxall (2016) ⁸⁶ e por Lima et al. (2017) ⁸⁷ compreendem desde danos na produção de esperma à feminização dos peixes machos, e incluem também, declínio na capacidade de reprodução com concentrações de contaminantes similares àsquelas encontradas no ambiente. Huerta et al. (2013) ⁸⁸ relata que pouco se sabe sobre os potenciais efeitos dos contaminantes emergentes na biodiversidade e funcionamento dos ecossistemas.

Por exemplo, mexilhões marinhos da espécie *Mytilus galloprovincialis*, expostos a concentração de 10 µg L⁻¹ de carbamazepina, foram capazes de bioconcentrar em seus tecidos 24,5 ng g⁻¹ a 34,1 ng g⁻¹ de carbamazepina no prazo de uma semana de exposição ⁸⁹. O mesmo fármaco também foi capaz de causar desordens fisiológicas em peixes da espécie *Lepomis gibbosus* ⁹⁰, além de apresentar efeito sinérgico quando combinado com outros compostos também presente em matrizes aquáticas como a tetraciclina, sendo capaz de inibir o crescimento e a taxa respiratória em cianobactérias *Anabaena sp* CPB4337 ⁹¹.

Por sua vez, uma concentração de 3 mmol L⁻¹ de ciprofloxacina é capaz de danificar o DNA de moscas da espécie *Drosophila melanogaster* segundo relatado por Thomé et al. (2012) ⁹², na qual o fármaco foi responsável pela indução de aproximadamente 72 % dos eventos de recombinação celular, e por cerca de 28 % dos eventos de mutação observados. Já nas algas da espécie *Selenastrum capricornutum*, elevadas concentrações de ciprofloxacina altera a taxa fotossintética e de desenvolvimento dos organismos ⁹³.

Crustáceos da espécie *Gammarus pulex* apresentaram dificuldade de locomoção quando expostos a concentrações de 10 a 100 ng L⁻¹ de carbamazepina e fluoxetina ⁹⁴. Segundo Schultz et al. (2011) ⁹⁵, fluoxetina na concentração de 28 ng L⁻¹ é capaz de induzir desordem endócrina com elevação dos níveis de vitelogenina em peixes machos da espécie *Pimephales promelas*. Este mesmo organismo apresentou uma taxa de mortalidade de 60 % de sua população quando expostos a 305 ng L⁻¹ de venlafaxina ⁹⁵.

Conforme relatado acima, organismos de diversas classes e espécies tem sido utilizados para ensaios toxicológicos de avaliação do potencial risco de produtos farmacêuticos no ambiente, no entanto os peixes são os organismos mais empregados na avaliação do estado ecológico dos ambientes aquáticos ⁸⁵.

Ainda neste contexto, David et al. (2018) ⁹⁶ investigou a captação de 14 fármacos neuroativos no plasma sanguíneo e em regiões cerebrais de peixes da espécie *Rutilus rutilus*, e demonstraram que as substâncias concentraram-se em diferentes regiões cerebrais, estando de 3 a 40 vezes mais elevadas em comparação com o plasma sanguíneo, demonstrando que esses medicamentos neuroativos são facilmente absorvidos em tecidos cerebrais em peixes.

Fraz et al. (2018) ⁸⁴ descreveu que a exposição crônica de peixes da espécie *Danio rerio* (zebrafish) a baixas concentrações de carbamazepina e gemfibrozila ocasionou diminuição da capacidade reprodutiva, alterações histológicas nos ovários e rins, além de desordens hepáticas nos organismos.

Em vista disso, agências regulatórias de todo o mundo desenvolveram e implementaram medidas e diretrizes para limitar o impacto de substâncias químicas antropogênicas lançadas no meio ambiente. Exemplos relevantes são o programa norte-americano ToxCast (Toxicity Forecaster) e o REACH ⁹⁷.

Dessa forma, a discussão sobre a crescente preocupação com os fármacos no ambiente, principalmente, quando associamos o crescimento do mercado farmacêutico ao aumento populacional, ressalta a importância da realização de estudos que abordem a ocorrência, efeitos/impactos e toxicidade destes compostos em regiões ainda não relatadas, além de intensificar os estudos em regiões já relatadas na literatura, de forma a compreender a dinâmica desses contaminantes no ambiente, bem como o comportamento dos ecossistemas atingidos por essa problemática.

1.4 Breve discussão acerca das tecnologias de remoção

O Brasil apresenta uma ampla área territorial, sendo observados cenários conflitantes, tanto socioeconômicos quanto ambientais. Segundo um estudo publicado pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), mais de 80 % da população brasileira reside em apenas 0,63 % da extensão territorial do país, concentrando-se, justamente, em áreas cujo acesso à serviços de atendimento à saúde é mais amplo ⁹⁸. E em vista disso, a indústria farmacêutica direciona suas estratégias de mercado para o atendimento a estas áreas de elevada densidade demográfica.

Além da distribuição geodemográfica da população, intimamente relacionada aos fatores sociais, políticos, econômicos, culturais e comportamentais que cercam cada setor social, existe um sério problema de saneamento básico em diversas regiões do país, o que evidencia que o aspecto socioeconômico define e pontua o acesso aos serviços de saúde ^{98,99}.

O sistema de saneamento básico no Brasil utiliza o tratamento de esgoto projetado apenas para remover ou diminuir os agentes patógenos e a carga de elementos orgânicos/inorgânicos, de forma a evitar a eutrofização dos corpos hídricos em que as águas residuárias são despejadas. Ou seja, elas não foram preparadas para completa remoção dos resíduos de compostos orgânicos, como produtos farmacêuticos, que são frequentemente detectados em afluentes e efluentes de ETEs ¹⁰.

O tratamento convencional envolve os seguintes processos: eliminação de sólidos grosseiros por filtração; sedimentação ou floculação; biodegradação aeróbia, por meio de lodo ativado ou filtro biológico, e/ou biodegradação anaeróbia, por meio de reator anaeróbio de fluxo

ascendente (RAFA), tradicionalmente conhecido como UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket), degradação química e desinfecção ⁸. Essas etapas persistem até o momento em que a água contaminada esteja em condições de ser reutilizada ou devolvida ao ambiente sem que represente uma ameaça.

Nas ETEs, os fármacos são parcialmente retidos no lodo ou metabolizados, e a remoção torna-se um fator dependente das propriedades da substância, e das condições do processo, como por exemplo, tempo de retenção de lodo, tempo de detenção hidráulica, temperatura e carga orgânica.

O lodo ativado é o processo mais utilizado nas estações de tratamento de esgoto. Associado ao lodo ativado, podem coexistir outras tecnologias de tratamento tais como: lagoas de estabilização ou biorreatores anaeróbios de manta de lodo.

Muitas tecnologias foram estudadas e desenvolvidas envolvendo a remoção de contaminantes emergentes, como biorreator de membrana, ozonização, processos fotocatalíticos e biorreatores anaeróbios. Nos parágrafos subsequentes, iremos discutir brevemente cada uma dessas tecnologias.

A tecnologia de biorreator de membrana (MBR) combina o processo de lodo ativado biológico e filtração por membrana. Essa tecnologia surgiu devido à crescente necessidade de reutilização da água, juntamente com uma melhor compreensão da dinâmica de contaminantes emergentes nas águas residuárias, mostrando ser adequado para tornar-se uma tecnologia capaz de remover esses contaminantes ¹⁰⁰. Os dois principais processos que usam a tecnologia MBR são osmose reversa e nanofiltração. Ambos os mecanismos removem eficientemente várias substâncias, sendo uma tecnologia de escolha para remoção de contaminantes emergentes nos países desenvolvidos ¹⁰¹.

Os biorreatores anaeróbios constituem-se em sistemas que possuem uma microbiota capaz de promover reações químicas e bioquímicas aplicadas no tratamento de águas residuárias. Essas unidades são utilizadas na região sudeste do Brasil, pois requer clima com temperatura média de 20 °C para evitar baixa atividade microbiana.

O biorreator UASB expandiu a aplicação de biorreatores anaeróbios no sistema de tratamento de esgoto presente em diversas cidades brasileiras. Existem muitas outras configurações de biorreatores anaeróbios aplicadas para remover contaminantes emergentes, como por exemplo, o biorreator anaeróbio horizontal de leito fixo (HAIB). Trata-se de uma configuração versátil e simples de ser mantida, que contém biomassa imobilizada em espumas de poliuretano que permitem o crescimento e fixação da microbiota, responsável pela remoção

de compostos orgânicos de águas residuárias com alta carga orgânica ^{102,103}. Esta configuração já foi utilizada com sucesso para remoção de benzeno, tolueno, etilbenzeno e etanol ¹⁰⁴, pentaclorofenol ¹⁰⁵, sulfametoxazol e ciprofloxacina ¹⁰⁶, sulfametazina ^{107,108}, sulfametoxazol e trimetoprima ¹⁰⁹.

Já as tecnologias baseadas em ozônio, um forte oxidante, têm o objetivo comum de melhorar a desinfecção e remoção de compostos orgânicos na água. A busca por essa otimização não se deve apenas ao fato de ser um oxidante caro, mas também porque o ozônio induz a formação de radicais intermediários tóxicos. Além disso, o acoplamento da ozonização com outros processos, como coagulação e filtração com ou sem o auxílio de ultravioleta (UV), melhora a biodegradabilidade e a remoção de compostos orgânicos persistentes ¹¹⁰.

Os processos oxidativos avançados (AOPs) possuem alta capacidade de mineralização da matéria orgânica. No entanto, as aplicações em larga escala ainda são escassas, e as futuras aplicações são direcionadas ao uso de energia solar e fotocatalise. Atualmente, a catálise homogênea por foto-Fenton e a catálise heterogênea assistida por UV/TiO₂ concentram a maioria dos estudos envolvendo os processos oxidativos avançados ¹¹¹.

Embora existam muitas tecnologias para o tratamento de águas residuárias, a adsorção ainda tem sido amplamente utilizada e estudada, embora limitada pelo surgimento de novos materiais. Os materiais sorventes mais comuns utilizados são carvão ativado, zeólitas, sílica gel e alumina ativada, muito embora materiais à base de carbono obtidos a partir de resíduos sólidos (biochar) tem sido largamente utilizados em estudos de adsorção visando a remoção de contaminantes emergentes ¹¹².

O desenvolvimento de novas tecnologias e materiais para tratamento de águas residuárias cresceu significativamente. No entanto, é necessário investimento em pesquisas que permitam avançar nas tecnologias de tratamento de águas residuárias projetadas para a remoção emergente de contaminantes, sustentado pelo fato de que não existe um tratamento único capaz de remover todos os compostos. Além disso, existem diferentes tipos de contaminantes emergentes, com propriedades físico-químicas distintas que exigiriam diferentes tecnologias de tratamento.

Portanto, a tecnologia de tratamento adequada a ser aplicada deve ser escolhida de acordo com as características do efluente (carga orgânica, turbidez, condutividade, demanda química e bioquímica de oxigênio e presença de contaminantes). Para avaliar a eficiência de remoção de uma tecnologia de tratamento, é fundamental aplicar testes analíticos a um composto ou classe alvo, de modo que se possa avaliar e estimar a eficiência do tratamento.

O desenvolvimento de novas tecnologias de tratamento concentra-se, principalmente, na eficiência da remoção. Entretanto, ainda carecemos de estudos que abordem os possíveis produtos de transformação gerados durante o tratamento aplicado, bem como pesquisas de ecotoxicidade.

1.5 Do preparo de amostra a técnicas aplicadas para análise de contaminantes emergentes

Conforme já salientado anteriormente e discutido anteriormente acerca das condições sanitárias básicas no Brasil e no mundo, grande parte da população não tem acesso à tratamento de esgoto e, conseqüentemente, vivem sob condições precárias de saneamento. Por isso, surgiu na comunidade científica a preocupação quanto ao desenvolvimento de estudos e de métodos analíticos que pudessem ser capazes de determinar fármacos presentes em águas residuárias.

Durante o período de 2000 a 2010, ocorreu um grande desenvolvimento em instrumentação analítica, especialmente em equipamentos que utilizam espectrometria de massas. O desenvolvimento de novas configurações aprimorou a ionização da amostra e possibilitou a detecção de compostos em pg L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$ de concentração por meio da introdução de novos analisadores de massa como o Orbitrap, ou a combinação deles como o quadrupolo (Q) com armadilha de íons linear (QTrap), ou mesmo o quadrupolo com tempo de voo (QToF). Esse avanço analítico foi essencial para determinação de contaminantes emergentes em águas residuárias ¹.

A escolha do analisador de massas deve ser cuidadosa e condizente com a aplicação desejada, avaliando a faixa de massa a ser trabalhada, seletividade, sensibilidade e também a relação custo-benefício. O instrumento híbrido do tipo QTrap oferece a possibilidade de unir dois analisadores em um único sistema, permitindo a realização de experimentos clássicos do tipo QqQ associado à sensibilidade do ion trap linear (LIT) e a sua capacidade de armazenar íons e fragmentá-los ¹¹³. Outro ponto a ser considerado reside na capacidade de interferentes da matriz coeluírem com os analitos, prejudicando a ionização. Neste caso, quando se trabalha com detectores de alta sensibilidade, o uso de padrões internos é uma alternativa viável, cujos compostos isotopicamente marcados, terão seu sinal correlacionados com sinal do analito, a fim de verificar se houve alguma variação provocada pelo efeito de matriz ⁷.

Atualmente, muitos dos trabalhos previamente publicados abordando a temática dos contaminantes emergentes é focada no monitoramento dos compostos alvo. Essa abordagem tradicional pode revelar-se insuficiente, uma vez que exclui os metabólitos ou possíveis produtos de transformação gerados que possam apresentar relevância ambiental. E muitos

desses produtos ou metabólitos de transformação podem ser, ecotoxicologicamente, mais prejudiciais do que o próprio composto alvo. Entretanto, ainda é difícil rastrear compostos não direcionados devido à falta de padrões analíticos e bancos de dados que permitam a busca de uma possível estrutura para elucidação da composição elementar.

Apesar de todos os esforços dispensados e de que a ocorrência de fármacos no meio ambiente já ser relatada há mais de 20 anos, apenas em 2007, surgiram métodos oficiais utilizando a cromatografia gasosa e cromatografia líquida, respectivamente, acoplada à espectrometria de massas para determinação desses compostos ^{114,115}. Inclusive, o uso da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS), permitiu a sistematização de procedimentos analíticos na Europa e Estados Unidos da América ¹¹⁶.

A determinação de fármacos em amostras ambientais pode também ser realizada utilizando a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). Entretanto, muitos fármacos não são estáveis termicamente, dificultando determinações por GC-MS, sendo necessário reações de derivatização. Como a maioria dos fármacos é solúvel na fase móvel, a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial tem sido o método de análise escolhido. Segundo Silva e Collins (2011) ⁷, tal fato pode ser explicado pela versatilidade da técnica de LC-MS/MS, podendo ser utilizado para analitos com diferentes polaridades. Consegue-se com esse método atingir limites de detecção e quantificação da ordem de ng L⁻¹, mesmo em conjunto com técnicas que utilizam quantidades reduzidas de amostra, como extração em fase sólida no modo on-line.

Atualmente, o desenvolvimento de métodos rápidos, precisos e sensíveis tem sido prioridade. Apesar dos avanços na instrumentação analítica, a etapa de preparo da amostra ainda é necessária e extremamente importante. As amostras ambientais são complexas e é essencial pré-concentrar os analitos e eliminar e/ou remover os interferentes. Esse processo é fundamental para diminuir o efeito da matriz e evitar possíveis danos ao equipamento, além de com isso, obter uma fração enriquecida, representativa da amostra.

Visando um método analítico simples, que seja seletivo e permita ser automatizado, a extração em fase sólida (SPE) surge como alternativa extremamente viável para o caso ¹¹⁷. Introduzida no início dos anos 70, a SPE é uma técnica de extração por sorção. Essa técnica surgiu buscando substituir a tradicional extração líquido-líquido (LLE), já que a LLE requer grandes volumes de amostras e solventes, existe a possibilidade de formação de emulsão, e ainda os solventes usados nesse tipo de extração são tóxicos como clorofórmio, tolueno, hexano e outros ^{117,118}.

A SPE é a técnica mais popular de preparo de amostras e em sua forma convencional utiliza-se fases sólidas chamadas sorventes, as quais são similares às aquelas utilizadas em cromatografia líquida em coluna, localizada entre dois filtros de polietileno, politetrafluoretileno ou aço inoxidável, imobilizadas em um cartucho. As fases sólidas disponíveis comercialmente são baseadas em grupos orgânicos como C18, C8, ciclo-hexil, fenil e outros quimicamente ligados à sílica. Essas fases são as mesmas utilizadas nas colunas da cromatografia líquida. Além disso, existem outras fases como as de poliestireno divinilbenzeno, com alta área superficial, grande estabilidade em diferentes faixas de pH e alta capacidade de retenção, e o carbono grafitado, responsável por materiais mecânicos de baixa resistência, estrutura homogênea, cristalina e com grande poder de retenção ^{117,119,120}.

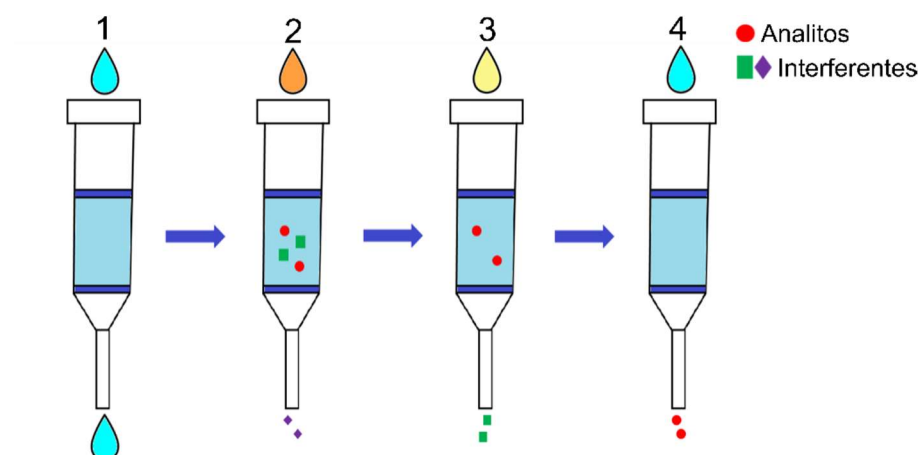
Embora exista uma extensa variedade de sorventes disponíveis comercialmente, o sorvente hidrofílico comercial mais conhecido é o Oasis HLB da Waters[®]. Este material é um copolímero macroporoso de polivinilpirrolidona-divinilbenzeno (PVP-DVB) que demonstrou-se versátil para extrair compostos com diferentes polaridades e remover interferentes de matrizes complexas ¹²¹.

O desenvolvimento do método analítico utilizando SPE em análise ambiental permitiu o uso de grandes volumes de amostra, em torno de 50 a 1000 mL ¹²¹, e, como indicado por Jardim (2010, p. 15) ¹¹⁷ “a concentração pode ser aumentada em um fator de 100 a 5000, possibilitando a análise qualitativa e quantitativa a níveis de traço.”

Além desta fase estacionária, outros sorventes poliméricos hidrofílicos também foram desenvolvidos, tais como o Bond Elut Plexa (Agilent Technologies[®]) ¹²¹ ou o Strata-X (Phenomenex[®]) ^{121,122} ambos também já utilizados em análises de amostras ambientais.

A SPE é uma técnica que requer pelo menos quatro etapas para a preparação da amostra: condicionamento/ativação do sorvente, percolação da amostra, limpeza da coluna para remover os interferentes (clean-up) e eluição e coleta dos analitos ^{117,122,123}. A **Figura 1.3** ilustra as etapas descritas anteriormente.

Figura 1.3 - Etapas analíticas de preparo de amostra utilizando extração em fase sólida: 1) condicionamento; 2) carregamento da amostra; 3) limpeza (clean-up); 4) eluição.



Fonte: Adaptado e retirado de Marasco et al. (2019) ¹.

Essa técnica tem aplicações extensas, sendo uma técnica consolidada na preparação de amostras, principalmente no campo ambiental, visto que a EPA estabelece a SPE como técnica padrão para preparo de amostras na análise de contaminantes orgânicos ^{115,123}.

Também vale destacar que ao longo dos últimos anos, além do desenvolvimento de novos materiais sorventes, muitas modificações, sendo a maioria baseada na miniaturização e automação, resultaram no surgimento de novas técnicas de extração, como extração dinâmica em fase sólida (SPDE), microextração por sorvente empacotado (MEPS), extração sortiva por barra de agitação (SBSE), dispersão da matriz em fase sólida (MSPD), microextração em fase sólida (SPME) entre outras tecnologias, que também foram aplicadas no preparo de amostras de águas residuárias ^{121,123}.

Embora a configuração convencional de SPE (SPE off-line) seja a escolha mais comum e o método mais usado no preparo de amostras, trata-se de um procedimento tedioso e demorado. Neste modo, a análise cromatográfica é separada do procedimento de tratamento de amostra e, a fim de evitar contaminação cruzada, perda da amostra, diminuição do volume de solventes utilizados e aumentar a frequência analítica, é fundamental integrar ambas as etapas em processo único, sequencial e automatizado.

A SPE on-line incorpora todas as etapas envolvidas na SPE convencional em um sistema integrado à cromatografia. Para que essa integração ocorra efetivamente utilizamos de uma estratégia denominada comutação de colunas (column switching) que permite a análise integrada de maneira eficiente e produtiva ¹¹⁹. A **Tabela 1.4** mostra um comparativo entre as estratégias de preparo de amostra.

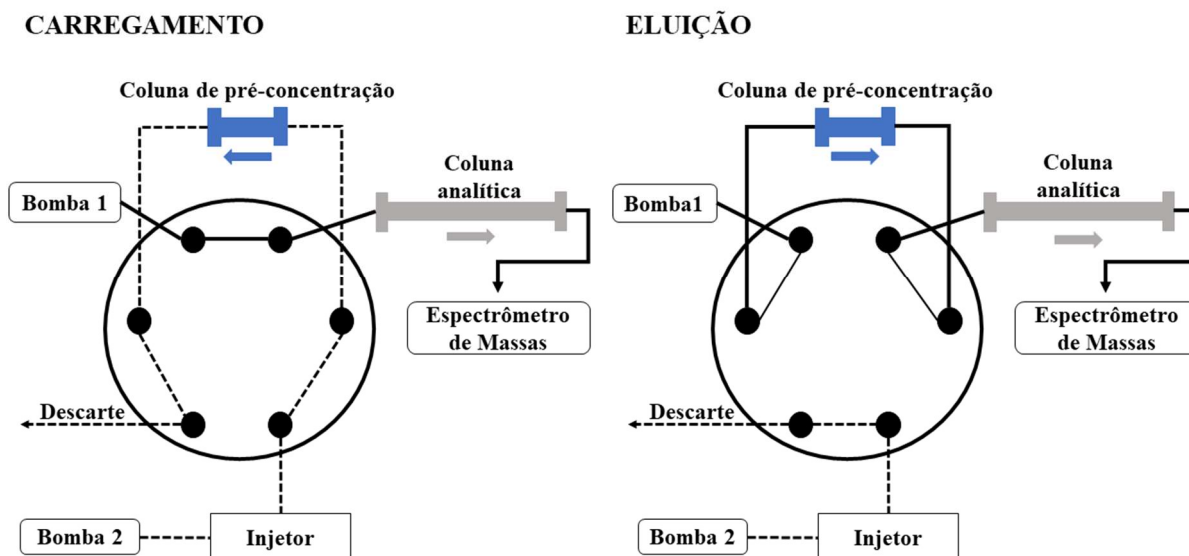
Tabela 1.4 - Correlação das características dos sistemas de SPE on-line e off-line.

SPE on-line	SPE off-line
Automação	Procedimento manual
Mínima manipulação da amostra e menor volume de amostra requerido	Manipulação excessiva da amostra e maior volume de amostra requerido
Cartucho reutilizável	Cartuchos descartáveis
Não há perda de analito por evaporação	Possível perda de analito por evaporação
Baixo consumo de solventes	Consumo elevado de solventes para eluição
Tempo de análise reduzido	Tempo de análise mais longo
Custo elevado do sistema	Sistema de custo baixo
Maior efeito matriz e efeito de memória (carryover)	Menor efeito matriz
Menor flexibilidade	Maior flexibilidade (combinação de cartuchos em série)

Fonte: Retirado e adaptado de Borges et al. (2015) ¹¹⁹, Rodríguez-Mozaz et al. (2007) ¹²⁴ e Kataoka et al. (2012) ¹²⁵.

O acoplamento dessa técnica tornou-se acessível, com base em um arranjo instrumental que inclui o acoplamento de uma válvula de seis portas e duas posições ao sistema. Dessa maneira, o sistema funciona usando duas bombas, na qual uma bomba faz o carregamento da amostra na coluna de pré-concentração, e os analitos são retidos na mesma. Em seguida, a outra bomba faz a eluição dos analitos usando gradiente de eluição para a coluna analítica ^{123,126}. O sistema descrito pode ser visualizado na **Figura 1.4**.

Figura 1.4 - Sistema de comutação de colunas no modo backflush (eluição ocorre em sentido reverso ao de pré-concentração).



Fonte: Retirado e adaptado de Axel et al. (2017) ¹²⁷.

Em resumo, a SPE on-line permite trabalhar sequencialmente em um sistema automatizado de injeção do sistema cromatográfico, sendo possível desenvolver métodos rápidos e automatizados. Por exemplo, Ferrer-Aguirre et al. (2016) ¹²⁸ utilizando SPE-LC-MS/MS para análises de contaminantes emergentes em amostras do rio Almanzora e de represas localizados no sudeste da Espanha, obtiveram limites de quantificação menores ou iguais a 10 ng L⁻¹ em apenas 18 minutos de análise, que totalizam o tempo de preparo de amostra e separação cromatográfica.

O desenvolvimento de novas fases estacionárias permitiu desenvolver métodos adequados em matrizes ambientais complexas e fornecer uma análise eficiente e bem-sucedida. Assim, em substituição às tradicionais fases estacionárias utilizadas em extração em fase sólida e que também permitem o acoplamento ao sistema cromatográfico como descrito acima, surge como alternativa os materiais de acesso restrito (RAM).

A expressão meio de acesso restrito foi introduzida em 1991 por Desilets et al. para se referir a materiais adsorventes biocompatíveis que permitem injeção direta de amostras, com mínimo de processamento, sendo necessário apenas uma filtração, centrifugação ou diluição inferior a 10 % para remoção de materiais particulados, de forma a não descaracterizar uma injeção direta de amostra ^{113,119,120}.

Os sorventes RAM são capazes de extrair vários tipos de analitos diretamente de fluidos biológicos não tratados, e com isso, sua aplicação tem se expandido para amostras ambientais e alimentícias ^{113,129}.

Os sorventes RAM tem seu funcionamento baseado no princípio de exclusão por tamanho, pois excluem os componentes de alta massa molar da matriz enquanto retém e separam pequenas moléculas por meio de interações hidrofóbicas, hidrofílicas, iônicas, de afinidade ou de impressão molecular, ocorrendo, simultaneamente, o mecanismo de exclusão por tamanho e o de troca iônica ¹¹⁹.

Comparado aos tradicionais cartuchos de SPE, os sorventes RAM apresentam maior tempo de vida, elevada eficiência de separação e recuperação de analitos, diminuição do uso de solventes e do custo total por análise, sendo o sorvente RAM-BSA (albumina do soro bovino) àquele com elevada capacidade de exclusão molecular e viável para uma rotina de análises ¹³⁰.

Ademais, os materiais de acesso restrito utilizados conjuntamente com sistemas cromatográficos oferecem boas perspectivas, como a injeção direta de amostras complexas sem necessitar de tratamento prévio ¹³⁰. Podem, inclusive, serem utilizadas em dois modos: modo unidimensional, no qual a coluna RAM é responsável pela exclusão das macromoléculas e separação dos analitos, enquanto no modo bidimensional, a coluna RAM é utilizada para excluir as macromoléculas e pré-concentrar os analitos, enquanto a separação ocorre em segunda dimensão em uma coluna cromatográfica ^{113,119}.

Portanto, pode-se notar que a automação do procedimento de preparo de amostras usando column switching, e consequentemente, do acoplamento ao sistema LC-MS/MS, permitiu um grande progresso na análise de amostras ambientais, especialmente, de contaminantes emergentes, provando ser rápido, preciso e com menor consumo de solvente, aumentando a frequência analítica. Além disso, podemos notar que os esforços no desenvolvimento de novos materiais sorventes, bem como no avanço da instrumentação analítica para atingir níveis de concentração cada vez menores tem permitido melhorar a qualidade das análises e a confiabilidade dos dados. Fato esse fundamental para fornecer informações concretas relativas à ocorrência e dinâmica dos contaminantes emergentes em águas residuárias.

REFERÊNCIAS

- (1) MARASCO JÚNIOR, C. A.; LUCHIARI, N. D. C.; LIMA GOMES, P. C. F. Occurrence of caffeine in wastewater and sewage and applied techniques for analysis: a review. **Eclética Química Journal**, v. 44, n. 4, p. 11, 2019.
 - (2) CHINNAIYAN, P. et al. Pharmaceutical products as emerging contaminant in water: relevance for developing nations and identification of critical compounds for Indian environment. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 190, n. 5, p. 288, 2018.
 - (3) GOVERNMENT ACCOUNTABILITY OFFICE (GAO). **Toxic Chemicals-High Risk Issue**. Disponível em: https://www.gao.gov/key_issues/toxic_chemicals/issue_summary. Acesso em: 6 jan. 2020
 - (4) MOHAPATRA, D. P.; KIRPALANI, D. M. Advancement in treatment of wastewater: Fate of emerging contaminants. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 97, n. 10, p. 2621–2631, 2019.
 - (5) GROS, M.; RODRÍGUEZ-MOZAZ, S.; BARCELÓ, D. Rapid analysis of multiclass antibiotic residues and some of their metabolites in hospital, urban wastewater and river water by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1292, p. 173–188, 2013.
 - (6) QUESADA, H. B. et al. Surface water pollution by pharmaceuticals and an alternative of removal by low-cost adsorbents: A review. **Chemosphere**, v. 222, p. 766–780, 2019.
 - (7) SILVA, C. G. A. DA; COLLINS, C. H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 665–676, 2011.
 - (8) MONTAGNER, C. C.; VIDAL, C.; ACAYABA, R. Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. **Química Nova**, v. 40, n. 9, p. 1094–1110, 2017.
 - (9) AUBAKIROVA, B.; BEISENOVA, R.; BOXALL, A. B. Prioritization of pharmaceuticals based on risks to aquatic environments in Kazakhstan: Prioritization of Pharmaceuticals in Kazakhstan. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 13, n. 5, p. 832–839, 2017.
 - (10) BUTTIGLIERI, G.; KNEPPER, T. P. Removal of Emerging Contaminants in Wastewater Treatment: Conventional Activated Sludge Treatment. In: BARCELÓ, D.; PETROVIC, M. (Eds.). **Emerging Contaminants from Industrial and Municipal Waste**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2008. v. 5, p. 1–35.
 - (11) WORLD HEALTH ORGANIZATION/UNITED NATIONS INTERNATIONAL CHILDREN'S EMERGENCY FUND (WHO/UNICEF). **Progress on Drinking Water, Sanitation and Hygiene**. 2017.
-

- (12) AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS (ANA). **Atlas Esgotos: despoluição das bacias hidrográficas**. Disponível em: <<http://atlasesgotos.ana.gov.br/>>. Acesso em: 22 fev. 2020.
- (13) BRASIL. Ministério do Desenvolvimento Regional (Secretaria Nacional de Saneamento). **24º Diagnóstico Dos Serviços de Água e Esgoto**. 2018.
- (14) GEISSEN, V. et al. Emerging pollutants in the environment: A challenge for water resource management. **International Soil and Water Conservation Research**, v. 3, n. 1, p. 57–65, 2015.
- (15) SAUVÉ, S.; DESROSIERS, M. A review of what is an emerging contaminant. **Chemistry Central Journal**, v. 8, n. 1, p. 15, 2014.
- (16) NAÇÕES UNIDAS. **Águas residuais: O recurso inexplorado (Relatório Mundial das Nações Unidas sobre o Desenvolvimento dos Recursos Hídricos)**. 2017.
- (17) ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Federal Register**, v. 85, n. 140, p. 43990-44002, 2020. Disponível em: <https://www.govinfo.gov/content/pkg/FR-2020-07-21/pdf/2020-13462.pdf>. Acesso em 18 set. 2020.
- (18) BOLONG, N. et al. A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. **Desalination**, v. 239, n. 1–3, p. 229–246, 2009.
- (19) ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Contaminant Candidate List (CCL) and Regulatory Determination**, 2020. Disponível em: <https://www.epa.gov/ccl/contaminant-candidate-list-4-ccl-4-0>. Acesso em 18 mar. 2020.
- (20) ISLAS-FLORES, H.; GÓMEZ-OLIVÁN, L. M. Legislation Controlling the Discharge of Pharmaceuticals into the Environment. In: GÓMEZ-OLIVÁN, L. M. (Ed.). **Ecopharmacovigilance**. Cham: Springer International Publishing, 2017. v. 66, p. 95–117.
- (21) VON DER OHE, P. C. et al. A new risk assessment approach for the prioritization of 500 classical and emerging organic microcontaminants as potential river basin specific pollutants under the European Water Framework Directive. **Science of the Total Environment**, v. 409, n. 11, p. 2064–2077, 2011.
- (22) DULIO, V. et al. Emerging pollutants in the EU: 10 years of NORMAN in support of environmental policies and regulations. **Environmental Sciences Europe**, v. 30, n. 1, p. 5, 2018.
- (23) ELSEVIER. **Scopus**. Disponível em: <https://www.scopus.com>. Acesso em 15 set. 2020.
- (24) STARLING, M. C. V. M.; AMORIM, C. C.; LEÃO, M. M. D. Occurrence, control and fate of contaminants of emerging concern in environmental compartments in Brazil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 372, p. 17–36, 2019.
- (25) RIVERA-UTRILLA, J. et al. Pharmaceuticals as emerging contaminants and their removal from water. A review. **Chemosphere**, v. 93, n. 7, p. 1268–1287, 2013.
-

- (26) DÍAZ-CRUZ, M. S.; LÓPEZ DE ALDA, M. J.; BARCELÓ, D. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 6, p. 340–351, 2003.
- (27) AL-QAIM, F. F.; MUSSA, Z. H.; YUZIR, A. Development and validation of a comprehensive solid-phase extraction method followed by LC-TOF/MS for the analysis of eighteen pharmaceuticals in influent and effluent of sewage treatment plants. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, n. 20, p. 4829–4846, 2018.
- (28) PUCKOWSKI, A. et al. Bioaccumulation and analytics of pharmaceutical residues in the environment: A review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 127, p. 232–255, 2016.
- (29) DARWEESH, T. M.; AHMED, M. J. Adsorption of ciprofloxacin and norfloxacin from aqueous solution onto granular activated carbon in fixed bed column. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 138, p. 139–145, 2017.
- (30) BIAŁK-BIELIŃSKA, A. et al. Selected analytical challenges in the determination of pharmaceuticals in drinking/marine waters and soil/sediment samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 121, p. 271–296, 2016.
- (31) GRACIA-LOR, E. et al. Measuring biomarkers in wastewater as a new source of epidemiological information: Current state and future perspectives. **Environment International**, v. 99, p. 131–150, 2017.
- (32) GONÇALVES, E. S.; RODRIGUES, S. V.; SILVA-FILHO, E. V. DA. The use of caffeine as a chemical marker of domestic wastewater contamination in surface waters: seasonal and spatial variations in Teresópolis, Brazil. **Ambiente e Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 12, n. 2, p. 192, 2017.
- (33) WU, J. et al. Use of Caffeine and Human Pharmaceutical Compounds to Identify Sewage Contamination. **World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Medical, Health, Biomedical, Bioengineering and Pharmaceutical Engineering**, v. 2, n. 8, p. 5, 2008.
- (34) JAMES, J. E. Critical Review of Dietary Caffeine and Blood Pressure: A Relationship That Should Be Taken More Seriously. **Psychosomatic Medicine**, v. 66, n. 1, p. 63–71, 2004.
- (35) NAKBI, A. et al. Investigation of caffeine taste mechanism through a statistical physics modeling of caffeine dose-taste response curve by a biological putative caffeine adsorption process in electrophysiological response. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 149, p. 70–85, 2019.
- (36) EDWARDS, Q. A.; KULIKOV, S. M.; GARNER-O'NEALE, L. D. Caffeine in surface and wastewaters in Barbados, West Indies. **SpringerPlus**, v. 4, n. 1, p. 1–12, 2015.
- (37) HAI, F. et al. Carbamazepine as a Possible Anthropogenic Marker in Water: Occurrences, Toxicological Effects, Regulations and Removal by Wastewater Treatment Technologies. **Water**, v. 10, n. 2, p. 107, 2018.
-

- (38) LÖFFLER, D. et al. Environmental Fate of Pharmaceuticals in Water/Sediment Systems. **Environmental Science & Technology**, v. 39, n. 14, p. 5209–5218, 2005.
- (39) NKOOM, M. et al. Bioconcentration of the antiepileptic drug carbamazepine and its physiological and biochemical effects on *Daphnia magna*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 172, p. 11–18, 2019.
- (40) BHATTACHARYA, P. et al. Development and performance evaluation of a novel CuO/TiO₂ ceramic ultrafiltration membrane for ciprofloxacin removal. **Materials Chemistry and Physics**, v. 229, p. 106–116, 2019.
- (41) CHEN, L. et al. Multivariate optimization of ciprofloxacin removal by polyvinylpyrrolidone stabilized NZVI/Cu bimetallic particles. **Chemical Engineering Journal**, v. 365, p. 183–192, 2019.
- (42) ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE (PAHO). **Folha informativa - Depressão**. Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5635:folha-informativa-depressao&Itemid=1095. Acesso em: 25 mar. 2020.
- (43) CORREIO BRAZILIENSE. **Alerta na saúde: cresce o consumo de antidepressivos no Brasil**. Disponível em: <https://www.correiobraziliense.com.br/app/noticia/brasil/2020/01/12/interna-brasil,819930/alerta-na-saude-cresce-o-consumo-de-antidepressivos-no-brasil.shtml>. Acesso em: 13 fev. 2020.
- (44) FORAN, C. M. et al. Reproductive Assessment of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Following a Four-Week Fluoxetine (SSRI) Exposure. **Environmental contamination and toxicology**, v. 517, p. 511–517, 2004.
- (45) STYRISHAVE, B.; HALLING-SØRENSEN, B.; INGERSLEV, F. Environmental risk assessment of three selective serotonin reuptake inhibitors in the aquatic environment: A case study including a cocktail scenario. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, n. 1, p. 254–261, 2011.
- (46) KUS, T. et al. Efficacy of venlafaxine for the relief of taxane and oxaliplatin-induced acute neurotoxicity: a single-center retrospective case–control study. **Supportive Care in Cancer**, v. 24, n. 5, p. 2085–2091, 2016.
- (47) BAI, X. et al. Occurrence, distribution, and seasonality of emerging contaminants in urban watersheds. **Chemosphere**, v. 200, p. 133–142, 2018.
- (48) BIEL-MAESO, M. et al. Occurrence, distribution and environmental risk of pharmaceutically active compounds (PhACs) in coastal and ocean waters from the Gulf of Cadiz (SW Spain). **Science of the Total Environment**, v. 612, p. 649–659, 2018.
-

- (49) CHEN, W.-L.; CHENG, J.-Y.; LIN, X.-Q. Systematic screening and identification of the chlorinated transformation products of aromatic pharmaceuticals and personal care products using high-resolution mass spectrometry. **Science of the Total Environment**, v. 637–638, p. 253–263, 2018.
- (50) BHANDARI, A. et al. Occurrence of Ciprofloxacin, Sulfamethoxazole, and Azithromycin in Municipal Wastewater Treatment Plants. **Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management**, v. 12, n. 4, p. 275–281, 2008.
- (51) KAF AEI, R. et al. Occurrence, distribution, and potential sources of antibiotics pollution in the water-sediment of the northern coastline of the Persian Gulf, Iran. **Science of the Total Environment**, v. 627, p. 703–712, 2018.
- (52) SENTA, I. et al. Wastewater analysis to monitor use of caffeine and nicotine and evaluation of their metabolites as biomarkers for population size assessment. **Water Research**, v. 74, p. 23–33, 2015.
- (53) GONZÁLEZ-ALONSO, S. et al. Occurrence of pharmaceutical, recreational and psychotropic drug residues in surface water on the northern Antarctic Peninsula region. **Environmental Pollution**, v. 229, p. 241–254, 2017.
- (54) BIEL-MAESO, M.; CORADA-FERNÁNDEZ, C.; LARA-MARTÍN, P. A. Monitoring the occurrence of pharmaceuticals in soils irrigated with reclaimed wastewater. **Environmental Pollution**, v. 235, p. 312–321, 2018.
- (55) KHAZRI, H. et al. Presence of carbamazepine, naproxen, and ibuprofen in wastewater from northern Tunisia. **Environmental Forensics**, v. 20, n. 2, p. 121–128, 2019.
- (56) BAKER, D. R.; KASPRZYK-HORDERN, B. Spatial and temporal occurrence of pharmaceuticals and illicit drugs in the aqueous environment and during wastewater treatment: New developments. **Science of the Total Environment**, v. 454–455, p. 442–456, 2013.
- (57) SCHLÜSENER, M. P. et al. Occurrence of venlafaxine, other antidepressants and selected metabolites in the Rhine catchment in the face of climate change. **Environmental Pollution**, v. 196, p. 247–256, 2015.
- (58) RÚA-GÓMEZ, P. C.; PÜTTMANN, W. Occurrence and removal of lidocaine, tramadol, venlafaxine, and their metabolites in German wastewater treatment plants. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, n. 3, p. 689–699, 2012.
- (59) STUMPF, M. et al. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 225, n. 1–2, p. 135–141, 1999.
- (60) TERNES, T. A. et al. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants – I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 225, n. 1–2, p. 81–90, 1999.
-

- (61) MACHADO, K. C. et al. A preliminary nationwide survey of the presence of emerging contaminants in drinking and source waters in Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 572, p. 138–146, 2016.
- (62) TORRES, N. H. et al. Detection of hormones in surface and drinking water in Brazil by LC-ESI-MS/MS and ecotoxicological assessment with *Daphnia magna*. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 187, n. 6, p. 379, 2015.
- (63) SODRÉ, F. F.; LOCATELLI, M. A. F.; JARDIM, W. F. Occurrence of Emerging Contaminants in Brazilian Drinking Waters: A Sewage-To-Tap Issue. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 206, n. 1–4, p. 57–67, 2010.
- (64) SOLANO, M. de L.M. et al. Potential endocrine disruptor activity of drinking water samples. **Endocrine Disruptors**, v. 3, n. 1, 2015.
- (65) QUEIROZ, F. B. et al. Determination of Endocrine Disrupters and Pharmaceuticals in Sewage Samples by Tandem Solid Phase Clean up/Extraction and High Performance Liquid Chromatography-Negative and Positive Electrospray High-Resolution Mass Spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 2, p. 298-312, 2014.
- (66) QUEIROZ, F. B. et al. Occurrence of pharmaceuticals and endocrine disruptors in raw sewage and their behavior in UASB reactors operated at different hydraulic retention times. **Water Science and Technology**, v. 66, n. 12, p. 2562–2569, 2012.
- (67) CALDAS, S. S. et al. Determination of pharmaceuticals, personal care products, and pesticides in surface and treated waters: method development and survey. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 8, p. 5855–5863, 2013.
- (68) CAMPESTRINI, I.; JARDIM, W. F. Occurrence of cocaine and benzoylecgonine in drinking and source water in the São Paulo State region, Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 576, p. 374–380, 2017.
- (69) FEITOSA, R. S.; SODRÉ, F. F.; MALDANER, A. O. Drogas de abuso em águas naturais e residuárias urbanas: ocorrência, determinação e aplicações forenses. **Química Nova**, v. 36, n. 2, p. 291–305, 2013.
- (70) MONTAGNER, C. C. et al. Trace analysis of pesticides and an assessment of their occurrence in surface and drinking waters from the State of São Paulo (Brazil). **Analytical Methods**, v. 6, n. 17, p. 6668–6677, 2014.
- (71) CALDAS, S. S. et al. Occurrence of Pesticides and PPCPs in Surface and Drinking Water in Southern Brazil: Data on 4-Year Monitoring. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, vol. 30, n. 1, p. 71-80, 2019.
- (72) FERREIRA, A. P. Caffeine as an environmental indicator for assessing urban aquatic ecosystems. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, n. 6, p. 1884–1892, 2005.
-

- (73) SPOSITO, J. C. V. et al. Emerging contaminants in Brazilian rivers: Occurrence and effects on gene expression in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Chemosphere**, v. 209, p. 696–704, 2018.
- (74) CAMPANHA, M. B. et al. A 3-year study on occurrence of emerging contaminants in an urban stream of São Paulo State of Southeast Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 10, p. 7936–7947, 2015.
- (75) MONTAGNER, C. C.; JARDIM, W. F. Spatial and seasonal variations of pharmaceuticals and endocrine disruptors in the Atibaia River, São Paulo State (Brazil). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 8, p. 1452–1462, 2011.
- (76) SODRÉ, F. F.; CAVALCANTI, C. M. P. Method Development for Assessing Carbamazepine, Caffeine, and Atrazine in Water Sources from the Brazilian Federal District Using UPLC-QTOF/MS. **International Journal of Analytical Chemistry**, p. 1–10, 2018.
- (77) MARTINS, A. F. et al. Concentration of Ciprofloxacin in Brazilian Hospital Effluent and Preliminary Risk Assessment: A Case Study. **CLEAN – Soil, Air, Water**, v. 36, n. 3, p. 264–269, 2008.
- (78) RODRIGUES-SILVA, C. et al. Fluoroquinolones in Hospital Wastewater: Analytical Method, Occurrence, Treatment with Ozone and Residual Antimicrobial Activity Evaluation. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 7, p. 1447–1457, 2019.
- (79) BISOGNIN, R. P. et al. Occurrence and fate of pharmaceuticals in effluent and sludge from a wastewater treatment plant in Brazil. **Environmental Technology**, p. 1–12, 2019.
- (80) JANK, L. et al. Simultaneous determination of eight antibiotics from distinct classes in surface and wastewater samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 94, n. 10, p. 1013–1037, 2014.
- (81) NAÇÕES UNIDAS. **Estudo mostra alta concentração de antibióticos nas águas de rios do mundo**. Disponível em: <https://nacoesunidas.org/estudo-mostra-alta-concentracao-de-antibioticos-nas-aguas-de-rios-do-mundo/>. Acesso em: 10 maio 2020.
- (82) ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Risk Assessment**. Disponível em: <https://www.epa.gov/risk>. Acesso em: 23 mar. 2020.
- (83) CUNHA, V. et al. Effects of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) on multixenobiotic resistance (MXR) related efflux transporter activity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 136, p. 14–23, 2017.
- (84) FRAZ, S.; LEE, A. H.; WILSON, J. Y. Gemfibrozil and carbamazepine decrease steroid production in zebra fish testes (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**, v. 198, p. 1–9, 2018.
-

- (85) SEHONOVA, P. et al. Effects of waterborne antidepressants on non-target animals living in the aquatic environment : A review. **Science of the Total Environment**, v. 631–632, p. 789–794, 2018.
- (86) AL-KHAZRAJY, O. S. A.; BOXALL, A. B. A. Impacts of compound properties and sediment characteristics on the sorption behaviour of pharmaceuticals in aquatic systems. **Journal of Hazardous Materials**, v. 317, p. 198–209, 2016.
- (87) LIMA, D. R. S. et al. Fármacos e desreguladores endócrinos em águas brasileiras: ocorrência e técnicas de remoção. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 22, n. 6, p. 1043–1054, 2017.
- (88) HUERTA, B. et al. Exploring the links between antibiotic occurrence, antibiotic resistance, and bacterial communities in water supply reservoirs. **Science of the Total Environment**, v. 456–457, p. 161–170, 2013.
- (89) BOILLOT, C. et al. In vivo exposure of marine mussels to carbamazepine and and metabolism. **Science of the Total Environment**, v. 532, p. 564–570, 2015.
- (90) BRANDÃO, F. P. et al. Short-term effects of neuroactive pharmaceutical drugs on a fish species: Biochemical and behavioural effects. **Aquatic Toxicology**, v. 145, p. 218–229, 2013.
- (91) CHEN, H. et al. Characterization of antibiotics in a large-scale river system of China: Occurrence pattern, spatiotemporal distribution and environmental risks. **Science of the Total Environment**, v. 618, p. 409–418, 2018.
- (92) THOMÉ, S. et al. Recombinagenic and mutagenic activities of fluoroquinolones in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 742, n. 1–2, p. 43–47, 2012.
- (93) LIU, B. et al. Growth response and toxic effects of three antibiotics on *Selenastrum capricornutum* evaluated by photosynthetic rate and chlorophyll biosynthesis. **Journal of Environmental Sciences**, v. 23, n. 9, p. 1558–1563, 2011.
- (94) LANGE, H. J. et al. Behavioural Responses of *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) to Low Concentrations of Pharmaceuticals. **Aquatic Toxicology**, v. 78, n. 3, p. 209–216, 2006.
- (95) SCHULTZ, M. M. et al. Selective uptake and biological consequences of environmentally relevant antidepressant pharmaceutical exposures on male fathead minnows. **Aquatic Toxicology**, v. 104, n. 1-2, p. 38–47, 2011.
- (96) DAVID, A. et al. Concentrating mixtures of neuroactive pharmaceuticals and altered neurotransmitter levels in the brain of fish exposed to a wastewater effluent. **Science of the Total Environment**, v. 621, p. 782–790, 2018.
-

- (97) FERNÁNDEZ, I. et al. Fish as a model to assess chemical toxicity in bone. **Aquatic Toxicology**, v. 194, p. 208–226, 2018.
- (98) FARIAS, A. R. et al. **Comunicado Técnico - Identificação, mapeamento e quantificação das áreas urbanas do Brasil**, p. 1-5, 2017.
- (99) COSTA, K. S. et al. Utilização de medicamentos e fatores associados: um estudo de base populacional no Município de Campinas, São Paulo, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 27, n. 4, p. 649–658, 2011.
- (100) RADJENOVIC, J. et al. Membrane Bioreactor (MBR) as an Advanced Wastewater Treatment Technology. In: BARCELÓ, D.; PETROVIC, M. (Eds.). **Emerging Contaminants from Industrial and Municipal Waste**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2008. v. 5, p. 37–101.
- (101) KUNST, B.; Košutić, K. Removal of Emerging Contaminants in Water Treatment by Nanofiltration and Reverse Osmosis. In: BARCELÓ, D.; PETROVIC, M. (Eds.). **Emerging Contaminants from Industrial and Municipal Waste**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2008. v. 5, p. 103-125.
- (102) ZAIAT, M.; PASSIG, F. H.; FORESTI, E. Treatment of Domestic Sewage in Horizontal-Flow Anaerobic Immobilized Biomass (HAIB) Reactor. **Environmental Technology**, v. 21, n. 10, p. 1139–1145, 2000.
- (103) RIBEIRO, R. et al. BTEX removal in a horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactor under denitrifying conditions. **Biodegradation**, v. 24, n. 2, p. 269–278, 2013.
- (104) GUSMÃO, V. R. et al. BTEX and ethanol removal in horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactor, under denitrifying condition. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 6, p. 1391–1400, 2006.
- (105) DAMIANOVIC, M. H. R. Z. et al. Pentachlorophenol (PCP) dechlorination in horizontal-flow anaerobic immobilized biomass (HAIB) reactors. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 19, p. 4361–4367, 2009.
- (106) CHATILA, S. et al. Sulfamethoxazole and ciprofloxacin removal using a horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactor. **Environmental Technology**, v. 37, n. 7, p. 847–853, 2016.
- (107) OLIVEIRA, G. H. D.; SANTOS-NETO, A. J.; ZAIAT, M. Removal of the veterinary antimicrobial sulfamethazine in a horizontal-flow anaerobic immobilized biomass (HAIB) reactor subjected to step changes in the applied organic loading rate. **Journal of Environmental Management**, v. 204, p. 674–683, 2017.
- (108) OLIVEIRA, C. A. et al. Removal kinetics of sulfamethazine and its transformation products formed during treatment using a horizontal flow-anaerobic immobilized biomass bioreactor. **Journal of Hazardous Materials**, v. 365, p. 34–43, 2019.
-

- (109) MARTINS, G. S. et al. Removal of sulfamethoxazol and trimethoprim using horizontal-flow anaerobic immobilized bioreactor. **Scientia Chromatographica**, v. 9, n. 4, p. 253–264, 2017.
- (110) RODRÍGUEZ, A. et al. Ozone-Based Technologies in Water and Wastewater Treatment. In: BARCELÓ, D.; PETROVIC, M. (Eds.). **Emerging Contaminants from Industrial and Municipal Waste**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2008. v. 5, p. 127–175.
- (111) MALATO, S. Removal of Emerging Contaminants in Waste-water Treatment: Removal by Photo-catalytic Processes. In: BARCELÓ, D.; PETROVIC, M. (Eds.). **Emerging Contaminants from Industrial and Municipal Waste**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2008. v. 5, p. 177–197.
- (112) JOVANČIĆ, P.; RADETIĆ, M. Advanced Sorbent Materials for Treatment of Wastewaters. In: BARCELÓ, D.; PETROVIC, M. (Eds.). **Emerging Contaminants from Industrial and Municipal Waste**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2008. v. 5, p. 239–264.
- (113) CASS, Q. B.; CASSIANO, N. M. **Cromatografia líquida: novas tendências e aplicações**. 1. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
- (114) ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Method 1698: Steroids and Hormones in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HRGC/HRMS**. 2007.
- (115) ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Method 1694 : Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/MS/MS**. 2007.
- (116) LEITE, G. DE S.; AFONSO, R. J. DE C. F.; AQUINO, S. F. DE. Caracterização de contaminantes presentes em sistemas de tratamento de esgotos, por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas tandem em alta resolução. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 734–738, 2010.
- (117) JARDIM, I. C. S. F. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 1, p. 13–25, 2010.
- (118) DIMPE, K. M.; NOMNGONGO, P. N. Current sample preparation methodologies for analysis of emerging pollutants in different environmental matrices. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 82, p. 199–207, 2016.
- (119) BORGES, K. B.; FIGUEIREDO, E. C. DE; QUEIROZ, M. E. C. **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. 1. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2015.
- (120) PŁOTKA-WASYLKA, J. et al. Modern trends in solid phase extraction: New sorbent media. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 77, p. 23–43, 2016.
-

- (121) GILART, N. et al. Selective materials for solid-phase extraction in environmental analysis. **TrAC - Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 1, p. e8–e18, 2014.
- (122) BUSZEWSKI, B.; SZULTKA, M. Past, Present, and Future of Solid Phase Extraction: A Review. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 42, n. 3, p. 198–213, 2012.
- (123) ANDRADE-EIROA, A. et al. Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I). **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 80, p. 641–654, 2016.
- (124) RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; LOPEZ DE ALDA, M. J.; BARCELÓ, D. Advantages and limitations of on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography–mass spectrometry technologies versus biosensors for monitoring of emerging contaminants in water. **Journal of Chromatography A**, v. 1152, n. 1–2, p. 97–115, 2007.
- (125) KATAOKA, H. Column-Switching Sample Preparation. **Comprehensive Sampling and Sample Preparation**. Elsevier, 2012. v. 2, p. 649–676.
- (126) LIMA GOMES, P. C. F. et al. Rapid determination of 12 antibiotics and caffeine in sewage and bioreactor effluent by online column-switching liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 29, p. 8787–8801, 2015.
- (127) AXEL, M. et al. An online SPE LC-MS/MS method for the analysis of antibiotics in environmental water. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 9, p. 8692–8699, 2017.
- (128) FERRER-AGUIRRE, A. et al. Simple and quick determination of analgesics and other contaminants of emerging concern in environmental waters by on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1446, p. 27–33, 2016.
- (129) FARIA, H. D. et al. New advances in restricted access materials for sample preparation: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 959, p. 43–65, 2017.
- (130) PENG, J. et al. New techniques of on-line biological sample processing and their application in the field of biopharmaceutical analysis. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 6, n. 6, p. 540–551, 2016.
-

Capítulo 2

MÉTODO AUTOMATIZADO PARA DETERMINAR COMPOSTOS FARMACÊUTICOS EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS UTILIZANDO EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA ON-LINE ACOPLADA A LC-MS/MS

2 MÉTODO AUTOMATIZADO PARA DETERMINAR COMPOSTOS FARMACÊUTICOS EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS UTILIZANDO EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA ON-LINE ACOPLADA A LC-MS/MS

2.1 INTRODUÇÃO

Compostos farmacêuticos e produtos de cuidado pessoal (PPCPs) são substâncias amplamente presentes na sociedade moderna ¹. Estes compostos, quando consumidos ou descartados incorretamente após o vencimento, podem atingir a rede de esgoto. Aliado a isso, tem-se o fato de que as atuais estações de tratamento de efluente (ETEs) não foram projetadas para tratar e/ou remover completamente estes compostos ^{2,3}. Estes compostos são encontrados no ambiente em níveis de concentração que variam de ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$ em efluentes de ETEs, esgotos não tratados, e frequentemente em outros corpos d'água, como em águas superficiais e subterrâneas ⁴. Conhecidos como contaminantes emergentes, estes compostos podem representar um potencial risco a saúde humana e/ou ao ambiente, visto que não há nenhuma lei/legislação estabelecida que regule o descarte e controle destes compostos ^{3,5}.

O desenvolvimento da indústria farmacêutica aliado ao crescimento populacional tem permitido que cerca de 1500 novos compostos químicos sejam inseridos no ambiente a cada ano, segundo apontado pelo Government Accountability Office (GAO). Desta forma, o fluxo de inserção destes compostos no ambiente supera a velocidade de estudos e a capacidade das atuais técnicas analíticas de detectar estes compostos na mesma velocidade com que são introduzidos, dificultando a compreensão da dinâmica destes compostos no ambiente ⁶. Para isso, um grande desenvolvimento em instrumentação analítica, especialmente, em espectrometria de massas, como por exemplo, melhorias na ionização da amostra, permitiu a detecção compostos em níveis de concentração de pg L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$ ^{3,7-9}.

Esse avanço analítico foi essencial para análise de contaminantes emergentes em águas residuárias, e a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) tem sido a técnica de escolha para esse objetivo. Isso se deve à versatilidade da técnica, capaz de atingir limites de detecção e quantificação que esses contaminantes são encontrados no ambiente ^{3,5,10,11}.

Apesar dos avanços na instrumentação analítica, a análise de matrizes ambientais é muito complexa e a etapa de preparo da amostra é extremamente importante para pré-concentrar os compostos alvo, diminuir o efeito da matriz e evitar danos ao instrumento ^{3,12,13}.

Atualmente, a extração em fase sólida (SPE) é a técnica mais popular e consolidada para o preparo de amostras, principalmente para amostras aquosas ambientais ^{3,5,14,15}. Além disso, o método da Environmental Protection Agency (EPA) estabelece a SPE como técnica padrão de preparo de amostras para análise de contaminantes orgânicos ^{16,17}.

A SPE off-line é a configuração convencional mais comumente utilizada, embora seja um procedimento tedioso e demorado, e que requer no mínimo quatro etapas para o preparo da amostra ¹⁷⁻¹⁹. Nesse modo, a análise cromatográfica não é acoplada ao procedimento de preparo da amostra; portanto, o tempo total de análise depende do tempo gasto no procedimento off-line.

Dadas essas desvantagens, a SPE on-line incorpora todas as etapas envolvidas na SPE convencional em um sistema integrado com a separação cromatográfica, que permite análises automatizadas, reduzindo a quantidade de solvente, amostra, tempo de análise e aumentando a frequência analítica ^{14,15,19,20}.

Para integração entre preparo de amostra e cromatografia, a comutação de colunas, conhecida como column switching, permite de maneira versátil, eficiente e produtiva, o desenvolvimento de métodos de análise automatizados, evitando a manipulação excessiva da amostra e a contaminação cruzada por meio de um arranjo instrumental simples, requerendo duas válvulas de seis portas no sistema cromatográfico ^{17,18}.

Segundo apontado por Valsecchi et al. (2015), a aplicação de técnicas de preparo de amostra on-line aplicadas ao LC-MS/MS permitiu o aumento de estudos relacionados a diferentes classes de contaminantes emergentes em amostras ambientais, como compostos perfluorados ²¹, drogas ilícitas ^{22,23}, compostos farmacêuticos ^{11,15,19}, desreguladores endócrinos ²⁴⁻²⁶, produtos de cuidados pessoais como benzotriazóis ^{14,27} e ácidos graxos e resinosos ²⁸.

Outra abordagem importante no estudo de contaminantes emergentes é a calibração. Apesar de LC-MS/MS ser a escolha para determinação de contaminantes emergentes, uma vez que apresenta seletividade e sensibilidade adequadas, o efeito da matriz ainda é persistente, causando supressão ou aumento do sinal analítico. O uso de substitutos deuterados pode melhorar os resultados analíticos e diminuir as interferências da matriz porque durante a ionização o padrão isotópico sofrerá os mesmos efeitos que os compostos alvo ²⁹⁻³³ conforme constatado por Gros et al. (2008) ³⁴. Estudos anteriormente publicados mostraram que o uso de padrões isotopicamente marcados é uma alternativa extremamente viável e capaz de compensar os efeitos da matriz na análise de fármacos em amostras ambientais ^{10,35,36}.

Com isso, a diluição isotópica tem sido a abordagem preferida e mais recomendada para minimizar a interferência da matriz quando os compostos marcados para cada analito alvo estiverem comercialmente disponíveis ^{30,37-41}. Em princípio, o substituto ideal do composto alvo deve ser o seu próprio composto isotopicamente marcado. No entanto, a falta de padrões para muitos compostos ainda é um fator limitante da abordagem ^{40,42,43}.

Para este estudo, carbamazepina (CBZ), ciprofloxacina (CIP), fluoxetina (FLX), norfloxacina (NOR), venlafaxina (VEN) e cafeína (CAF) foram os analitos selecionados. CAF and CBZ são marcadores de atividade antropogênica presentes em águas residuárias em níveis de concentração de $\mu\text{g L}^{-1}$ to ng L^{-1} ^{3,44,45}. CIP e NOR são antibióticos de amplo espectro da classe das fluoroquinolonas aplicados na medicina humana e veterinária. Em 2016, as quinolonas estiveram presentes em 30 milhões de prescrições nos EUA ⁴⁶. Além destes fato, o átomo de flúor presente na estrutura destes compostos garantindo resistência e persistência biológica e ambiental ^{47,48}. FLX e VEN são dois antidepressivos amplamente prescritos para o tratamento da depressão. Em 2017, FLX foi o 31º fármaco mais indicado nos EUA, com mais de 21 milhões de prescrições ⁴⁹. Já a VEN, aprovada para uso nos Estados Unidos em 1995, é o 49º produto farmacêutico mais prescrito nos EUA ⁵⁰, superando 16 milhões de prescrições anuais. Todos esses compostos apresentam alta ocorrência em esgotos, afluentes e efluentes de ETEs.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para isso, pretende-se desenvolver e validar um método utilizando o cartucho OASIS HLB[®] da Waters na etapa de preparo de amostra on-line acoplada a LC-MS/MS em conjunto com a calibração por diluição isotópica para determinar os compostos farmacêuticos supracitados em amostras de afluente e efluente coletadas de ETEs na região de Araraquara (SP-Brasil) durante a primavera-verão, esgoto doméstico coletado em São Carlos (SP-Brasil) e também em efluente hospitalar do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (SP-Brasil).

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1 Reagentes

Os padrões analíticos de CAF, NOR e CIP foram adquiridos na Sigma-Aldrich[®] (St. Louis, MO, EUA). Os padrões de CBZ e FLX foram adquiridos da Santa Cruz Biotechnology[®] (Dallas, TX, EUA) - ChemCruz[®] - e o padrão de VEN obtido da Toronto Research Chemicals[®] (North York, ON, CAN).

Os padrões isotópicos de cafeína-trimetil- $^{13}\text{C}_3$ (CAF- $^{13}\text{C}_3$), carbamazepina-D₁₀ (CBZ-D₁₀), ciprofloxacina-D₈ (CIP-D₈), fluoxetina-D₆ (FLX-D₆), norfloxacina-D₅ (NOR-D₅) e venlafaxina-D₆ (VEN-D₆) foram adquiridas da Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, EUA).

J.T. Baker® (Phillipsburg, NJ, EUA) forneceu os solventes utilizados como metanol (MeOH) e acetonitrila (ACN) grau HPLC, e também o ácido fórmico (88 %) usado como aditivo de eluente. A água foi purificada usando uma estação Simplicity UV da Merck® (Darmstadt, Hessen, GER).

Soluções estoque de 1 mg mL⁻¹ foram preparadas em metanol para CAF, CIP, CIP-D₈, NOR, NOR-D₅, VEN, CBZ e FLX. Para FLX-D₆, CBZ-D₁₀, CAF- $^{13}\text{C}_3$ e VEN-D₆, as soluções estoque foram preparadas na concentração de 0,1 mg mL⁻¹ em metanol. As soluções foram armazenadas sob refrigeração (-20 °C) e outras diluições foram preparadas em água de acordo com a demanda.

2.3.2 Método on-line SPE-LC-MS/MS

2.3.2.1 Parâmetros instrumentais MS/MS

A análise LC-MS/MS foi realizada utilizando um espectrômetro de massas AB SCIEX 3200 QTRAP (Foster City, CA, EUA) equipado com uma fonte de ionização por electrospray (ESI) turbo V Ion Source.

Os parâmetros dependentes da fonte de ionização por electrospray foram otimizados por análise por injeção em fluxo (FIA), como: gás de cortina (CUR) 20 V, nitrogênio gás de colisão (CAD) médio, temperatura da fonte (TEM) 650 °C, voltagem do íon spray (IS) 5000 V, gás de nebulização (GS1) 40 psi e gás secante (GS2) 45 psi. A fase móvel utilizada foi água e acetonitrila (50:50 v/v) com 0,1 % ácido fórmico a uma vazão de 0,6 mL min⁻¹, com injeções de 5 µL de uma solução de 1 mg L⁻¹ contendo todos os analitos alvo.

Os parâmetros para detecção por espectrometria de massas como potencial de decaimento (DP), energia de colisão (CE), potencial de entrada (EP), potencial de entrada da célula de colisão (CEP) e potencial de saída de célula de colisão (CXP) foram otimizados por infusão direta de solução padrão de cada composto na concentração de 1 mg L⁻¹.

O espectrômetro de massas foi operado no modo de ionização positiva (ESI+) com monitoramento de reação selecionado (SRM). Para fins quantitativos, três transições SRM diferentes foram monitoradas para cada composto. Transições SRM e parâmetros MS para detecção são mostrados na **Tabela 2.1**. A resolução no primeiro e no terceiro quadrupolo (Q1

e Q3) foi definida como unitária e o atraso entre as varreduras foi de 5 ms. Todos os dados foram coletados e processados no software Analyst® 1.5.2.

Tabela 2.1 - Lista de compostos com íons precursores e produtos, bem como os parâmetros para detecção de MS e tempo de retenção do método SRM.

Analito	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)*	Dwell time (ms)	DP	EP	CEP	CE	CXP	Tempo retenção (min)
CAF	195	138	30,0	51,0	4,50	14,0	31,0	4,00	5,04
		42					53,0	6,00	
		110					31,0	4,00	
CAF- ¹³ C ₃	198	140	30,0	51,0	8,00	14,0	27,0	4,00	
		43					59,0		
CBZ	237	194	60,0	46,0	6,50	14,0	21,0	4,00	6,51
		192					31,0		
		193					43,0		
CBZ-d ₁₀	247	204	60,0	46,0	6,00	16,0	23,0	4,00	
		202					39,0		
CIP	332	288	30,0	51,0	6,50	16,0	19,0	4,00	5,25
		314					19,0		
		245					23,0		
CIP-d ₈	340	296	30,0	46,0	7,50	26,0	19,0	4,00	
		235					51,0		
FLX	310	117	30,0	31,0	3,00	14,0	51,0	4,00	7,33
		148					11,0		
		91					83,0		
FLX-d ₆	316	44	30,0	26,0	6,00	16,0	33,0	4,00	
		154					13,0		
NOR	320	276	30,0	51,0	5,00	12,0	19,0	6,00	5,21
		233					25,0	4,00	
		302					17,0	4,00	
NOR-d ₅	325	307	30,0	51,0	7,00	24,0	21,0	4,00	
		281					17,0		
VEN	278	58	30,0	31,0	5,50	16,0	35,0	4,00	5,50
		260					13,0		
		121					37,0		
VEN-d ₆	284	64	30,0	46,0	8,50	18,0	39,0	4,00	
		266					13,0		

*As transições em negrito foram escolhidas para fins de quantificação (Q).

Fonte: autoria própria.

2.3.2.2 Cromatografia líquida

A separação por cromatografia líquida foi realizada utilizando um cromatógrafo Agilent® 1200 LC Series (Santa Clara, CA, EUA), equipado com uma bomba quaternária (bomba 1), amostrador automático ALS 1200 com capacidade de injeção de 0,1 a 100 µL,

compartimento de coluna termostatizado (TCC) 1200. Uma bomba adicional, modelo Pro-Star 230 Solvent Delivery Module (bomba 2) da Varian® foi usada para carregamento da amostra no sistema.

Os sistemas foram conectados utilizando uma válvula de duas posições e seis portas da Rheodyne® (Rohnert Park, CA, EUA) para alternar automaticamente do carregamento (posição 1) para a eluição (posição 2) no modo backflush, conforme demonstrado na **Figura 1.4** do capítulo 1.

Um cartucho SPE (2,1 × 20 mm, 25 µm) contendo sorvente Oasis HLB foi adquirido da Waters Corporation® (Milford, MA, EUA) e utilizado na etapa de preparo de amostra on-line. A coluna analítica utilizada para separação dos analitos foi Phenomenex Kinetex® C18 100 Å (50 × 2,1 mm, 5 µm). Ambas foram mantidas a 20 °C no TCC e aplicadas na pré-concentração e separação cromatográfica dos analitos alvo. O volume de injeção adotado foi de 50 µL.

Os eluentes da bomba 1 foram água ultrapura com 0,1 % ácido fórmico (A), acetonitrila com 0,1 % ácido fórmico (B) e acetonitrila com 5 % ácido fórmico (C) a uma vazão de 0,6 mL min⁻¹. Uma eluição no modo gradiente foi empregada de acordo com a **Tabela 2.2**.

Tabela 2.2 - Programação de eluição gradiente utilizada na bomba 1.

Tempo (min)	A (%)	B (%)	C (%)
0,00-3,00	95,0	0,00	5,00
3,00-3,10	90,0	0,00	10,0
3,10-5,50	75,0	0,00	25,0
5,50-5,55	60,0	0,00	40,0
5,55-7,00	40,0	0,00	60,0
7,00-7,50	0,00	0,00	100
7,50-11,0	0,00	0,00	100
11,0-11,1	0,00	100	0,00
11,1-16,0	0,00	100	0,00
16,1-20,0	0,00	0,00	100
20,1-24,0	95,0	0,00	5,00

Fonte: autoria própria.

A fase móvel utilizada na bomba 2 foi água ultrapura (A) e metanol com 15 % de ácido fórmico (B) em uma vazão de 1 mL min⁻¹. O gradiente pode ser visualizado na **Tabela 2.3**.

Tabela 2.3 - Programação de eluição gradiente utilizada na bomba 2.

Tempo (min)	A (%)	B (%)
0,00-4,95	100	0,00
5,00-10,0	0,00	100
10,1-24,0	100	0,00

Fonte: autoria própria.

A separação cromatográfica foi avaliada com base na assimetria (As), que descreve a forma do pico cromatográfico a 10 % da altura, e resolução (Rs), uma medida de separação de dois picos de tempos de retenção diferentes, calculada de acordo com a **Equação 2.1** sugerida por Haddad (2009)⁵¹ e da Silva et al. (2016)⁵².

Equação 2.1:

$$Rs = 2 \left(\frac{\text{Tempo retenção 1} - \text{Tempo retenção 2}}{W(50\%)_1 + W(50\%)_2} \right)$$

Legenda: w (50%) = largura a 50 % da altura do pico.

A coluna de pré-concentração foi carregada utilizando 100 % de eluente A da bomba 2 por 3 minutos. A válvula de seis portas foi comutada para a posição 2 (eluição) enquanto a bomba 1 empregava o gradiente conforme **Tabela 2.2**. Aos 12 minutos, a válvula de comutação da coluna voltou à posição 1 (carregamento). A composição do eluente foi mantida a 100 % de (C) por 3,9 minutos antes de retornar às condições iniciais, que foram mantidas durante 3,9 minutos para equilíbrio. A válvula do espectrômetro de massa foi mantida até 2,9 min direcionada ao descarte. De 3 a 13 minutos, o fluxo do sistema foi direcionado para o espectrômetro de massas. A válvula desviadora retornou ao descarte em 13,1 min.

Durante a análise cromatográfica, a composição de gradiente na bomba 2 foi programada para lavar e limpar as linhas de forma a evitar contaminação cruzada e efeito memória (carryover) no sistema. Após o processamento de cada conjunto de análise, o sistema foi lavado com eluentes da fase móvel e com uma injeção de acetonitrila.

2.3.3 Validação do método

O espectrômetro de massas foi operado no modo SRM e três transições foram monitoradas para cada composto. A transição com o sinal mais intenso foi utilizada para quantificação (Q) e as transições adicionais foram usadas para confirmação (q). O tempo de retenção foi monitorado e comparado com os padrões isotopicamente marcados para confirmação adicional.

Para validação do método, foram avaliados o limite de detecção (LD), o limite de quantificação (LQ), a linearidade, a precisão inter-dia e intra-dia. O método de diluição isotópica foi utilizado para quantificação, e os padrões isotopicamente marcados foram comparados com cada analito individual.

A resposta de linearidade do método foi avaliada usando curvas analíticas preparadas em água ultrapura, para posterior quantificação dos analitos nas amostras, e em esgoto lab-made. No entanto, em vista de estar se utilizando padrões isotopicamente marcados individuais e específicos de cada composto, foi possível realizar a quantificação dos analitos nas amostras utilizando os dados de validação obtidos na água ultrapura, conforme já descrito e avaliado por Gros et al. (2008) ³⁴.

Utilizando água ultrapura no preparo, o intervalo de linearidade para CAF foi avaliado usando cinco pontos com concentrações entre 0,500 a 40,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (curva 1) e seis pontos com concentrações entre 70,0 a 750 $\mu\text{g L}^{-1}$ (curva 2). Para CBZ, cinco pontos com concentrações entre 0,00100 a 5,00 $\mu\text{g L}^{-1}$, CIP e NOR também com cinco pontos de concentração, ambas variando entre 3,00 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. FLX com cinco pontos em intervalo linear de 0,0100 a 5,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ e cinco pontos de 0,100 a 1,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ para VEN.

Já para o esgoto lab-made, o intervalo de linearidade para CAF foi avaliado usando cinco pontos com concentrações entre 0,500 a 40,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (curva 1) e cinco pontos com concentrações entre 100 a 750 $\mu\text{g L}^{-1}$ (curva 2). Para CBZ, cinco pontos com concentrações entre 0,0100 a 5,00 $\mu\text{g L}^{-1}$, CIP com cinco pontos de concentração variando de 3,00 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ e NOR com seis pontos de concentração variando entre 5,00 a 300 $\mu\text{g L}^{-1}$. FLX com seis pontos em intervalo linear de 0,0100 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ e cinco pontos de 0,0100 a 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para VEN.

O modelo linear foi obtido por meio de regressão linear de mínimos quadrados ponderados (WLSLR). As ponderações de $1/x$, $1/x^2$, $1/x^{0.5}$ e $1/y$, $1/y^2$, $1/y^{0.5}$ foram avaliadas para determinar o melhor modelo matemático considerando a falta de ajuste, avaliada por análise de variância (ANOVA).

A precisão intra-dia foi avaliada e expressa como uma média do desvio padrão relativo (% RSD) para todos os níveis de concentração de cada composto no mesmo dia em triplicata ($n = 3$), enquanto a precisão inter-dia foi medida como uma média do desvio padrão relativo (% RSD) de três níveis de concentração (baixo, médio e alto) em um dia diferente em triplicata ($n = 3$).

LD e LQ foram estimados experimentalmente como a concentração resultante na relação sinal/ruído (S/N) de 3 e 10, respectivamente. Além disso, para o LQ, um desvio padrão relativo inferior a 20% foi adotado como critério para estabelecimento do primeiro ponto da curva analítica.

O efeito da matriz (EM) da amostra pode variar significativamente entre os compostos. Para determinar o efeito da matriz, usamos a seguinte equação sugerida por Gómez-Ramos et al. (2016) ⁵³:

Equação 2.2:

$$EM (\%) = \left(\left(\frac{\text{Área}_{matriz}}{\text{Área}_{solvente}} \right) - 1 \right) \times 100$$

O efeito da matriz para cada composto foi então calculado como a razão entre as áreas de pico na matriz fortificada com os analitos, isto é, no esgoto produzido em laboratório, e na água ultrapura fortificada. A composição do esgoto produzido em laboratório foi amido (149 mg L⁻¹), bicarbonato de sódio (NaHCO₃ 370 mg L⁻¹), celulose (47,0 mg L⁻¹), alquil benzeno linear sulfonato de sódio linear (surfactante LAS 1,00 mg L⁻¹), extrato de carne (262 mg L⁻¹), óleo de soja (79,0 mg L⁻¹), sacarose (98,0 mg L⁻¹) e solução salina (NaCl, MgCl₂, CaCl₂ 1,00 mg L⁻¹) ^{19, 54}, resultando em uma matriz de pH=8,0 e demanda química de oxigênio (DQO) 550 mg O₂ L⁻¹.

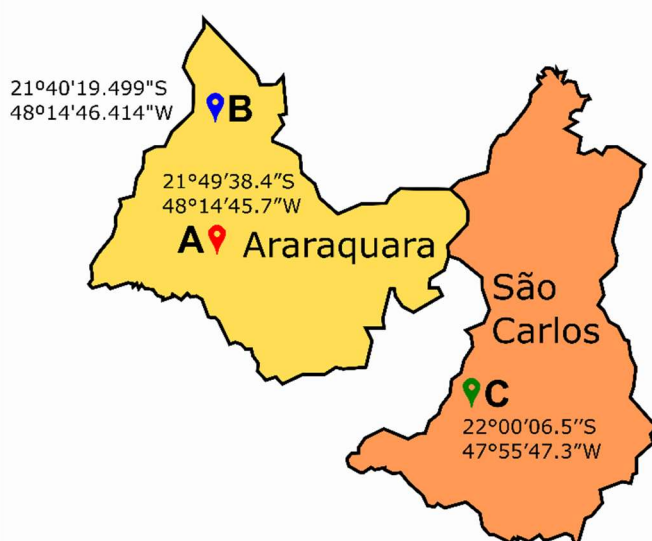
O efeito memória foi avaliado injetando três vezes uma solução padrão a 150 ng mL⁻¹ seguida por três injeções consecutivas de acetonitrila (sem os compostos alvo), caso o sinal obtido em acetonitrila excedesse 20 % do LQ ⁵⁵⁻⁵⁸, teríamos a confirmação da presença de efeito memória.

O método foi validado de acordo com diretrizes nacionais ^{59,60} e internacionais ⁶¹⁻⁶³ de validação, estando, em suma, baseado nos aspectos estabelecidos, nacionalmente, pela ANVISA e, internacionalmente, pela EPA.

2.3.4 Coleta e preparo de amostra

Amostras de afluente e efluente de uma ETE localizada em Araraquara (SP, Brasil - 21°49'38,4"S 48°14'45,7"W) foram coletadas de setembro a janeiro. O segundo ponto de coleta de amostras foi uma ETE localizada em Bueno de Andrada (SP, Brasil - 21°40'19.499"S 48°14'46.414"W) e amostras de afluente e efluente foram coletadas de outubro a fevereiro. Também foi cedida amostra de esgoto doméstico coletada na região de São Carlos no mês de setembro. A localização dos pontos de amostragem pode ser visualizada na **Figura 2.1**.

Figura 2.1 - Pontos de amostragem de Araraquara-SP (A), Bueno de Andrada-SP (B) e São Carlos-SP (C).



Fonte: autoria própria.

Além dos pontos acima descritos, amostra de efluente hospitalar proveniente do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (HCRP – SP, Brasil - 21°9'44.51"S 47°51'8.626"W) foi cedida para determinação dos compostos alvo.

A ETE de Araraquara é responsável por atender mais de 224.000 habitantes. Recebe um volume diário de águas residuárias em torno de 56.000 m³ e o processo de tratamento é baseado em tanque de aeração seguido por tanque de sedimentação. A descarga de efluentes ocorre no córrego Ribeirão das Cruzes, responsável pelo abastecimento de água da cidade de Araraquara e com foz no rio Jacaré-Guaçu. A segunda ETE em Bueno de Andrada atende cerca de 480 habitantes e o processo de tratamento é baseado em lodo ativado com aeração prolongada e fluxo intermitente. Recebe um volume de esgoto diário de cerca de 40-45 m³ cujo efluente é descarregado no córrego Itaquerê.

Cerca de 500 mL das amostras foram coletadas em frascos de polipropileno durante cinco meses nas duas ETEs e armazenadas a -20 °C. O pH das amostras foi medido em um pHmetro PG 1800 da Gehaka® (São Paulo, SP, BRA) e a condutividade em SevenEasy Conductivity da Mettler Toledo® (Schwerzenbach, CHE).

As amostras foram submetidas a um simples pré-tratamento baseado em uma filtração em membrana de nylon de 0,45 µm. Uma segunda filtração em membrana de nylon de 0,22 µm foi realizada quando observado a persistência de material em suspensão. A filtração foi evitada no caso de amostra limpa, a fim de reduzir o manuseio da mesma, considerando que o risco de entupimento é mínimo. Quando a filtração se fez necessária, não foram observadas perdas dos compostos. Antes da análise, as amostras foram divididas em triplicatas; os padrões internos deuterados foram adicionados na concentração de 40 ng mL⁻¹. Finalmente, as amostras foram analisadas usando o sistema on-line SPE-LC-MS/MS e quantificadas por diluição isotópica.

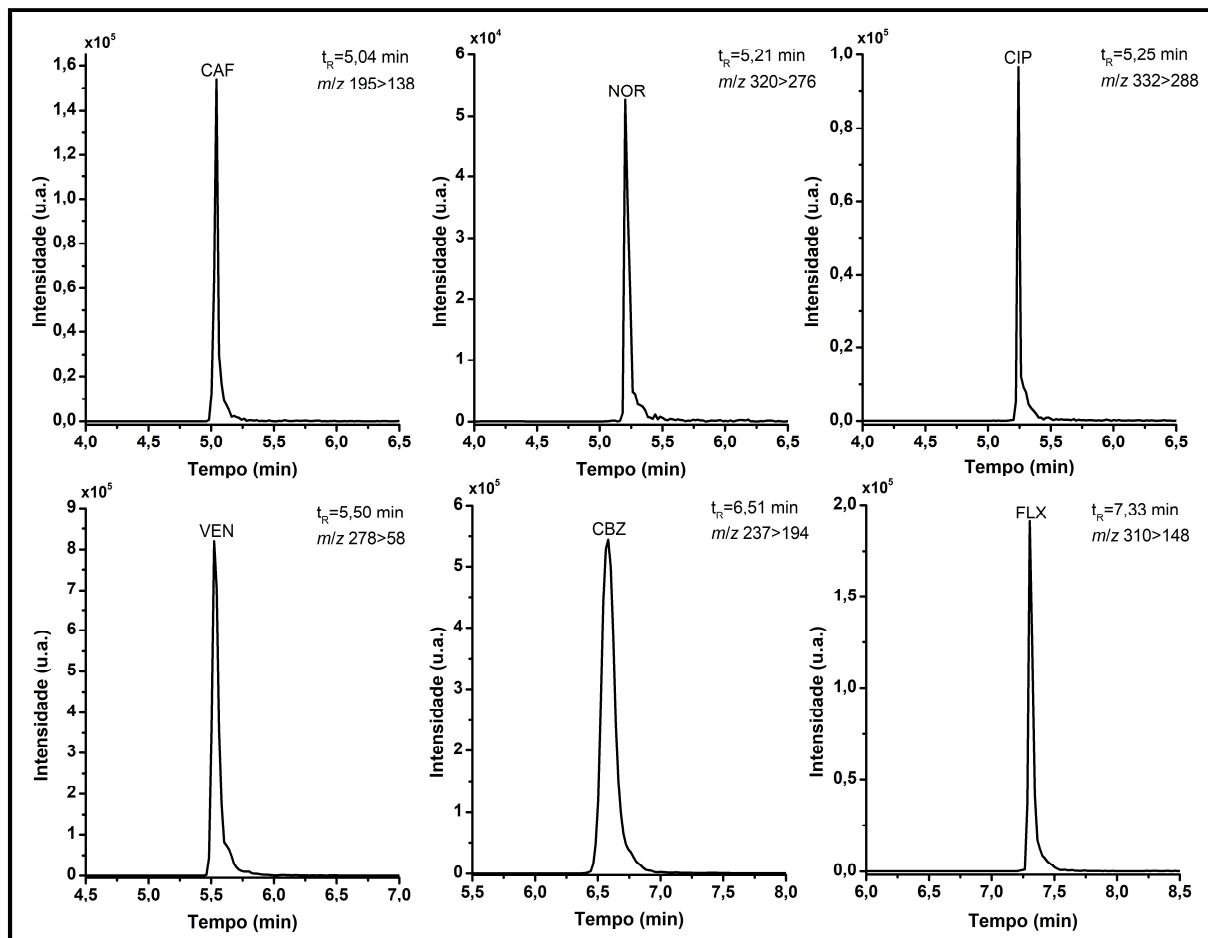
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 On-line SPE-LC-MS/MS

A otimização do método foi realizada pela injeção de soluções padrão individuais de cada analito no sistema LC-MS/MS. Os compostos foram analisados no modo positivo e o íon [M+H]⁺ foi usado como íon precursor para todos eles. Todos os compostos estudados apresentaram pelo menos dois íons produto, e pelo menos duas transições foram selecionadas, sendo a com intensidade mais alta usada para fins de quantificação (Q), e as demais para fins qualitativos (q), conforme descrito previamente.

Para o método SRM, o tempo de ciclo foi de 1,2 segundos, com 1199 varreduras no período, fornecendo *dwell time* variando de 30 a 60 ms, dependendo do número de transições de SRM monitoradas. Cerca de 10 pontos de dados por pico foram alcançados para todos os compostos, sendo suficientes para fins de quantificação e permitindo a determinação simultânea dos compostos selecionados, como mostrado na **Figura 2.2**.

Figura 2.2 - Cromatograma de íons extraídos (XIC) de solução padrão 150 µg L-1: CAF (195>138), NOR (320>276), CIP (332>288), VEN (278>58), CBZ (237>194), and FLX (310>148) com os respectivos tempos de retenção dos analitos.



Fonte: autoria própria.

As condições cromatográficas também foram otimizadas para obter uma eluição adequada dos compostos alvo em um curto tempo de análise, seguindo as condições descritas anteriormente. Em relação à vazão selecionada, de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$, esta mostrou ser adequada para eluir os compostos alvo com pressão controlada, sem danificar o sistema ou prejudicar o perfil cromatográfico.

Em seguida, foi avaliada a fase móvel utilizada para carregar a amostra. Água ultrapura (eluyente A - bomba 2) sem aditivo a uma vazão de 1 mL min^{-1} forneceu resultados adequados sem alta pressão de retorno. Os analitos retidos no cartucho foram eluídos para a coluna cromatográfica de acordo com a **Tabela 2.2**. Além disso, após a eluição dos compostos na coluna cromatográfica, foi adicionado um passo de lavagem do cartucho e, em seguida, o cartucho foi condicionado com o eluyente A até o final da corrida cromatográfica.

Ácido fórmico 0,1 % foi escolhido como aditivo de eluyente, uma vez que concentrações mais altas não aumentaram a resposta do sinal. Um volume de injeção de 50 µL com um tempo

de carregamento de 3 min foi escolhido sem afetar a separação cromatográfica ou as formas dos picos.

Em relação a estes aspectos, a assimetria para o composto mais polar (CAF) e mais apolar (FLX) foi de 1,13 e 1,84, respectivamente, mostrando que, para o método desenvolvido, o pico da CAF está no critério de faixa aplicado à assimetria, ou seja, $0,8 < A_s < 1,5$, mostrando ser simétrico ⁶⁴. Em relação ao pico FLX, o respectivo resultado indicou um ligeiro fronting.

Para isso, foi calculado o fator de encaudamento (Tf), que descreve a forma do pico cromatográfico a 5 % da altura, segundo **Equação 2.3**, na qual A é a distância da borda dianteira da linha central do pico (perpendicular do ponto mais alto do pico) e B é a distância da linha central do pico à borda traseira de o pico, com todas as medidas em 5 % da altura do pico.

Equação 2.3

$$T_f = \frac{(A+B)}{2A}$$

O resultado $T_f = 1,77$ indica que o pico encontra-se nos critérios aceitáveis para o fator de encaudamento, ou seja, T_f sendo ≤ 2 de acordo com as diretrizes aplicadas em métodos cromatográficos ⁶⁵⁻⁶⁷, não prejudicando o confiabilidade dos resultados da análise. É importante notar que, apesar da semelhança entre os fatores (assimetria e encaudamento), esses valores não podem ser convertidos diretamente.

A resolução, calculada para os pares CAF-NOR e NOR-CIP para avaliar o desempenho da coluna, mostrou $R_s > 1,5$ ($R_s = 4,85$) para o primeiro par (CAF-NOR), ou seja, a separação foi eficiente para os dois primeiros alvos compostos com alta resolução. Para o segundo par (NOR-CIP), $R_s < 1,5$ ($R_s = 1,0$), não tendo uma resolução adequada. O motivo é a similaridade estrutural desses compostos, uma vez que pertencem ao mesmo grupo farmacológico (fluoroquinolonas) com fórmulas estruturais semelhantes, diferindo em apenas um grupo (CH_2).

Neste estudo, não foi observado efeito memória para os compostos alvo, uma vez que o perfil do gradiente, de ambas as bombas utilizadas (quaternária e auxiliar), foi estudado e definido para evitar esse efeito, mesmo que prolongasse o tempo de execução do método. Os solventes C (bomba quaternária) e B (bomba externa) auxiliaram na limpeza do cartucho e do sistema, evitando que o efeito memória estivesse presente e prejudicasse as análises.

A adição dessa etapa permitiu que o cartucho pudesse ser utilizado para a extração de várias amostras sem perda significativa de sinal e sem necessidade de substituição do cartucho

de SPE, ou seja, todas as etapas de validação do método e análise das amostras foram processadas no mesmo cartucho, resultando em um número estimado de injeções maiores que 200. O tempo total de análise foi de 24 minutos, incluindo o preparo da amostra e a separação cromatográfica. Nesse período, o cartucho e a coluna foram lavados, seguidos por etapas de reequilíbrio que permitiram obter um método rápido e simples para a determinação simultânea dos compostos alvo do estudo.

2.4.2 Validação do método

ANOVA foi aplicada para avaliar linearidade e falta de ajuste, CAF (curva 2), CIP e FLX apresentaram falta de ajuste nas curvas em água ultrapura. Em seguida, a regressão linear com ponderação de $1/x^2$, $1/x^{0,5}$ e $1/y^2$ foi adotada para CAF (curva 2), CIP e FLX, respectivamente. Não foram necessárias calibrações ponderadas para CAF (curva 1), CBZ, NOR e VEN. No esgoto lab-made CBZ, NOR e CIP apresentaram falta de ajuste. Em seguida, a regressão linear com ponderação de $1/x$, $1/y^2$ e $1/y^{0,5}$ foi adotada para CBZ, NOR e CIP, respectivamente. Não foram necessárias calibrações ponderadas para CAF (curva 1 e 2), FLX e VEN. Os fatores de ponderação para água ultrapura e esgoto lab-made foram selecionados com base no menor resultado da soma do erro residual relativo.

Os resultados de precisão intra-dia e inter-dia, expressos em % RSD, são compatíveis com as diretrizes nacionais ^{59,60} e internacionais ⁶¹⁻⁶³ de validação para ambas as matrizes avaliadas.

Concentrando a discussão apenas aos resultados obtidos utilizando água ultrapura, visto que estes serão os dados que guiarão a quantificação dos compostos nas amostras em virtude do uso de padrões isotopicamente marcados que possibilitam tal abordagem, os valores de precisão intra e inter-dia foram inferiores a 10 e 17%, respectivamente, o que é aceitável para amostras complexas ^{68,69}. Por exemplo, em baixas concentrações, ou seja, no primeiro ponto da curva analítica, o RSD foi menor que 10 % para quatro compostos (NOR, VEN, FLX e CAF - curva 1 e 2) e abaixo de 20 % para dois compostos (CBZ e CIP) indicando adequada precisão do método.

O LD e o LQ foram obtidos com uma relação S/N de 3 e 10, respectivamente, e com um RSD abaixo de 20%. O LD variou de $1 \times 10^{-6} \mu\text{g L}^{-1}$ a $1 \mu\text{g L}^{-1}$ e LQ de $0,001 \mu\text{g L}^{-1}$ a $3 \mu\text{g L}^{-1}$. Esses valores estão próximos, como estudos anteriores aplicando SPE on-line na etapa de preparo da amostra ^{10,11,14,19,20,23,27,68,70-73}.

As **Tabelas 2.4 e 2.5** reúnem, em detalhes, os valores obtidos de LD, LQ, precisão intra e inter-dia, como também a faixa linear, as equações das curvas analíticas e a calibração ponderada utilizada quando necessário.

Tabela 2.4 - Valores de linearidade, precisão intra-dia e inter-dia e pesos empíricos obtidos na validação do método em água ultrapura.

Analito	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Equação da curva analítica*	Pesos empíricos**	Precisão inter-dia (% RSD)***	Precisão intra-dia (% RSD)	Padrão interno
CAF	0,00100	0,500	Curva 1: 0,500-40,0	$a = 8,22 \times 10^{-1}$ $b = 1,41 \times 10^{-2}$ $r^2 = 0,997$	NA	7,72	4,49 (n=5)	CAF- $^{13}\text{C}_3$
			Curva 2: 70,0-750	$a = 1,01$ $b = -3,06 \times 10^{-1}$ $r^2 = 0,998$	$1/y^2$	7,36	3,27 (n=6)	
CBZ	1×10^{-6}	0,00100	0,00100-5,00	$a = 2,13$ $b = 1,98 \times 10^{-2}$ $r^2 = 0,993$	NA	12,0	10,4 (n=5)	CBZ-D ₁₀
CIP	0,500	3,00	3,00-100	$a = 3,43$ $b = -1,19 \times 10^{-1}$ $r^2 = 0,999$	$1/x^{0.5}$	5,54	6,25 (n=5)	CIP-D ₈
FLX	0,001	0,0100	0,0100-5,00	$a = 4,53 \times 10^{-2}$ $b = 4,07 \times 10^{-4}$ $r^2 = 0,994$	$1/x^{0.5}$	10,9	9,14 (n=5)	FLX-D ₆
NOR	1,00	3,00	3,00-100	$a = 0,75$ $b = 3,37 \times 10^{-2}$ $r^2 = 0,999$	NA	17,6	5,82 (n=5)	NOR-D ₅
VEN	1×10^{-4}	0,100	0,100-10,0	$a = 1,76$ $b = 1,46 \times 10^{-2}$ $r^2 = 0,998$	NA	2,83	7,35 (n=5)	VEN-D ₆

*a: intercepto, b: inclinação, r^2 : coeficiente de determinação **NA: não aplicado

*** Concentrações utilizados para os cálculos de precisão inter-dia em $\mu\text{g L}^{-1}$: CAF (curva 1)= 0,500; 1,00; 10,0 / CAF (curva 2)= 70,0; 300; 750 / CBZ= 0,0100; 0,500; 5,00 / CIP= 10,0; 40,0; 100 / FLX= 0,500; 1,00; 5,00 / NOR= 3,00; 10,0; 100 / VEN= 0,100; 1,00; 10,0.

Fonte: autoria própria.

Tabela 2.5 - Valores de linearidade, precisão intra-dia e inter-dia e pesos empíricos obtidos na validação do método em esgoto lab-made.

Analito	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Equação da curva analítica*	Pesos empíricos**	Precisão inter-dia (% RSD)***	Precisão intra-dia (% RSD)	Padrão interno
CAF	0,0100	0,500	Curva 1: 0,500-40,0	$a = 1,074$ $b = -1,40 \times 10^{-3}$ $r^2 = 0,998$	NA	1,49	9,02 (n=5)	CAF- $^{13}\text{C}_3$
			Curva 2: 100-750	$a = 8,95 \times 10^{-1}$ $b = 4,28 \times 10^{-1}$ $r^2 = 0,998$	NA	4,41	2,83 (n=6)	
CBZ	0,00100	0,0100	0,0100-5,00	$a = 1,43$ $b = 4,88 \times 10^{-2}$ $r^2 = 0,989$	1/x	5,93	3,26 (n=5)	CBZ-D ₁₀
CIP	0,500	3,00	3,00-100	$a = 4,52$ $b = -2,94 \times 10^{-1}$ $r^2 = 0,999$	$1/y^{0,5}$	10,7	4,80 (n=5)	CIP-D ₈
FLX	1×10^{-4}	0,0100	0,0100-100	$a = 4,09 \times 10^{-2}$ $b = 4,00 \times 10^{-4}$ $r^2 = 0,999$	NA	4,67	8,77 (n=6)	FLX-D ₆
NOR	1,00	5,00	5,00-300	$a = 1,27$ $b = -1,05 \times 10^{-1}$ $r^2 = 0,994$	$1/y^2$	4,64	4,27 (n=6)	NOR-D ₅
VEN	1×10^{-4}	0,0100	0,100-10,0	$a = 1,579$ $b = 1,27 \times 10^{-2}$ $r^2 = 0,999$	NA	7,29	2,17 (n=5)	VEN-D ₆

*a: intercepto, b: inclinação, r^2 : coeficiente de determinação **NA: não aplicado

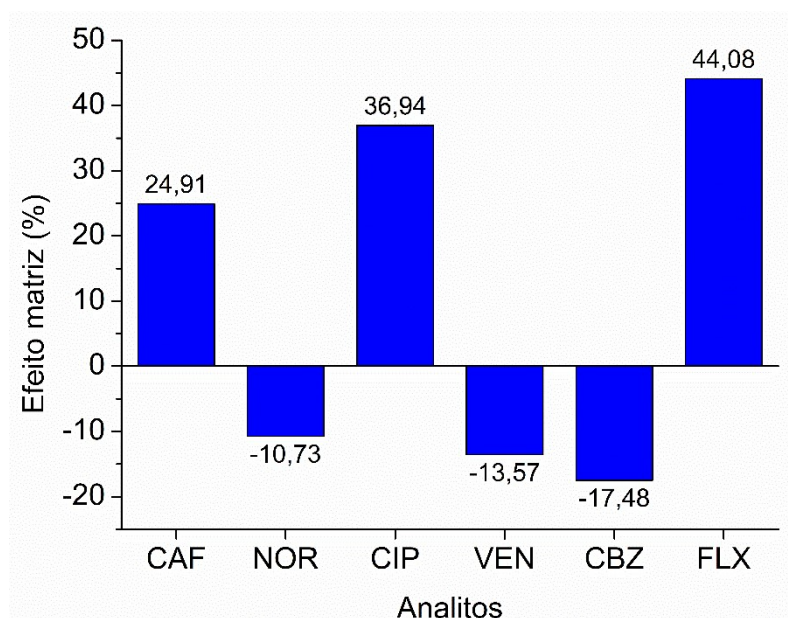
*** Concentrações utilizados para os cálculos de precisão inter-dia em $\mu\text{g L}^{-1}$: CAF (curva 1)= 1,00; 10,0; 40,0 / CAF (curva 2)= 100; 300; 750 / CBZ= 0,0100; 1,00; 5,00 / CIP= 5,00; 10,0; 100 / FLX= 0,0100; 1,00; 10,0 / NOR= 5,00; 40,0; 100 / VEN= 1,00; 5,00; 10,0.

Fonte: autoria própria.

O efeito da matriz (EM) pode causar aumento ou supressão do sinal. Para determinar o efeito na quantificação dos analitos, uma solução padrão de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ contendo todos os analitos foi preparada em solvente (água ultrapura) e nas amostras ambientais em branco. Nesse caso, como não podemos ter uma amostra de esgoto livre dos analitos alvo, uma matriz simulada (esgoto produzido em laboratório) foi preparada para avaliar o efeito da matriz.

O uso de padrão interno isotopicamente marcado para cada composto alvo foi necessário para quantificar com precisão esses compostos, minimizando o efeito da matriz. Essa limitação de LC-MS/MS não é exclusiva dos métodos de SPE on-line e foi descrita em detalhes também utilizando SPE off-line ⁷⁴. Os valores do efeito da matriz para cada composto são mostrados na **Figura 2.3**.

Figura 2.3 - Efeito matriz observado para cada composto alvo em amostras de esgoto lab-made.



Fonte: autoria própria.

De acordo com a diretriz SANTE (documento da Comissão Europeia-CE nº SANTE/11813/2017) ⁷⁵, o efeito da matriz na faixa de -20 % a +20 % é considerado insignificante. Como mostra pela figura acima, CAF, CIP e FLX apresentaram significativo efeito matriz. Efeito de supressão de sinal foi observado para NOR, VEN e CBZ, enquanto um efeito positivo de matriz (aumento de sinal) foi observado para CAF, CIP e FLX.

O efeito da matriz variou entre os compostos estudados, com NOR experimentando o menor efeito matricial (-10,73 %) e FLX o maior efeito matricial (+44,08 %). Embora os compostos com menor retenção pareçam experimentar um efeito matricial mais alto do que aqueles com maior retenção, ainda que tenha sido observado justamente o contrário no presente

experimento, sendo a NOR, composto pouco retido e menor EM e FLX, composto mais retido com maior EM, o grau de supressão/aumento depende das características individuais do composto como polaridade, taxa de ionização, afinidade com a fase móvel e/ou estacionária 10,76.

Amostras de controle de qualidade (QC), isto é, padrões de $150 \mu\text{g L}^{-1}$ foram preparados em água ultrapura utilizando o mesmo procedimento para a curva analítica e analisados regularmente antes e após cada conjunto de análise das amostras ambientais. Este procedimento foi adotado para garantir o desempenho e a confiabilidade do método. Além disso, após as amostras de QC, uma injeção de acetonitrila foi realizada para limpar o sistema antes de iniciar um novo conjunto de análise.

2.4.3 Aplicação em amostras de águas residuárias

2.4.3.1 Determinação de fármacos em amostras de ETes

Previamente a aplicação do método para quantificação dos compostos, realizaram-se análises de pH e condutividade das amostras. Os resultados das amostras coletadas podem ser visualizados na **Tabela 2.6**.

Tabela 2.6 - Valores de pH e condutividade obtidos das amostras analisadas.

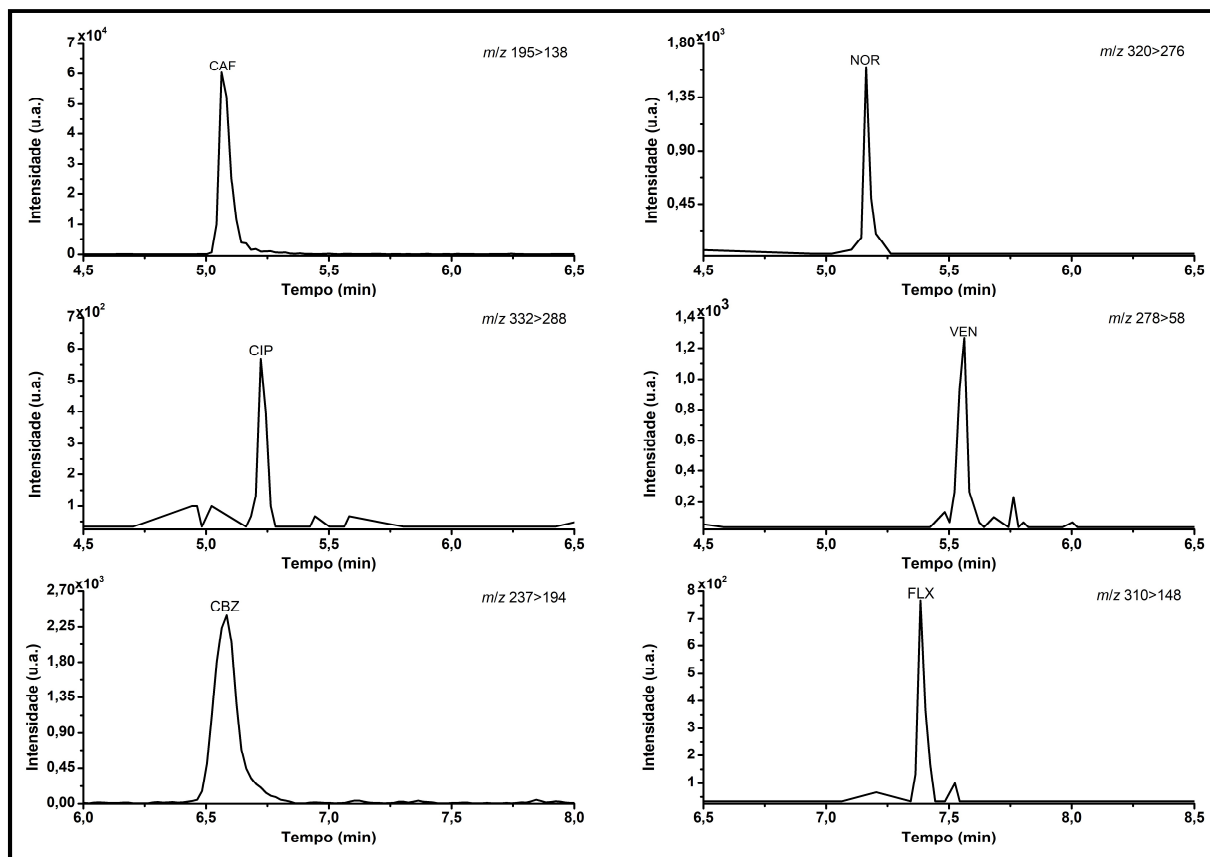
Análise	Araraquara		Bueno de Andrada		São Carlos	HCRP
	A	E	A	E		
Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	366-693	206-295	712-1004	472-856	474	1375
pH	8,2-8,4	7,8-8,5	7,6-8,9	7,6-8,6	8,6	8,0

Legenda: A = afluyente; E = efluente.

Fonte: autoria própria.

As amostras foram injetadas em triplicata e, antes do início do conjunto de análise, um controle de qualidade foi injetado três vezes. Entre as amostras de afluentes e efluentes, acetonitrila foi injetada para lavar o sistema e evitar a presença do efeito de memória. A **Figura 2.4** mostra um cromatograma de uma amostra de água residuária analisada pelo método SPE LC-MS/MS on-line.

Figura 2.4 - Cromatograma de íons extraídos (XIC) de amostra de água residuária: CAF (195>138), NOR (320>276), CIP (332>288), VEN (278>58), CBZ (237>194), and FLX (310>148).



Fonte: autoria própria.

Nas amostras ambientais analisadas, os sinais de todos os compostos detectados estavam bem acima do valor sinal/ruído exigido de 10 (LQ), exceto para FLX em três amostras (efluente da ETE A em setembro, afluente da mesma ETE em novembro e afluente da ETE B em novembro) com valores de 9,5 a 9,8. Os resultados obtidos são mostrados na **Tabela 2.7** e pode-se observar que todas as amostras continham pelo menos um dos compostos alvo. Além disso, existem algumas amostras que contêm mais de um composto, como o afluente e efluente coletado em setembro para a ETE A, que contêm todos os compostos alvo.

Tabela 2.7 - Concentrações de compostos farmacêuticos ($\mu\text{g L}^{-1}$) e relação sinal/ruído (S/N), entre parênteses, obtidas através da análise de afluente e efluente das ETEs A e B.

Ponto de amostragem: ETE A										
Analitos/Meses	Setembro		Outubro		Novembro		Dezembro		Janeiro	
	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E
CAF	697 (134,7)	37,4 (15,6)	419 (159,9)	72,7 (71,9)	409 (59,4)	78,4 (38,8)	247 (83,3)	70,1 (66,1)	155 (120)	9,74 (58,8)
NOR	7,28 (10,5)	5,57 (10)	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
CIP	8,41 (13,5)	6,73 (10,1)	<LQ	<LQ	3,80 (10)	3,64 (20,5)	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
VEN	0,92 (16)	0,57 (12,5)	0,20 (34,5)	0,11 (64,5)	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
CBZ	2,29 (18,5)	1,54 (11)	1,33 (68,5)	0,35 (40,5)	0,63 (28)	0,52 (22)	0,37 (55,8)	0,26 (41,8)	0,28 (51,5)	<LQ
FLX	8,51 (10,5)	6,83 (9,8)	2,20 (22,5)	1,99 (23,5)	0,60 (9,5)	0,43 (14,2)	1,88 (31,5)	1,56 (46,5)	<LQ	<LQ

Ponto de amostragem: ETE B										
Analitos/Meses	Outubro		Novembro		Dezembro		Janeiro		Fevereiro	
	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E
CAF	665 (211,3)	30,5 (79,5)	505 (153,1)	4,39 (15,8)	715 (123,8)	4,85 (22,5)	447 (176,9)	37,2 (12)	227 (167)	12,7 (17)
NOR	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
CIP	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
VEN	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
CBZ	0,24 (29,2)	0,07 (11,9)	0,32 (14,5)	0,19 (11,8)	0,52 (26,2)	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
FLX	1,61 (12,5)	1,56 (16,5)	0,38 (9,5)	<LQ	1,85 (31,5)	0,84 (22,5)	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ

Legenda: A = afluente; E = efluente.

Fonte: autoria própria.

Os demais resultados obtidos na análise do esgoto doméstico coletado em São Carlos e do efluente hospitalar do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto podem ser visualizados na **Tabela 2.8**.

Tabela 2.8 - Concentrações de compostos farmacêuticos ($\mu\text{g L}^{-1}$) obtidas através da análise de esgoto doméstico (São Carlos, SP, Brasil) e efluente hospitalar (HCRP, Ribeirão Preto, SP, Brasil).

Analitos	Ponto de coleta	
	São Carlos	HCRP
CAF	88,04	>LQ*
NOR	ND**	15,44
CIP	ND	41,13
VEN	0,17	2,36
CBZ	0,78	4,15
FLX	1,09	4,32

* >LQ: acima do limite superior de quantificação

** ND: analito não detectado nas amostras

Fonte: autoria própria.

CAF foi o composto mais amplamente detectado, sendo encontrado em todas as amostras em concentrações variando de 9,74 a 697 $\mu\text{g L}^{-1}$ na ETE A e de 4,39 a 715 $\mu\text{g L}^{-1}$ na ETE B. Em estudos anteriores, Ferreira (2005) determinou a CAF entre 134 a 147 ng L^{-1} na Bacia de Guanabara (Rio de Janeiro, Brasil) e 160 a 357 $\mu\text{g L}^{-1}$ na Bacia de Leopoldina (Rio de Janeiro, Brasil) ⁷⁷. O mesmo composto foi avaliado por Gonçalves et al. (2017), analisando amostras de água do rio Paquequer, e a concentração de CAF variou de 0,15 a 47,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ ⁷⁸. A maior concentração de CAF encontrada por Sposito et al. (2018) foi de 1040 ng L^{-1} nas águas dos rios brasileiros de Dourados e Brilhante ⁷⁹.

CBZ também foi detectada em 14 das 20 amostras, mas em 6 seis delas a concentração ficou abaixo do LQ. Para a ETE A, a concentração de CBZ variou de 0,26 a 2,29 $\mu\text{g L}^{-1}$ e de 0,07 a 0,52 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a ETE B. Esses valores são maiores que estudos anteriores que investigaram a concentração destes compostos ^{80,81}. Da mesma forma, FLX foi detectada em 13 das 20 amostras, com concentrações variando de 8,51 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 0,43 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a ETE A, e de 1,85 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 0,38 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a ETE B.

Biel-Maeso et al. (2018) avaliaram a ocorrência e distribuição de 78 compostos farmacêuticos em uma ETE em Jerez de la Frontera, cuja água tratada foi despejada no Golfo

de Cádiz, na Espanha ⁸². Para amostras de afluente, os valores de concentração encontrados foram 82844 ng L⁻¹, 338 ng L⁻¹ e 2831 ng L⁻¹ para CAF, CBZ e CIP, respectivamente. Nas amostras de efluente, os maiores valores de concentração encontrados para os mesmos produtos farmacêuticos foram 186 ng L⁻¹ para CAF, 329 ng L⁻¹ para CBZ e 564 ng L⁻¹ para CIP. Neste estudo, para os mesmos compostos, as maiores concentrações das amostras de afluente na ETE A foram 697 µg L⁻¹ para CAF, 8,41 µg L⁻¹ para CIP e 2,29 µg L⁻¹ para CBZ, enquanto para as amostras de efluentes os valores foram 78,4 µg L⁻¹ para CAF, 6,73 µg L⁻¹ para CIP e 1,54 µg L⁻¹ para CBZ. Na ETE B, a concentração de CIP estava abaixo do limite de quantificação, enquanto para CAF, a concentração mais alta foi de 715 µg L⁻¹ na amostra afluente e 37,2 µg L⁻¹ no efluente. A maior concentração de CBZ foi de 0,52 µg L⁻¹ para amostra afluente e 0,07 para efluente, mostrando que os valores encontrados estão próximos dos estudos anteriores. A **Tabela 2.9** mostra os resultados obtidos por outros estudos para os compostos alvo.

Tabela 2.9 - Ocorrência dos compostos alvo em amostras de águas residuárias.

Analito	Matriz	Localização	Concentração (µg L ⁻¹)	Referência	Presente estudo (µg L ⁻¹) *	
					A	E
CAF	Água de rio	Brazil	130	Campanha et al. (2015) ⁸³	449	35,8
NOR	Água de rio	Iran	6,80	Chen et al. (2018) ⁸⁴	7,28	5,57
CIP	Afluente	Spain	0,613	Gros et al. (2013) ⁶⁹	6,11	5,19
VEN	Efluente	Portugal	0,166	Paíga et al. (2016) ⁸⁵	0,560	0,340
CBZ	Efluente	Portugal	0,128	Paíga et al. (2016) ⁸⁵	0,748	0,488
FLX	Efluente	Portugal	0,0164	Paíga et al. (2016) ⁸⁵	2,43	2,20

*Os valores de concentração expressos são uma média de todas as amostras descritas na **Tabela 2.7**.

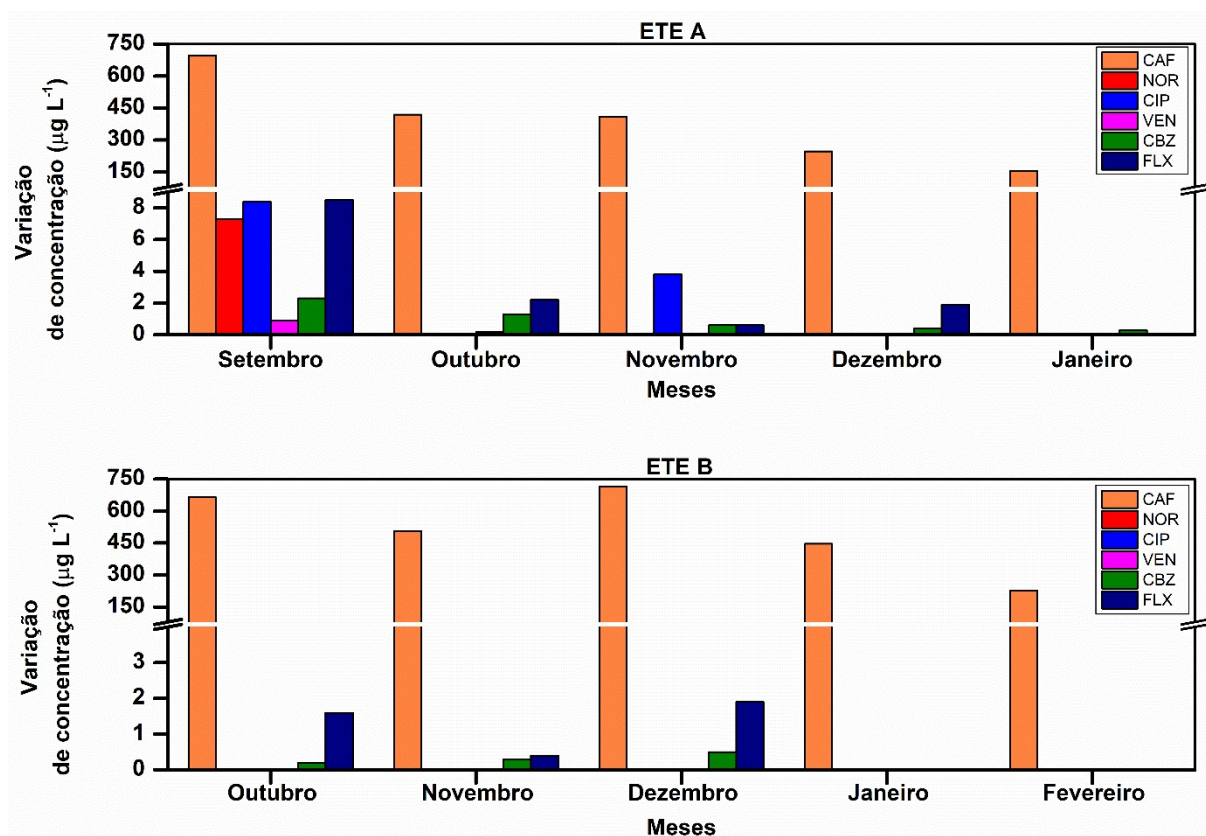
Fonte: autoria própria.

VEN foi detectada em 4 amostras, enquanto NOR foi detectada apenas em uma amostra. Os mesmos compostos farmacêuticos e CIP não foram detectados em nenhuma das amostras da ETE B.

2.4.3.2 Variação dos compostos alvo em diferentes meses

De acordo com a época da coleta, foi observada uma variação na concentração dos compostos alvo, fato esse marcado pelo fim da estação seca e início da estação chuvosa. A **Figura 2.5** ilustra a variação de concentração das amostras coletadas durante as estações primavera-verão.

Figura 2.5 - Variação da concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$) por mês dos fármacos analisados nas amostras de afluente das ETEs A e B.



Fonte: autoria própria.

As maiores concentrações foram determinadas no início de setembro, transição do período de seca para o chuvoso (em torno de 100-150 mm de chuva). Isso é responsável por aumentar a concentração dos analitos e diminuir as taxas de degradação. Böger et al. (2018)⁸⁶ analisaram CBZ em uma estação seca (inverno) e observaram o mesmo comportamento.

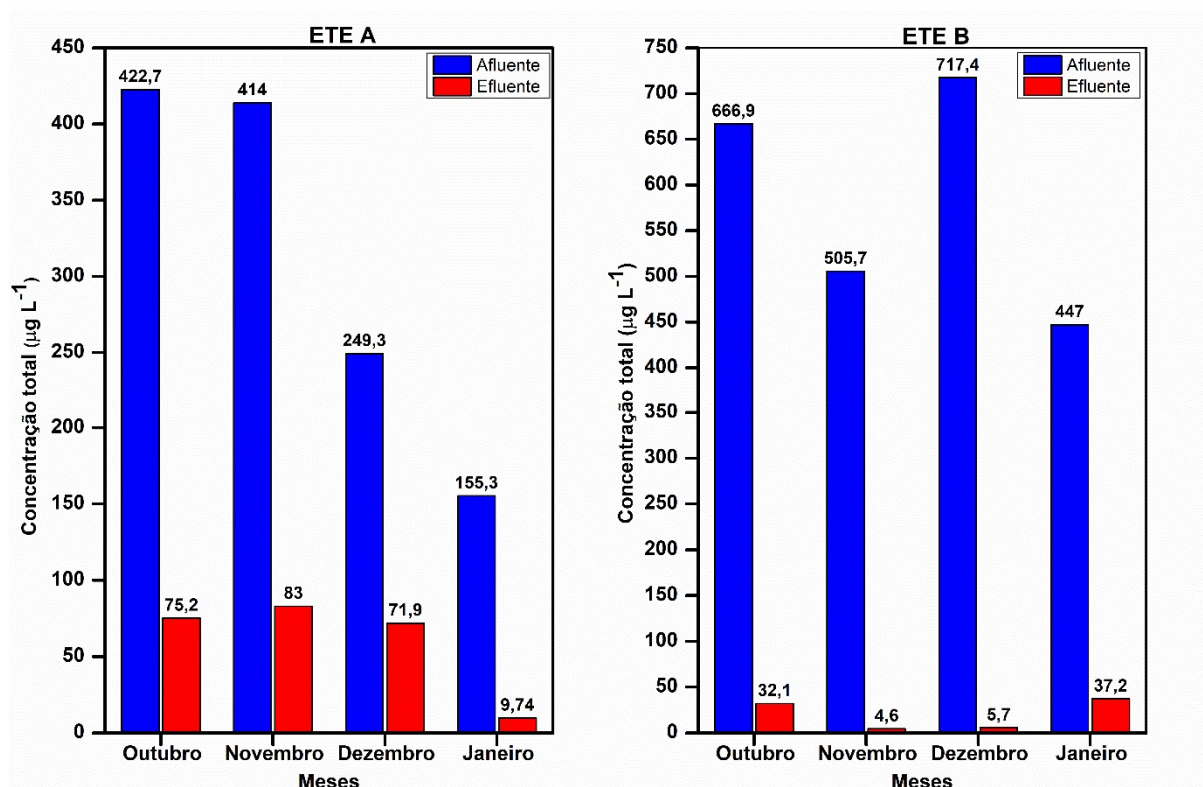
A diminuição da concentração do analito foi observada no verão, devido ao período chuvoso (cerca de 150-200 mm de chuva). Podemos notar a diluição da amostra devido ao maior volume de chuva, e mesmo assim o método mostrou ser capaz de determinar os compostos nessas condições.

O método desenvolvido com o procedimento automatizado de preparo de amostras usando column switching e o acoplamento ao sistema LC-MS/MS permitiu um grande progresso na análise de amostras aquosas ambientais, especialmente para contaminantes emergentes, provando ser preciso, com reduzido tempo de análise, menor consumo de solvente, geração mínima de resíduo químico e, principalmente, sem perda de resposta analítica.

Outro ponto importante a se destacar sobre o método desenvolvido são as futuras contribuições na determinação de contaminantes emergentes em águas residuárias devido à falta de conhecimento e poucos dados sobre a ocorrência de compostos psicoativos, antibióticos e marcadores de atividade antropogênica em países em desenvolvimento. Principalmente nesses países, como o Brasil, as condições de saneamento ainda são precárias, seja na falta de ETEs, os esgotos e os efluentes hospitalares são descartados sem nenhum tratamento nas águas superficiais em muitas cidades do país. Poucos são os artigos publicados recentemente sobre este tema, aos quais podemos citar os estudos de Chaves et al. (2020) ⁸⁷, de Almeida et al. (2015) ⁸⁸ e Pivetta et al. (2020) ⁸⁹.

Além da precariedade do serviço e do acesso dificultado de grande parte da população ao saneamento básico, tem-se o fato de que as atuais estações de tratamento de esgoto não foram projetadas e não estão preparadas para completa remoção de contaminantes a níveis de concentração da ordem de ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$. A **Figura 2.6** ilustra e corrobora com a afirmação, reunindo obtidos sob a forma de concentração total dos fármacos de interesse, nos meses de outubro a janeiro (cujas amostras de afluente e efluente das ETEs A e B foram, simultaneamente, coletadas) e demonstrando a persistência dos fármacos nas matrizes analisadas após o tratamento.

Figura 2.6 - Gráfico comparativo de concentração total dos analitos alvo do estudo, em $\mu\text{g L}^{-1}$, nos meses de outubro a janeiro, para as amostras de afluente e efluente das ETEs A e B.



Fonte: autoria própria.

Uma busca realizada na base de dados Scopus® com as palavras "determination of fluoxetine in wastewater" e limitada apenas aos trabalhos relacionados ao Brasil mostrou apenas um trabalho que contemplou o critério estabelecido. O mesmo foi feito para CBZ e VEN, e o número de estudos encontrados foram de quatro para a CBZ e nenhum para a VEN.

Esses dados, quando comparados a países desenvolvidos, Canadá por exemplo, notamos a grande diferença com que o tema é tratado, já que para FLX, CBZ e VEN, foram encontrados oito, dez e três trabalhos, respectivamente, mostrando a importância de realizar estudos como esse no Brasil e em outros países em desenvolvimento.

2.5 CONCLUSÃO

Neste estudo, um método automatizado de SPE-LC-MS/MS on-line foi desenvolvido e mostrou-se simples e sensível para determinar compostos farmacêuticos em amostras de águas residuárias ambientais em níveis de concentração de ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$. Parâmetros de validação como linearidade, precisão intra-dia e inter-dia, LD, LQ foram avaliados e mostraram concordância com os padrões exigidos nacional e internacionalmente, bem como uma correção do efeito da matriz usando os padrões deuterados.

Comparado ao procedimento SPE off-line, o on-line requer mínima manipulação da amostra, baixo volume de amostra, menor consumo de solvente e tempo de análise reduzido. O tempo total de execução foi de 24 minutos, incluindo preparo de amostra e separação cromatográfica, atingindo alto rendimento. Outra vantagem apresentada pelo método está na calibração por diluição isotópica, uma estratégia que apresenta como vantagem a precisão de resultado, visto que os compostos marcados isotopicamente apresentam propriedades físico-químicas semelhantes aos compostos alvo, logo, qualquer efeito sofrido pelo analito também será refletido no isótopo, além de não haver necessidade de isolamento do composto alvo para análise.

O método desenvolvido foi aplicado em amostras de águas residuárias e todos os compostos farmacêuticos foram detectados pelo menos em uma das amostras, o que pode representar um risco potencial para a saúde humana e para o ambiente. O método proposto mostrou-se adequado, confiável e sensível e pode ser usado para análises de rotina de vários contaminantes orgânicos em baixas concentrações em amostras de águas residuárias ambientais.

REFERÊNCIAS

- (1) CHINNAIYAN, P. et al. Pharmaceutical products as emerging contaminant in water: relevance for developing nations and identification of critical compounds for Indian environment. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 190, n. 5, p. 288, 2018.
 - (2) MOHAPATRA, D. P.; KIRPALANI, D. M. Advancement in treatment of wastewater: Fate of emerging contaminants. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 97, n. 10, p. 2621–2631, 2019.
 - (3) MARASCO JÚNIOR, C. A.; LUCHIARI, N. D. C.; LIMA GOMES, P. C. F. Occurrence of caffeine in wastewater and sewage and applied techniques for analysis: a review. **Eclética Química Journal**, v. 44, n. 4, p. 11, 2019.
 - (4) QUESADA, H. B. et al. Surface water pollution by pharmaceuticals and an alternative of removal by low-cost adsorbents: A review. **Chemosphere**, v. 222, p. 766–780, 2019.
 - (5) SILVA, C. G. A. DA; COLLINS, C. H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 665–676, 2011.
 - (6) GOVERNMENT ACCOUNTABILITY OFFICE (GAO). **Toxic Chemicals-High Risk Issue**. Disponível em: https://www.gao.gov/key_issues/toxic_chemicals/issue_summary. Acesso em: 6 jan. 2020.
 - (7) MATTAROZZI, M.; CARERI, M. Liquid Chromatography/Mass Spectrometry in Environmental Analysis. In: MEYERS, R. A. (Ed.). **Encyclopedia of Analytical Chemistry**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2015. p. 1–41.
 - (8) LOOS, G.; VAN SCHEPDAEL, A.; CABOOTER, D. Quantitative mass spectrometry methods for pharmaceutical analysis. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 374, n. 2079, 2016.
 - (9) PÉREZ-FERNÁNDEZ, V. et al. Recent advancements and future trends in environmental analysis: Sample preparation, liquid chromatography and mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 983, p. 9–41, 2017.
 - (10) AXEL, M. et al. An online SPE LC-MS/MS method for the analysis of antibiotics in environmental water. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 9, p. 8692–8699, 2017.
 - (11) GUSMAROLI, L.; INSA, S.; PETROVIC, M. Development of an online SPE-UHPLC-MS/MS method for the multiresidue analysis of the 17 compounds from the EU “Watch list”. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, n. 17, p. 4165–4176, 2018.
 - (12) PAVLOVIĆ, D. M. et al. Sample preparation in analysis of pharmaceuticals. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 11, p. 1062–1075, 2007.
-

- (13) RIBEIRO, C. et al. New Trends in Sample Preparation Techniques for Environmental Analysis. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 44, n. 2, p. 142–185, 2014.
- (14) MONTESDEOCA-ESPONDA, S.; SOSA-FERRERA, Z.; SANTANA-RODRÍGUEZ, J. J. On-line solid-phase extraction coupled to ultra-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry detection for the determination of benzotriazole UV stabilizers in coastal marine and wastewater samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 403, n. 3, p. 867–876, 2012.
- (15) ZHONG, M. et al. Automated online solid-phase extraction liquid chromatography tandem mass spectrometry investigation for simultaneous quantification of per- and polyfluoroalkyl substances, pharmaceuticals and personal care products, and organophosphorus flame retardants in environmental waters. **Journal of Chromatography A**, v. 1602, p. 350–358, 2019.
- (16) ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Method 1694: Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/MS/MS**. 2007.
- (17) ANDRADE-EIROA, A. et al. Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I). **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 80, p. 641–654, 2016.
- (18) BUSZEWSKI, B.; SZULTKA, M. Past, Present, and Future of Solid Phase Extraction: A Review. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 42, n. 3, p. 198–213, 2012.
- (19) LIMA GOMES, P. C. F. et al. Rapid determination of 12 antibiotics and caffeine in sewage and bioreactor effluent by online column-switching liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 29, p. 8787–8801, 2015.
- (20) VALSECCHI, S. et al. On-line sample extraction and purification for the LC–MS determination of emerging contaminants in environmental samples. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 8, p. 27–37, 2015.
- (21) WILSON, S. R. et al. On-line SPE-Nano-LC-Nanospray-MS for Rapid and Sensitive Determination of Perfluorooctanoic Acid and Perfluorooctane Sulfonate in River Water. **Journal of Chromatographic Science**, v. 45, n. 3, p. 146–152, 2007.
- (22) FONTANALS, N.; BORRULL, F.; MARCÉ, R. M. On-line weak cationic mixed-mode solid-phase extraction coupled to liquid chromatography–mass spectrometry to determine illicit drugs at low concentration levels from environmental waters. **Journal of Chromatography A**, v. 1286, p. 16–21, 2013.
- (23) HEUETT, N. V. et al. Analysis of drugs of abuse by online SPE-LC high resolution mass spectrometry: Communal assessment of consumption. **Science of the Total Environment**, v. 511, p. 319–330, 2015.
-

- (24) KUSTER, M. et al. Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin (Barcelona, Spain). **Journal of Hydrology**, v. 358, n. 1–2, p. 112–123, 2008.
- (25) GUO, F. et al. Simultaneous determination of five estrogens and four androgens in water samples by online solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1281, p. 9–18, 2013.
- (26) GORGA, M.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. Multi-residue analytical method for the determination of endocrine disruptors and related compounds in river and waste water using dual column liquid chromatography switching system coupled to mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1295, p. 57–66, 2013.
- (27) LIU, R. et al. Determination of nine benzotriazole UV stabilizers in environmental water samples by automated on-line solid phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 120, p. 158–166, 2014.
- (28) VALTO, P.; KNUUTINEN, J.; ALÉN, R. Direct injection analysis of fatty and resin acids in papermaking process waters by HPLC/MS. **Journal of Separation Science**, v. 34, n. 8, p. 925–930, 2011.
- (29) CABAN, M. et al. Matrix effects and recovery calculations in analyses of pharmaceuticals based on the determination of β -blockers and β -agonists in environmental samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1258, p. 117–127, 2012.
- (30) FAN, X. et al. Determination of 27 pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in water: The benefit of isotope dilution. **Frontiers of Environmental Science & Engineering**, v. 14, n. 1, p. 8, 2020.
- (31) HUNTSCHA, S. et al. Multiresidue analysis of 88 polar organic micropollutants in ground, surface and wastewater using online mixed-bed multilayer solid-phase extraction coupled to high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1268, p. 74–83, 2012.
- (32) PETRIE, B. et al. Fate of drugs during wastewater treatment. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 49, p. 145–159, 2013.
- (33) WU, J. et al. Study on the matrix effect in the determination of selected pharmaceutical residues in seawater by solid-phase extraction and ultra-high-performance liquid chromatography–electrospray ionization low-energy collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 9, p. 1471–1475, 2010.
- (34) GROS, M. et al. Trace level determination of β -blockers in waste waters by highly selective molecularly imprinted polymers extraction followed by liquid chromatography–quadrupole-linear ion trap mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1189, n. 1–2, p. 374–384, 2008.
-

- (35) TRENHOLM, R. A.; VANDERFORD, B. J.; SNYDER, S. A. On-line solid phase extraction LC–MS/MS analysis of pharmaceutical indicators in water: A green alternative to conventional methods. **Talanta**, v. 79, n. 5, p. 1425–1432, 2009.
- (36) SCHEURER, M. et al. The challenge of analyzing beta-blocker drugs in sludge and wastewater. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, n. 2, p. 845–856, 2010.
- (37) MATUSZEWSKI, B. K.; CONSTANZER, M. L.; CHAVEZ-ENG, C. M. Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC–MS/MS. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 13, p. 3019–3030, 2003.
- (38) STUBER, M.; REEMTSMA, T. Evaluation of three calibration methods to compensate matrix effects in environmental analysis with LC-ESI-MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 378, n. 4, p. 910–916, 2004.
- (39) STOOB, K. et al. Fully automated online solid phase extraction coupled directly to liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1097, n. 1–2, p. 138–147, 2005.
- (40) VANDERFORD, B. J.; SNYDER, S. A. Analysis of Pharmaceuticals in Water by Isotope Dilution Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry[†]. **Environmental Science & Technology**, v. 40, n. 23, p. 7312–7320, 2006.
- (41) DU, B. et al. Evaluation of an isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry method for pharmaceuticals in fish. **Journal of Chromatography A**, v. 1253, p. 177–183, 2012.
- (42) KLOEPFER, A.; QUINTANA, J. B.; REEMTSMA, T. Operational options to reduce matrix effects in liquid chromatography–electrospray ionization-mass spectrometry analysis of aqueous environmental samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1067, n. 1–2, p. 153–160, 2005.
- (43) SCHLÜSENER, M. P.; BESTER, K. Determination of steroid hormones, hormone conjugates and macrolide antibiotics in influents and effluents of sewage treatment plants utilizing high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry with electrospray and atmospheric pressure chemical ionization. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 19, n. 22, p. 3269–3278, 2005.
- (44) BUERGE, I. J. et al. Caffeine, an Anthropogenic Marker for Wastewater Contamination of Surface Waters. **Environmental Science & Technology**, v. 37, n. 4, p. 691–700, 2003.
- (45) HAI, F. et al. Carbamazepine as a Possible Anthropogenic Marker in Water: Occurrences, Toxicological Effects, Regulations and Removal by Wastewater Treatment Technologies. **Water**, v. 10, n. 2, p. 107, 2018.
- (46) MILLAR, N. L.; SIEBERT, S.; MCINNES, I. B. Europe rules on harm from fluoroquinolone antibiotics. **Nature**, v. 566, n. 7744, p. 1, 2019.
-

- (47) LI, N. et al. Partition and fate analysis of fluoroquinolones in sewage sludge during anaerobic digestion with thermal hydrolysis pretreatment. **Science of the Total Environment**, v. 581–582, p. 715–721, 2017.
- (48) TEGLIA, C. M. et al. Occurrence, Distribution, and Ecological Risk of Fluoroquinolones in Rivers and Wastewaters. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 38, n. 10, p. 2305–2313, 2019.
- (49) CLINICALC. **The Top 300 of 2020**. Disponível em: <https://clincalc.com/DrugStats/Top300Drugs.aspx>. Acesso em: 17 ago. 2020.
- (50) NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM). Venlafaxine, Desvenlafaxine. In: **LiverTox: Clinical and Research Information on Drug Induced Liver Injury**. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2012, p. 10.
- (51) HADDAD, P. R. Column theory and resolution in liquid chromatography. In: MEYERS, R. A. (Ed.). **Encyclopedia of Analytical Chemistry**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2009.
- (52) SILVA, B. F.; SOUZA, J. C.; ZANONI, M. V. B. Cromatografia aplicada na análise de corantes. In: **Corantes: Caracterização química, toxicológica, métodos de detecção e tratamento**. 1. ed. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2016. p. 347.
- (53) GÓMEZ-RAMOS, M. DEL M. et al. The evaluation of matrix effects in pesticide multi-residue methods via matrix fingerprinting using liquid chromatography electrospray high-resolution mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 8, n. 23, p. 4664–4673, 2016.
- (54) MARTINS, G. S. et al. Removal of sulfamethoxazole and trimethoprim using horizontal-flow anaerobic immobilized bioreactor. **Scientia Chromatographica**, v. 9, n. 4, p. 253–264, 2017.
- (55) DETHY, J.-M. et al. Demonstration of Direct Bioanalysis of Drugs in Plasma Using Nanoelectrospray Infusion from a Silicon Chip Coupled with Tandem Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 4, p. 805–811, 2003.
- (56) CLOUSER-ROCHE, A. et al. Beyond pass/fail: A procedure for evaluating the effect of carryover in bioanalytical LC/MS/MS methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, n. 1, p. 146–155, 2008.
- (57) FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Bioanalytical Method Validation: Guidance for Industry**. 2018. Disponível em: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry>.
- (58) INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE (ICH). **Draft Bioanalytical Method Validation M10**. 2019. Disponível em: <https://www.ich.org/page/multidisciplinary-guidelines>.
-

- (59) AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017. Guia para validação de métodos analíticos - Julho, 2017.** Disponível em: http://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/19194581/do1-2017-07-25-resolucao-rdc-n-166-de-24-de-julho-de-2017-19194412.
- (60) INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). **Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos - DOC - CGCRE - 008.** 2018. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_07.pdf.
- (61) INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY (IUPAC). **Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis.** v. 74, n. 5, p. 835–855, 2002.
- (62) INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE (ICH). **Validation of analytical procedures: Text and methodology.** 2010. Disponível em: <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>.
- (63) FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics.** 2015. Disponível em: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/analytical-procedures-and-methods-validation-drugs-and-biologics>.
- (64) CHOI, D. Y.; ROW, K. H. Theoretical analysis of chromatographic peak asymmetry and sharpness by the moment method using two peptides. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 9, n. 6, p. 495–499, 2004.
- (65) CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH (CDER). **Reviewer guidance: validation of chromatographic methods.** 1994. Disponível em: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/reviewer-guidance-validation-chromatographic-methods>.
- (66) SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, v. 987, n. 1-2, p. 57-66, 2003.
- (67) YUWONO, M.; INDRAYANTO, G. Validation of Chromatographic Methods of Analysis. In: **Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology.** Elsevier, 2005. v. 32, p. 243–259.
- (68) LÓPEZ-SERNA, R. et al. Fully automated determination of 74 pharmaceuticals in environmental and waste waters by online solid phase extraction–liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 83, n. 2, p. 410–424, 2010.
-

- (69) GROS, M.; RODRÍGUEZ-MOZAZ, S.; BARCELÓ, D. Rapid analysis of multiclass antibiotic residues and some of their metabolites in hospital, urban wastewater and river water by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1292, p. 173–188, 2013.
- (70) POZO, O. J. et al. Efficient approach for the reliable quantification and confirmation of antibiotics in water using on-line solid-phase extraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1103, n. 1, p. 83–93, 2006.
- (71) TAGIRI-ENDO, M. et al. Rapid determination of five antibiotic residues in swine wastewater by online solid-phase extraction–high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, n. 4, p. 1367–1375, 2009.
- (72) GARCIA-AC, A. et al. On-line solid-phase extraction of large-volume injections coupled to liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the quantitation and confirmation of 14 selected trace organic contaminants in drinking and surface water. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 48, p. 8518–8527, 2009.
- (73) FERRER-AGUIRRE, A. et al. Simple and quick determination of analgesics and other contaminants of emerging concern in environmental waters by on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1446, p. 27–33, 2016.
- (74) GRACIA-LOR, E.; SANCHE, J. V.; HERNÁNDEZ, F. Multi-class determination of around 50 pharmaceuticals, including 26 antibiotics, in environmental and wastewater samples by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 16, p. 2264–2275, 2011.
- (75) EC-EUROPEAN COMMISSION DOCUMENT N° SANTE/11813/2017. **Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed**. Disponível em: <https://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/tmpl_article.asp?CntID=727>. Acesso em: 15 abr. 2020.
- (76) MILHOME, M. A. L. et al. Multiresidue analysis and evaluation of the matrix effect on 20 pesticides in Brazilian maize (*Zea mays* L.) flour. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 54, n. 11, p. 892–897, 2019.
- (77) FERREIRA, A. P. Caffeine as an environmental indicator for assessing urban aquatic ecosystems. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, n. 6, p. 1884–1892, 2005.
- (78) GONÇALVES, E. S.; RODRIGUES, S. V.; SILVA-FILHO, E. V. DA. The use of caffeine as a chemical marker of domestic wastewater contamination in surface waters: seasonal and spatial variations in Teresópolis, Brazil. **Ambiente e Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 12, n. 2, p. 192–202, 2017.
- (79) SPOSITO, J. C. V. et al. Emerging contaminants in Brazilian rivers: Occurrence and effects on gene expression in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Chemosphere**, v. 209, p. 696–704, 2018.
-

- (80) GROS, M.; PETROVIĆ, M.; BARCELÓ, D. Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. **Talanta**, v. 70, n. 4, p. 678–690, 2006.
- (81) PEDROUZO, M. et al. Pharmaceutical determination in surface and wastewaters using high-performance liquid chromatography–(electrospray)–mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v. 30, n. 3, p. 297–303, 2007.
- (82) BIEL-MAESO, M. et al. Occurrence, distribution and environmental risk of pharmaceutically active compounds (PhACs) in coastal and ocean waters from the Gulf of Cadiz (SW Spain). **Science of the Total Environment**, v. 612, p. 649–659, 2018.
- (83) CAMPANHA, M. B. et al. A 3-year study on occurrence of emerging contaminants in an urban stream of São Paulo State of Southeast Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 7936–7947, 2015.
- (84) CHEN, H. et al. Characterization of antibiotics in a large-scale river system of China: Occurrence pattern, spatiotemporal distribution and environmental risks. **Science of the Total Environment**, v. 618, p. 409–418, 2018.
- (85) PAÍGA, P. et al. Presence of pharmaceuticals in the Lis river (Portugal): Sources, fate and seasonal variation. **Science of the Total Environment**, v. 573, p. 164–177, 2016.
- (86) BÖGER, B. et al. Determination of carbamazepine and diazepam by SPE-HPLC-DAD in Belém River water, Curitiba-PR/Brazil. **Ambiente e Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 13, n. 2, p. 1–12, 2018.
- (87) CHAVES, M. DE J. S. et al. Pharmaceuticals and personal care products in a Brazilian wetland of international importance: Occurrence and environmental risk assessment. **Science of the Total Environment**, v. 734, 2020.
- (88) ALMEIDA, C. A. A. et al. Determination of the psychoactive drugs carbamazepine and diazepam in hospital effluent and identification of their metabolites. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 21, p. 17192–17201, 2015.
- (89) PIVETTA, R. C. et al. Tracking the occurrence of psychotropic pharmaceuticals in Brazilian wastewater treatment plants and surface water, with assessment of environmental risks. **Science of the Total Environment**, v. 727, 2020.
-

Capítulo 3

**EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA ON-LINE DE BAIXO
CUSTO ACOPLADA A LC-MS/MS PARA
DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS
FARMACÊUTICOS EM AMOSTRAS DE ESTAÇÕES
DE TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS
(AFLUENTES E EFLUENTES)**

3 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA ON-LINE DE BAIXO CUSTO ACOPLADA A LC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FARMACÊUTICOS EM AMOSTRAS DE ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS (AFLUENTES E EFLUENTES)

3.1 INTRODUÇÃO

Compostos farmacêuticos e produtos de higiene pessoal (PPCPs, do inglês *pharmaceuticals and personal care products*) são substâncias amplamente utilizadas na sociedade moderna ¹. Estima-se que, anualmente, cerca de 1.500 novos produtos químicos sejam inseridos no meio ambiente ². Esses compostos são conhecidos como contaminantes emergentes, sendo encontrados em concentrações que variam de ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$ ³, sem qualquer norma ou legislação estabelecida relacionada ao controle no ambiente ^{4,5}. Nos últimos anos, o avanço em instrumentação analítica, especialmente, em espectrometria de massas, e o acoplamento com outras técnicas, como cromatografia líquida (LC-MS/MS), permitiu a detecção de compostos nesses níveis de concentração ⁴⁻¹⁰.

Apesar dos diversos avanços na instrumentação analítica, a complexidade das matrizes de amostras, como amostras biológicas, alimentícias e ambientais, torna a etapa de preparo da amostra extremamente importante para pré-concentrar os compostos alvo, diminuir o efeito da matriz e evitar danos para o instrumento e/ou para a coluna cromatográfica ^{4,11-13}. A extração de fase sólida (SPE) é comumente empregada no preparo de amostra ¹³⁻¹⁵, sendo a técnica de escolha para análise de contaminantes orgânicos da Environmental Protection Agency (EPA) ^{16,17}. Esta técnica tem se mostrado versátil ao permitir a integração entre preparo de amostra e análise cromatográfica conectados por uma válvula de seis portas e duas posições. Ao usar o column switching, automatizamos o processo analítico e evitamos manipulação excessiva de amostras e contaminação cruzada ^{13,16,18}.

A automação da etapa de preparo de amostra oferece grandes vantagens analíticas, como o uso de novos materiais sorventes nas colunas de pré-concentração, como materiais de acesso restrito (RAM), que forneceram uma nova abordagem e horizonte para o preparo de amostras. Além disso, são frequentemente utilizados em sistemas com comutação de colunas para pré-concentração e extração de analitos ¹⁹⁻²¹.

Os sorventes RAM permitem a separação de analitos por meio de uma combinação de exclusão de tamanho e interações hidrofóbicas convencionais ou de troca iônica, que permitem a passagem de pequenas moléculas e restringe o acesso de macromoléculas à fase extratora ^{13,21}. Em comparação com os sorventes SPE tradicionais, esse tipo de sorvente apresenta muitas

vantagens, incluindo longa vida útil, alta eficiência de separação, perdas de analito reduzidas e baixos custos totais por análise ²⁰. São utilizados, principalmente, para a análise de substâncias com baixa massa molar em matrizes complexas contendo proteínas, sem tratamento prévio da amostra, mesmo a filtração pode não ser necessária ²⁰.

A maioria das aplicações dos materiais de acesso restrito estão no campo bioanalítico, ou seja, muitos dos trabalhos publicados anteriores estão focados na análise de fluidos biológicos. De acordo com Sadílek et al. (2007) ²⁰, as aplicações ambientais concentram o segundo maior uso desse tipo de sorvente. Estudos publicados anteriormente aplicaram materiais de acesso restrito na análise de artemisinina em plasma e saliva ²², trimetoprima e sulfametoxazol em ovos ²³, antibióticos cefalosporina em leite bovino ²⁴ e análise de tetraciclina em amostras de leite e água ²⁵. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi desenvolver um método automatizado LC-MS/MS para análise simultânea de CBZ, CIP, FLX, NOR, VEN e CAF em amostras de águas residuárias.

Ao nosso conhecimento, é a primeira vez que um método automatizado com injeção direta de amostras de águas residuárias foi descrito para a determinação simultânea desses seis fármacos utilizando sorvente RAM na etapa de preparo de amostra. Para isso, foi preparada uma coluna de albumina sérica bovina (RAM-BSA) em laboratório e o método desenvolvido, otimizado e validado de acordo com as normas nacionais e internacionais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desta forma, procura-se desenvolver e validar método de LC-MS/MS utilizando a coluna RAM feita em laboratório na etapa preparo de amostra on-line para determinação dos fármacos supracitados em amostras de afluente e efluente coletadas de ETEs na região de Araraquara (SP-Brasil) durante a primavera-verão, esgoto doméstico coletado em São Carlos (SP-Brasil) e também em efluente hospitalar do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (SP-Brasil).

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1 Reagentes

Os reagentes utilizados nesta etapa foram os mesmos citados no capítulo 2, seção 2.3.1.

3.3.2 Método on-line RAM-LC-MS/MS

3.3.2.1 Parâmetros instrumentais MS/MS

O equipamento utilizado para análise LC-MS/MS, bem como os parâmetros dependentes da fonte de ionização por electrospray e os parâmetros para detecção por espectrometria de massas encontram-se na seção 2.3.2.1 do capítulo 2.

O espectrômetro de massas foi operado no modo de ionização positiva (ESI+) com monitoramento de reação selecionado (SRM). Para fins quantitativos, três transições SRM diferentes foram monitoradas para cada composto. Transições SRM e parâmetros MS para detecção são mostrados na **Tabela 3.1**.

Tabela 3.1 - Lista de compostos com íons precursores e produtos, bem como os parâmetros para detecção de MS e tempo de retenção do método SRM.

Analito	Q1 (<i>m/z</i>)	Q3 (<i>m/z</i>)*	Dwell time (ms)	DP	EP	CEP	CE	CXP	Tempo retenção (min)
CAF	195	138	30,0	51,0	4,50	14,0	31,0	4,00	5,27
		42					53,0	6,00	
		110					31,0	4,00	
CAF- ¹³ C ₃	198	140	30,0	51,0	8,00	14,0	27,0	4,00	
		43					59,0	4,00	
CBZ	237	194	60,0	46,0	6,50	14,0	21,0	4,00	7,38
		192					31,0	4,00	
		193					43,0	4,00	
CBZ-d ₁₀	247	204	60,0	46,0	6,00	16,0	23,0	4,00	
		202					39,0	4,00	
CIP	332	288	30,0	51,0	6,50	16,0	19,0	4,00	5,64
		314					19,0	4,00	
		245					23,0	4,00	
CIP-d ₈	340	296	30,0	46,0	7,50	26,0	19,0	4,00	
		235					51,0	4,00	
FLX	310	117	30,0	31,0	3,00	14,0	51,0	4,00	7,84
		148					11,0	4,00	
		91					83,0	4,00	
FLX-d ₆	316	44	30,0	26,0	6,00	16,0	33,0	4,00	
		154					13,0	4,00	
NOR	320	276	30,0	51,0	5,00	12,0	19,0	6,00	5,56
		233					25,0	4,00	
		302					17,0	4,00	
NOR-d ₅	325	307	30,0	51,0	7,00	24,0	21,0	4,00	
		281					17,0	4,00	
VEN	278	58	30,0	31,0	5,50	16,0	35,0	4,00	6,30
		260					13,0	4,00	
		121					37,0	4,00	
VEN-d ₆	284	64	30,0	46,0	8,50	18,0	39,0	4,00	
		266					13,0	4,00	

*As transições em negrito foram escolhidas para fins de quantificação (Q).

Fonte: autoria própria.

A resolução no primeiro e no terceiro quadrupolo (Q1 e Q3) foi definida como unitária e o atraso entre as varreduras foi de 5 ms. Os dados foram coletados e processados no software Analyst[®] 1.5.2.

3.3.2.2 Preparo de coluna RAM

Para preparação da coluna RAM–BSA utilizada na etapa de preparo de amostra on-line, um hardware de coluna (40 mm × 4,6 mm) foi empacotada com cerca de 664,5 mg de Luna[®] 10 µm de tamanho de partícula C18 100 Å de tamanho de poro da Phenomenex[®]. A fase suporte foi modificada in situ por adaptação de um protocolo descrito na literatura^{26,27}, como por exemplo, os reagentes foram impulsionados por N₂ pressurizado. A coluna C18 foi condicionada por cerca de 2 horas com metanol (MeOH) a uma vazão de 1 mL min⁻¹. Depois disso, a coluna foi percolada com solução tampão de fosfato 0,05 mol L⁻¹ (pH 6,0) por 20 minutos, seguida por uma solução de 1,0 mg mL⁻¹ de albumina sérica bovina (BSA) preparada na mesma solução tampão por 20 minutos. Essa etapa foi seguida pela passagem de água ultrapura por 10 minutos e, então, solução aquosa de glutaraldeído a 25 % (v/v) por 5 minutos. Após 5 horas de repouso, a coluna foi lavada por 5 minutos com uma solução de borohidreto de sódio a 1 mg mL⁻¹ e, após 2 horas, acondicionada com água ultrapura.

3.3.2.3 Cromatografia líquida

A separação por cromatografia líquida foi realizada utilizando um cromatógrafo Shimadzu[®] Nexera X2 HPLC/UHPLC (Kyoto, JPN) equipado com duas bombas LC-30AD (modo de bombeamento de fluxo binário), integradas a uma unidade degaseificadora DGU-20A3R, amostrador automático SIL-30AC com capacidade de injeção de 0,1 a 50 µL, e um compartimento de forno de coluna CTO-20A. Para completar o sistema, um controlador de sistema modular HPLC CBM-20A atua como uma interface para conectar a instrumentação à estação de trabalho LC. Uma bomba adicional, modelo Pro-Star 230 Solvent Delivery Module (bomba 2) da Varian[®], foi usada para carregar a amostra no sistema.

Os sistemas foram conectados por meio de uma válvula de duas posições e seis portas usada para alternar automaticamente do carregamento (posição 1) para a eluição (posição 2) no modo de backflush, conforme demonstrado na **Figura 1.4** do capítulo 1.

Uma coluna Phenomenex Kinetex[®] C18 100 Å (50 × 2,1 mm, 5 µm) foi utilizada na separação cromatográfica. A coluna de pré-concentração (RAM–BSA) e a coluna analítica foram mantidas a 30 ° C no compartimento de forno de coluna. O volume de injeção adotado foi de 50 µL.

Os eluentes da bomba 1 foram água ultrapura com 0,1 % de ácido fórmico (A) e acetonitrila com 0,1 % de ácido fórmico (B) em uma vazão de 0,6 mL min⁻¹. Uma eluição em modo gradiente foi empregada de acordo com a **Tabela 3.2**.

Tabela 3.2 - Programação de eluição gradiente utilizada na bomba 1.

Tempo (min)	A (%)	B (%)
0,00-3,10	95,0	5,00
3,10-5,50	75,0	25,0
5,50-6,50	75,0	25,0
6,50-8,00	0,00	100
8,00-12,0	0,00	100
12,0-13,0	95,0	5,00
13,0-16,0	95,0	5,00

Fonte: autoria própria.

A fase móvel utilizada na bomba 2 foi água ultrapura, mantida em vazão de 1 mL min⁻¹ ao longo da corrida cromatográfica. A separação cromatográfica foi avaliada com base no fator de assimetria (As) que descreve a forma do pico cromatográfico a 10 % da altura do pico, definida como a distância da linha central do pico até a inclinação posterior (A) dividida pela distância da linha central do pico até a inclinação frontal (B). Além disso, a resolução de picos (Rs), uma medida de separação de dois picos de tempos de retenção diferentes, foi usada para avaliar a separação do método de acordo com a **Equação 2.1**, apresentada no capítulo 2 na seção 2.3.2.2.

A coluna RAM foi carregada usando 100 % de eluente A por 3 min da bomba 2. A válvula de seis portas foi então trocada para a posição 2 (eluição), e a bomba 1 estava funcionando em um gradiente linear anteriormente descrito. Aos 9,5 min, a válvula de comutação da coluna retornou à posição 1 (carregamento). A composição do eluente foi mantida a 100 % de (B) por 4 min antes de retornar às condições iniciais, que foram mantidas durante 4 min para equilíbrio.

A válvula do espectrômetro de massas foi mantida até 2,9 min direcionada para o descarte. De 3 minutos a 10 minutos, o fluxo do sistema foi direcionado para o espectrômetro de massas. A válvula retornou ao descarte em 10,1 min, permanecendo nesta posição até o final da análise. Após cada conjunto de análise, procedeu-se uma limpeza do sistema com eluentes da fase móvel e uma injeção de acetonitrila para evitar contaminação cruzada e efeito memória no sistema.

3.3.3 Validação do método

O método foi validado seguindo as diretrizes nacionais ^{28,29} e também as diretrizes internacionais de validação ³⁰⁻³². O espectrômetro de massas foi operado no modo SRM, e três transições foram monitoradas para cada composto. A transição com o sinal mais intenso foi utilizada para quantificação (Q) e as transições adicionais foram usadas para confirmação (q). O tempo de retenção foi monitorado e comparado com os padrões marcados isotopicamente para confirmação posterior.

Para validação do método, foram avaliados o limite de detecção (LD), o limite de quantificação (LQ), a linearidade, a precisão inter-dia e intra-dia. O método de diluição isotópica foi utilizado para quantificação, e os padrões isotopicamente marcados foram comparados com cada analito individual.

A resposta de linearidade do método foi avaliada usando curvas analíticas preparadas em água ultrapura para posterior quantificação dos analitos nas amostras. O método também foi avaliado utilizando esgoto lab-made, no entanto, em vista de estar se utilizando padrões isotopicamente marcados individuais e específicos para cada composto, foi possível realizar a quantificação dos analitos nas amostras utilizando os dados de validação obtidos na água ultrapura.

Utilizando água ultrapura no preparo, a linearidade para CAF foi avaliada por meio de duas curvas contendo cinco pontos com concentrações entre 0,5 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ (curva um) e oito pontos com concentrações entre 40 e 750 $\mu\text{g L}^{-1}$ (curva dois). Para CBZ, cinco pontos com concentrações entre 0,1 e 5 $\mu\text{g L}^{-1}$, CIP e NOR também cinco pontos de concentração variando entre 5 e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. FLX cinco pontos de intervalo linear de 0,1 a 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ e cinco pontos de 0,1 a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ VEN.

Já para o esgoto lab-made, o intervalo de linearidade para CAF foi avaliado usando seis pontos com concentrações entre 0,1 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ (curva 1) e sete pontos com concentrações entre 40 e 750 $\mu\text{g L}^{-1}$ (curva 2). Para CBZ, seis pontos com concentrações entre 0,1 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, CIP com cinco pontos de concentração variando de 5 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ e NOR com cinco pontos de concentração variando entre 10 e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$. FLX com cinco pontos em intervalo linear de 0,1 a 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ e seis pontos de 0,1 a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ para VEN.

O modelo linear foi obtido por meio de regressão linear de mínimos quadrados ponderados (WLSLR). Ponderações de $1/x$, $1/x^2$, $1/x^{0.5}$ e $1/y$, $1/y^2$, $1/y^{0.5}$ foram avaliados para determinar o melhor modelo matemático. Linearidade e falta de ajuste foram avaliadas por análise de variância (ANOVA).

A precisão intra-dia foi avaliada e expressa como uma média do desvio padrão relativo (% RSD) para todos os níveis de concentração para cada composto no mesmo dia em triplicado ($n = 3$), enquanto a precisão inter-dia foi medida como uma média do desvio padrão relativo (% RSD) de três níveis de concentração (baixo, médio e alto) em um dia diferente em triplicado ($n = 3$).

LD e LQ foram estimados experimentalmente como a concentração resultando na relação sinal/ruído (S/N) de 3 e 10, respectivamente. Além disso, para LQ, ou seja, para o primeiro ponto da curva analítica, um critério adicional de um desvio padrão relativo inferior a 20 % foi adotado para garantir a confiabilidade do propósito de quantificação e a qualidade da análise.

O efeito da matriz da amostra (EM) nas eficiências de ionização pode variar significativamente entre os compostos. Para determinar o efeito da matriz, usamos a seguinte **Equação 2.2**, sugerida por Gómez-Ramos et al. (2016)³³ e apresentada no capítulo 2, seção 2.3.3.

O efeito da matriz para cada composto foi então calculado como a razão entre as áreas de pico na matriz com adição, isto é, em esgoto feito em laboratório e em água ultrapura com adição. A composição produzida em laboratório, apresentada na seção 2.3.3 do capítulo 2, apresentou pH = 8,0 e demanda química de oxigênio (DQO) de 550 mg O₂ L⁻¹^{34,35}.

O efeito memória (carryover) foi avaliado injetando três vezes uma solução padrão a 200 ng mL⁻¹ seguida por três injeções consecutivas de acetonitrila (sem os compostos alvo), caso o sinal obtido em acetonitrila excedesse 20 % do LQ³⁶⁻³⁹, teríamos a confirmação da presença de efeito memória.

3.3.4 Amostragem e preparo de amostra

As informações de coleta e preparo de amostra encontram-se descritas no capítulo 2, seção 2.3.4, sendo inclusive adotado preparo e critério similar ao apresentado anteriormente no que diz respeito a necessidade de filtração das amostras. Informações adicionais são dadas abaixo.

Antes da análise, as amostras foram divididas em triplicatas; os padrões internos deuterados foram adicionados na concentração de 40 ng mL⁻¹. Finalmente, as amostras foram analisadas usando o sistema on-line RAM-LC-MS/MS e quantificadas por diluição isotópica.

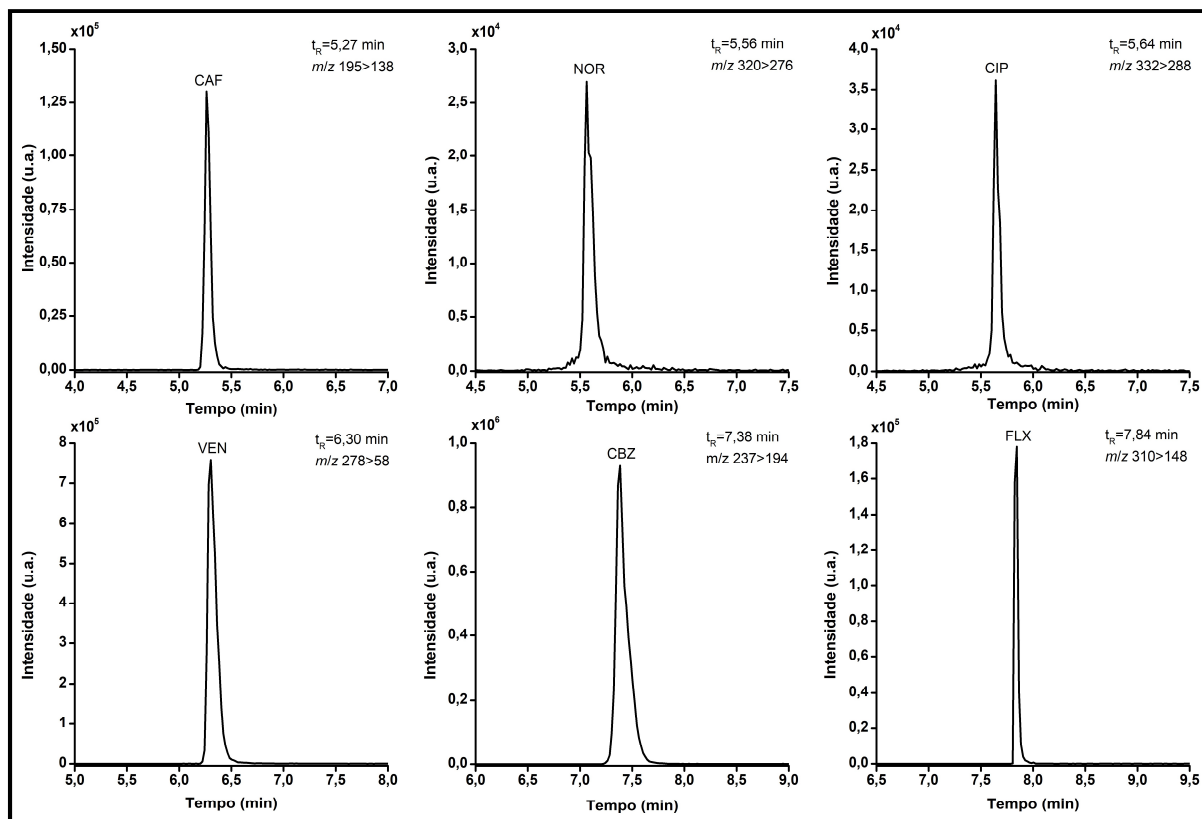
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 SPE on-line RAM-LC-MS/MS

A otimização do método foi realizada por meio de injeção de soluções padrão individuais de CAF, CBZ, NOR, CIP, VEN e CBZ no sistema LC-MS/MS. Os compostos foram analisados em modo positivo, e o íon $[M+H]^+$ foi utilizado como íon precursor para todos eles. Todos os compostos estudados deram pelo menos dois íons produto, e duas transições com a maior intensidade foram usadas como íons quantificadores (Q) e qualificadores (q) conforme descrito anteriormente.

Para o método SRM, o tempo de ciclo foi de 1,2 ms, com 800 varreduras no período, dando tempo de permanência variando de 30 a 60 ms, dependendo do número de transições de SRM monitoradas. Cerca de 10 pontos de dados por pico foram alcançados para todos os compostos, sendo suficientes para fins de quantificação e permitindo a determinação simultânea dos compostos selecionados na mesma injeção, conforme mostrado na **Figura 3.1**.

Figura 3.1 - Cromatograma de íons extraídos (XIC) de solução padrão 200 µg L-1: CAF (195>138), NOR (320>276), CIP (332>288), VEN (278>58), CBZ (237>194), and FLX (310>148) com os respectivos tempos de retenção dos analitos.



Fonte: autoria própria.

As condições cromatográficas também foram otimizadas de forma a se obter uma eluição adequada dos compostos alvo em um curto tempo de análise, seguindo as condições

descritas acima. Em relação à vazão selecionada de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ foi adequado eluir os compostos alvo com pressão adequada (faixa de pressão observada durante os experimentos: $150\text{-}220 \text{ kgf cm}^{-2}$).

Em seguida, foi avaliada a fase móvel utilizada para carregar a amostra. A água ultrapura (eluente A - bomba 2) sem aditivo a uma taxa de fluxo de 1 mL min^{-1} forneceu resultados adequados, permitindo a pré-concentração do analito e a subsequente eluição. Os analitos retidos no cartucho foram eluídos para a coluna cromatográfica de acordo com a **Tabela 3.2**. Além disso, após a eluição dos compostos para a coluna cromatográfica, foi adicionada uma etapa de lavagem da coluna RAM e a seguir, a coluna foi condicionada com a fase A até o final da corrida cromatográfica.

O ácido fórmico a 0,1 % foi escolhido como aditivo do eluente, uma vez que concentrações mais elevadas não aumentaram a resposta do sinal. Além disso, percebemos que altas concentrações desse ácido podem prejudicar o material de acesso restrito, devido a uma possível desnaturação da proteína (BSA). Observamos comprometimento do perfil cromatográfico, mudanças nos tempos de retenção (CAF, por exemplo, não teve retenção) e diminuição da área/intensidade dos analitos. Um volume de injeção de $50 \mu\text{L}$ com um tempo de carregamento de 3 min foi escolhido sem afetar a separação cromatográfica ou as formas dos picos.

Neste ponto, a assimetria para o composto alvo menos retido (CAF; $\log p = -0,07$) e mais retido (FLX; $\log p = 4,05$) foi, respectivamente, 1,6 e 1,3, mostrando que para o método desenvolvido, o pico da FLX encontra-se no critério aplicado para a assimetria, ou seja, $0,8 < A_s < 1,5$, mostrando-se simétrico ⁴⁰. Em relação ao pico CAF, o respectivo resultado pode indicar um leve fronting. Para isso, o fator de encaudamento (Tf), calculado de acordo com a **Equação 2.3**, demonstrada no capítulo 2 e seção 2.4.1. O resultado $T_f = 1,4$ indica que o pico está nos critérios aceitáveis para o fator de encaudamento, ou seja, T_f deve ser ≤ 2 de acordo com as diretrizes para validação do método cromatográfico ⁴¹⁻⁴³, não prejudicando a confiabilidade dos resultados da análise. É importante notar que, apesar da semelhança entre os fatores (assimetria e encaudamento), esses valores não podem ser convertidos diretamente.

Aliado a esses resultados, foi calculada a resolução para os pares CAF-NOR, NOR-CIP e CBZ-FLX para avaliar o desempenho da coluna. O par CAF-NOR apresentou $R_s > 1,5$ ($R_s = 4,0$), ou seja, a separação foi eficiente para os dois primeiros compostos alvo com alta resolução. Para o segundo par (NOR-CIP), $R_s < 1,5$ ($R_s = 0,88$), mostrando uma resolução baixa. O motivo desse resultado é a similaridade estrutural desses compostos, por pertencerem ao mesmo grupo

farmacológico (fluoroquinolonas) com fórmulas estruturais semelhantes, diferindo por apenas um grupo (CH_2), e, em fase reversa coluna C18, é difícil separá-los. Porém, embora a resolução seja baixa, a coeluição é contornada, pois o detector utilizado no estudo é um espectrômetro de massas, capaz de diferenciar essas moléculas de acordo com a relação massa/carga (m/z).

Para o último par (CBZ-FLX), a resolução foi maior que 1,5 ($R_s = 6,1$) demonstrando que a separação foi eficiente para os dois últimos compostos alvo com alta resolução. Esses resultados comprovaram que o método é adequado e apresenta separação confiável dos compostos alvo e pode ser utilizado para o objetivo deste estudo, de acordo com os resultados apresentados pelas figuras cromatográficas analisadas. Efeito memória não foi observado para qualquer composto, uma vez que o perfil do gradiente do sistema de bombeamento de fluxo binário foi estudado e definido para prevenir este efeito, bem como a limpeza interna, externa e do loop do injetor.

Além disso, a coluna RAM poderia ser utilizada para a extração de várias amostras sem perda significativa de sinal e sem reposição, ou seja, todas as etapas de validação do método e análise das amostras foram processadas na mesma coluna, resultando em um número estimado de injeções maiores que 200. O tempo total de análise foi de 16 min, incluindo preparação da amostra e separação cromatográfica. Nesse tempo, o cartucho e a coluna foram lavados, passados por etapas de reequilíbrio que permitiram obter um método rápido e simples para a determinação simultânea dos compostos alvo.

3.4.2 Validação do método

ANOVA foi aplicada para avaliar linearidade e falta de ajuste, CBZ, CIP, NOR e VEN apresentaram falta de ajuste nas curvas em água ultrapura. Em seguida, a regressão linear quadrada ponderada de $1/x^{0,5}$, $1/x^2$, $1/x^2$ e $1/x$ foi adotada para CBZ, CIP, NOR e VEN, respectivamente. Calibrações ponderadas não foram necessárias para CAF (curvas 1 e 2) e FLX.

No esgoto lab-made apenas FLX apresentou falta de ajuste, sendo adotada a regressão $1/x^2$ para o analito. Não foram necessárias calibrações ponderadas para os demais analitos. Os fatores de ponderação para água ultrapura e esgoto lab-made foram selecionados com base no menor resultado da soma do erro residual relativo.

Os resultados de precisão intra e inter-dia, expressos como % RSD, são compatíveis com as diretrizes nacionais^{28,29} e internacionais³⁰⁻³² de validação para ambas as matrizes avaliadas.

Concentrando a discussão apenas nos resultados obtidos utilizando água ultrapura, visto que estes serão os dados que guiarão a quantificação dos compostos nas amostras, em virtude do uso de padrões isotopicamente marcados que possibilitam tal abordagem, os valores de precisão intra e inter-dia foram inferiores a 5,79 e 14,1 %, respectivamente, o que é aceitável para amostras complexas ^{44,45}. Nos níveis mais baixos de concentração, especificamente, no primeiro ponto da curva analítica, o RSD foi inferior a 7 % para cinco compostos (CBZ, CIP, VEN, FLX e CAF - curva 1) e a 16 % para dois compostos (NOR e CAF - curva 2) indicando a precisão do método.

O LD e o LQ foram obtidos com base na relação S/N de 3 e 10, respectivamente e com RSD inferior a 20 %. O LD variou de 0,01 a 3 µg L⁻¹ e o LQ de 0,1 a 5 µg L⁻¹. Esses valores estão na faixa próxima de estudos anteriores aplicando extração de fase sólida (SPE) on-line na etapa de preparação de amostra ^{9,10,14,34,44,46-52}. A **Tabela 3.3** e **3.4** fornece maiores detalhes sobre o LD, LQ, a precisão intra e inter-dia, também a faixa linear, equação da curva analítica e calibração ponderada.

Tabela 3.3 - Valores de linearidade, precisão intra-dia e inter-dia e pesos empíricos obtidos na validação do método em água ultrapura.

Analito	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Equação da curva analítica*	Pesos empíricos**	Precisão inter-dia (% RSD)***	Precisão intra-dia (% RSD)	Padrão interno
CAF	0,0500	0,500	Curva 1: 0,500-10,0	$a = 6,47 \times 10^{-1}$ $b = 1,07 \times 10^{-2}$ $r^2 = 0,999$	NA	6,59	5,30 (n=5)	CAF- $^{13}\text{C}_3$
			Curva 2: 40,0-750	$a = 6,13 \times 10^{-1}$ $b = 2,16 \times 10^{-1}$ $r^2 = 0,999$	NA	13,0	5,79 (n=8)	
CBZ	0,0100	0,100	0,100-5,00	$a = 1,32$ $b = 2,15 \times 10^{-2}$ $r^2 = 0,997$	$1/x^{0,5}$	8,85	5,34 (n=5)	CBZ-D ₁₀
CIP	3,00	5,00	5,00-200	$a = 2,04$ $b = -1,23 \times 10^{-1}$ $r^2 = 0,999$	$1/x^2$	5,72	2,97 (n=5)	CIP-D ₈
FLX	0,0500	0,100	0,100-5,00	$a = 2,87 \times 10^{-2}$ $b = 5,00 \times 10^{-4}$ $r^2 = 0,999$	NA	14,1	5,22 (n=5)	FLX-D ₆
NOR	3,00	5,00	5,00-200	$a = 6,78 \times 10^{-1}$ $b = -4,26 \times 10^{-2}$ $r^2 = 0,997$	$1/x^2$	11,6	5,56 (n=5)	NOR-D ₅
VEN	0,0500	0,100	0,100-10,0	$a = 1,06$ $b = 5,04 \times 10^{-3}$ $r^2 = 0,996$	$1/x$	5,16	2,74 (n=5)	VEN-D ₆

*a: intercepto, b: inclinação, r^2 : coeficiente de determinação **NA: não aplicado

*** Concentrações utilizados para os cálculos de precisão inter-dia em $\mu\text{g L}^{-1}$: CAF (curva 1)= 0,500; 3,00; 10,0 / CAF (curva 2)= 70,0; 200; 750 / CBZ= 0,100; 1,00; 5,00 / CIP= 5,00; 40,0; 200 / FLX= 0,100; 1,00; 5,00 / NOR= 5,00; 70,0; 200 / VEN= 0,100; 1,00; 10,0.

Fonte: autoria própria.

Tabela 3.4 - Valores de linearidade, precisão intra-dia e inter-dia e pesos empíricos obtidos na validação do método em esgoto lab-made.

Analito	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Equação da curva analítica*	Pesos empíricos**	Precisão inter-dia (% RSD)***	Precisão intra-dia (% RSD)	Padrão interno
CAF	0,0500	0,100	Curva 1: 0,100-10,0	$a = 9,07 \times 10^{-1}$ $b = 1,10 \times 10^{-2}$ $r^2 = 0,998$	NA	1,35	6,86 (n=6)	CAF- ¹³ C ₃
			Curva 2: 40,0-750	$a = 6,56 \times 10^{-1}$ $b = 1,25 \times 10^{-1}$ $r^2 = 0,996$	NA	14,6	3,85 (n=7)	
CBZ	0,0500	0,100	0,100-10,0	$a = 2,39$ $b = 6,19 \times 10^{-2}$ $r^2 = 0,999$	NA	7,46	3,43 (n=6)	CBZ-D ₁₀
CIP	3,00	5,00	5,00-100	$a = 2,78$ $b = -1,66 \times 10^{-1}$ $r^2 = 0,999$	NA	7,50	3,38 (n=5)	CIP-D ₈
FLX	0,0500	0,100	0,100-5,00	$a = 2,20 \times 10^{-1}$ $b = 2,19 \times 10^{-3}$ $r^2 = 0,984$	1/x ²	11,3	2,88 (n=5)	FLX-D ₆
NOR	5,00	10,0	10,0-200	$a = 5,14 \times 10^{-1}$ $b = -4,28 \times 10^{-2}$ $r^2 = 0,998$	NA	12,9	7,69 (n=5)	NOR-D ₅
VEN	0,0500	0,100	0,100-10,0	$a = 1,57$ $b = 1,54 \times 10^{-2}$ $r^2 = 0,997$	NA	8,76	4,18 (n=6)	VEN-D ₆

*a: intercepto, b: inclinação, r²: coeficiente de determinação **NA: não aplicado

*** Concentrações utilizados para os cálculos de precisão inter-dia em $\mu\text{g L}^{-1}$: CAF (curva 1)= 0,100; 3,00; 10,0 / CAF (curva 2)= 40,0; 100; 750 / CBZ= 0,100; 3,00; 10,0 / CIP= 5,00; 40,0; 100 / FLX= 0,100; 1,00; 5,00 / NOR= 10,0; 70,0; 200 / VEN= 0,100; 1,00; 10,0.

Fonte: autoria própria.

O efeito de matriz (EM) pode causar aumento ou supressão do sinal. Para determinar o efeito matriz na quantificação dos analitos, foi preparada uma solução padrão de 100 µg L⁻¹ contendo todos os analitos em solvente (água ultrapura) e no branco de amostras ambientais (esgoto lab-made). Ressalta-se ainda o uso dos padrões isotopicamente marcados para quantificação precisa e minimização do efeito da matriz ⁵³. Os valores do efeito da matriz para cada composto são mostrados na **Tabela 3.5**.

Tabela 3.5 - Efeito matriz observado para cada composto alvo em amostras de esgoto lab-made.

Analitos	Efeito matriz (%)
CAF	-26.6
NOR	-24.1
CIP	+14.8
VEN	-7.65
CBZ	-4.00
FLX	+3.47

Fonte: autoria própria.

De acordo com a diretriz SANTE ⁵⁴, o efeito da matriz na faixa de -20 % a +20 % é considerado insignificante. Conforme mostrado na tabela acima, CAF e NOR apresentaram significativo EM. O efeito de supressão de sinal foi observado para CAF, NOR, VEN e CBZ, enquanto um efeito de matriz positivo (aumento de sinal) foi observado para CIP e FLX.

O efeito de matriz variou entre os compostos estudados com FLX experimentando o menor efeito de matriz (+3,47 %) e CAF o maior efeito de matriz (-26,6 %). Embora os compostos de eluição iniciais parecessem experimentar um efeito de matriz mais alto do que aqueles que eluem mais tarde, o grau de supressão/intensificação era dependente das características individuais do composto como polaridade, taxa de ionização, afinidade para a fase móvel e/ou estacionária ^{9,55}.

Avaliando o efeito da matriz para 12 antibióticos e cafeína, Lima Gomes et al. (2015) ³⁴ usaram água ultrapura como referência para comparar com esgoto feito em laboratório realizando infusão de T e supressão de sinal observada para os compostos alvo que incluíram CAF, NOR e CIP.

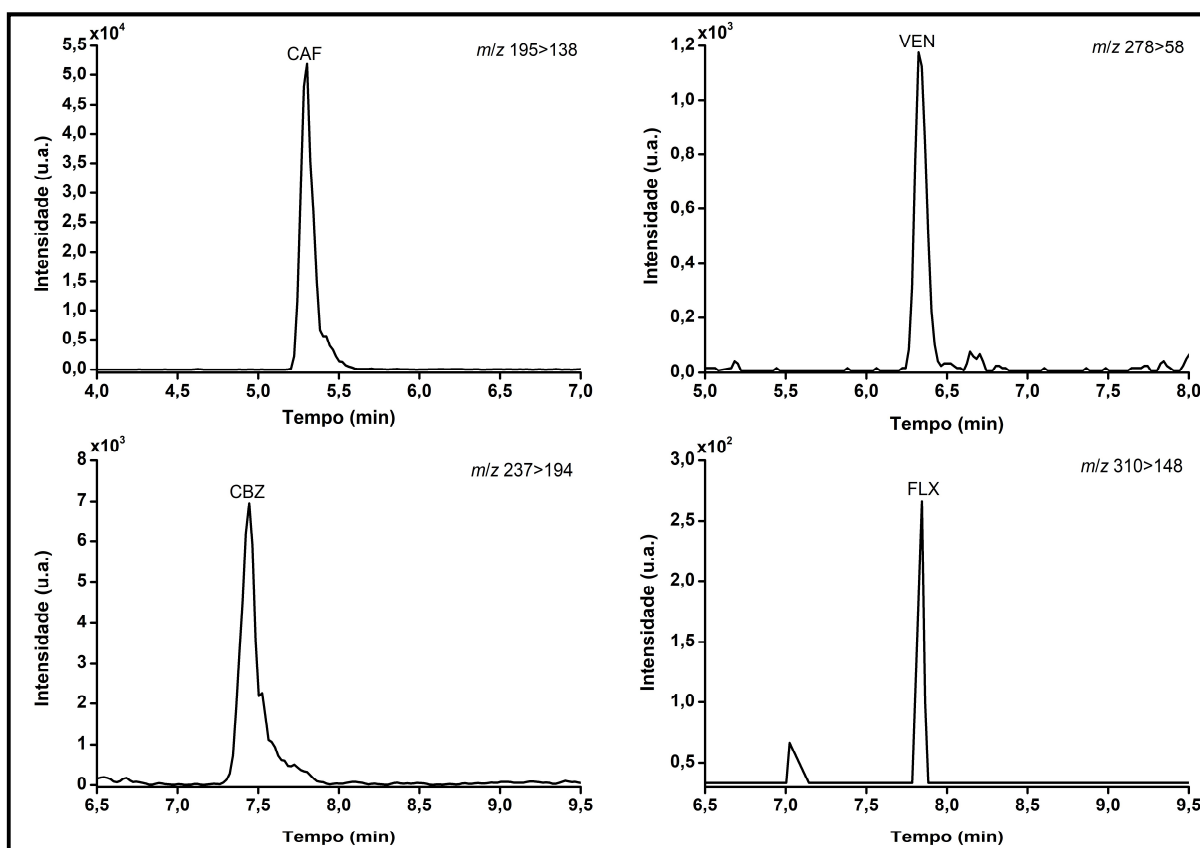
3.4.3 Aplicação nas amostras

Após a validação do método analítico, 20 amostras de efluentes, de diferentes meses, foram analisadas para avaliar a adequação do método. Análises de pH e condutividade das amostras podem ser encontradas na **Tabela 2.6** da seção 2.4.3.1 do capítulo 2. É importante

ressaltar que as amostras foram analisadas in natura, sem ajuste de pH ou outro tratamento físico-químico, apenas submetidas a uma filtração quando necessário.

Nas amostras ambientais analisadas, os sinais de todos os compostos detectados estavam bem acima do valor sinal-ruído necessário de 10 (LQ), exceto para FLX em duas amostras (afluente das ETEs A/B em janeiro com valores de 8,5 e 7,5, respectivamente) e VEN em três amostras (efluente da ETE A em setembro, dezembro e janeiro com relação sinal-ruído de 9 a 9,5). Os resultados obtidos são apresentados na **Tabela 3.6**, podendo-se observar que todas as amostras continham pelo menos um dos compostos alvo; exceção para amostra de efluente de novembro na ETE A. A **Figura 3.2** mostra um exemplo de cromatograma extraído para compostos detectados nas amostras analisadas.

Figura 3.2 - Cromatograma de íons extraídos (XIC) de amostra de água residuária: CAF (195>138), VEN (278>58), CBZ (237>194), and FLX (310>148).



Fonte: autoria própria.

Além disso, existem algumas amostras que contêm mais de um composto, como o afluente e o efluente coletado em janeiro para a ETE A que contém três (CAF, CBZ e FLX) dos seis compostos alvo.

Tabela 3.6 - Concentrações de compostos farmacêuticos ($\mu\text{g L}^{-1}$) e relação sinal/ruído (S/N), entre parênteses, obtidas através da análise de afluente e efluente das ETEs A e B.

Ponto de amostragem: ETE A										
Analitos/Meses	Setembro		Outubro		Novembro		Dezembro		Janeiro	
	A*	E*	A	E	A	E	A	E	A	E
CAF	108 (135)	0,73 (10)	211 (159)	10,1 (15,1)	<LQ	<LQ	150 (134)	10,2 (18,5)	136 (139,4)	9,62 (17,5)
NOR	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
CIP	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
VEN	NQ	0,66 (9)	NQ	9,60 (11,5)	0,23 (10,7)	<LQ	NQ	9,40 (9)	NQ	6,09 (9,5)
CBZ	<LQ	<LQ	0,88 (12,5)	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,19 (11,6)	<LQ
FLX	1,31 (10,5)	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,80 (8,5)	<LQ

Ponto de amostragem: ETE B										
Analitos/Meses	Outubro		Novembro		Dezembro		Janeiro		Fevereiro	
	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E
CAF	364 (157)	6,60 (18,3)	267 (131)	2,27 (14)	392 (106)	<LQ	238 (41,5)	<LQ	191 (145,6)	1,33 (14,5)
NOR	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
CIP	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
VEN	NQ	4,24 (17,5)	NQ	1,60 (11,5)	NQ	0,38 (11)	NQ	0,47 (10)	NQ	1,03 (10,5)
CBZ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
FLX	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	1,04 (7,5)	<LQ	<LQ	<LQ

*A: afluente; E: efluente.

NQ: não quantificado (os valores encontram-se acima da faixa linear estabelecida para o analito).

Fonte: autoria própria.

Os demais resultados obtidos na análise do esgoto doméstico coletado em São Carlos e do efluente hospitalar do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto podem ser visualizados na **Tabela 3.7**.

Tabela 3.7 - Concentrações de compostos farmacêuticos ($\mu\text{g L}^{-1}$) obtidas através da análise de esgoto doméstico (São Carlos, SP, Brasil) e efluente hospitalar (HCRP, Ribeirão Preto, SP, Brasil).

Analitos	Ponto de coleta	
	São Carlos	HCRP
CAF	0,75	4,05
NOR	< LQ	< LQ
CIP	< LQ	7,66
VEN	0,67	2,68
CBZ	0,49	0,10
FLX	ND*	ND

*ND: analito não detectado nas amostras

Analisando os resultados acima notamos que a CAF foi o composto mais amplamente detectado, sendo encontrado em 18 das 20 amostras em concentrações variando de 0,73 a 211 $\mu\text{g L}^{-1}$ na ETE A e de 1,33 a 392 $\mu\text{g L}^{-1}$ na ETE B. Em estudos anteriores, Ferreira (2005) determinaram CAF entre 134 a 147 ng L^{-1} na Bacia da Guanabara (Rio de Janeiro, Brasil) e 160 a 357 $\mu\text{g L}^{-1}$ na Bacia da Leopoldina (Rio de Janeiro, Brasil) ⁵⁶. O mesmo composto foi avaliado por Lima Gomes et al. (2015) ³⁴ em esgoto antes do tratamento em reator anaeróbio e a maior concentração determinada foi de 964 $\mu\text{g L}^{-1}$.

CBZ também foi detectado em 2 das 20 amostras, especificamente na ETE A, visto que na ETE B a concentração estava abaixo do LQ. Para uma ETE A, a concentração de CBZ variou de 0,19 a 0,88 $\mu\text{g L}^{-1}$. Da mesma forma, o FLX foi detectado em 3 das 20 amostras, com concentrações variando de 0,80 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 1,04 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a ETE B em amostras afluentes, e uma concentração de 1,31 $\mu\text{g L}^{-1}$ na amostra afluente de ETE A em setembro.

Biel-Maeso et al. (2018) ⁵⁷ avaliaram a ocorrência e distribuição de 78 compostos farmacêuticos em uma ETE de Jerez de la Frontera, cuja água tratada foi despejada no Golfo de Cádiz, Espanha. Para o afluente, os valores de concentração encontrados foram 82844 ng L^{-1} , 338 ng L^{-1} e 2831 ng L^{-1} para CAF e CBZ, respectivamente. Nas amostras de efluentes, os maiores valores de concentração encontrados para os mesmos fármacos foram 186 ng L^{-1} para CAF e 329 ng L^{-1} para CBZ. Neste estudo, para os mesmos compostos, as concentrações mais elevadas das amostras afluentes na ETE A foram 211 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 392 $\mu\text{g L}^{-1}$ na ETE B para CAF.

Para as amostras de efluentes, os maiores valores de concentração encontrados nas ETEs A e B foram, respectivamente, $0,73 \mu\text{g L}^{-1}$ e $1,33 \mu\text{g L}^{-1}$ para CAF. Em relação à CBZ, detectadas apenas amostras afluentes da ETE A nos meses de outubro e janeiro, as concentrações encontradas foram de $0,88$ e $0,19 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Esses níveis de concentração mostram que os valores encontrados estão próximos aos de estudos anteriores. A **Tabela 3.8** mostra os resultados obtidos por outros estudos para os compostos alvo.

Tabela 3.8 - Ocorrência dos compostos alvo em amostras de águas residuárias.

Analito	Matriz	Localização	Concentração (ng L ⁻¹)	Referência	Presente estudo (ng L ⁻¹) *	
					A	E
CAF	Água de rio	Brasil	129585	Campanha et al. (2015) ⁵⁸	228000	5840
	Água de rio	Brasil	47500	Gonçalves et al. (2017) ⁵⁹		
	Água de rio	Brasil	1040	Sposito et al. (2018) ⁶⁰		
NOR	Água de rio	Irã	6800	Chen et al. (2018) ⁶¹	BLQ	BLQ
CIP	Afluente	Espanha	613	Gros et al. (2013) ⁴⁵	BLQ	BLQ
VEN	Água residuária	Canadá	> 500	Metcalf et al. (2010) ⁶²	NQ**	3720
	Água residuária	China	132	Ma et al. (2018) ⁶³		
CBZ	Água residuária não tratada	Canadá	356	Miao et al. (2005) ⁶⁴	535	BLQ
FLX	Efluente	Portugal	16,4	Paíga et al. (2016) ⁶⁵	1050	BLQ

*Os valores de concentração expressados são uma média de todas as amostras descritas na **Tabela 3.6**.

** Detectado apenas em uma amostra (ETE A, no mês de novembro), ver nota na **Tabela 3.6**.

BLQ: abaixo do limite de quantificação; NQ: não quantificado.

Fonte: autoria própria.

NOR e CIP não foram quantificados em nenhuma das amostras analisadas, enquanto FLX foi quantificado apenas em 3 amostras analisadas. A VEN foi detectada em 10 das 20 amostras, com concentrações detectadas na faixa linear estabelecida variando de $9,60 \mu\text{g L}^{-1}$ a $0,23 \mu\text{g L}^{-1}$. Em termos comparativos, tomemos a FLX como exemplo (**Tabela 3.9**).

Tabela 3.9 - Comparação entre os métodos desenvolvidos em água ultrapura para a FLX.

Critérios	Coluna pré-concentração	
	OASIS HLB	RAM
Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,01-5	0,1-5
Inclinação (b)	$4,07 \times 10^{-4}$	$5,00 \times 10^{-4}$
LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,001	0,05
LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,01	0,1
As	1,8	1,3
Tf	1,77	-
EM (%)	+44,08	+3,47
Precisão inter-dia (%)	10,9	14,1
Precisão intra-dia (%)	9,14	5,22
Tempo de análise (min)	24	16

Fonte: autoria própria.

Dos critérios estabelecidos e demonstrados pela tabela acima, notamos que os limites de quantificação e detecção obtidos com o uso do cartucho OASIS HLB foram superiores aos obtidos com a utilização da coluna RAM, o que é demonstrado pela faixa linear mais ampla, permitindo que o método, apesar de ser 8 min mais longo que o segundo e apresentar maior interferência de matriz, seja capaz de atingir níveis de concentração menores. Em termos de precisão, ambos os métodos se demonstraram precisos para o objetivo do trabalho e em concordância com as normativas de validação.

Ressaltamos que não é o escopo do trabalho julgar ou escolher qual método possa ser considerado melhor ou superior, mas sim, expor as vantagens e desvantagens apresentadas por cada um e contribuir para o desenvolvimento de estratégias analíticas que auxiliem na determinação de contaminantes emergentes em matrizes ambientais aquática, cabendo ao analista/pesquisador escolher a estratégia que melhor se adapta ao seu objetivo.

O método automatizado acoplado ao sistema UHPLC-MS/MS utilizando column switching permitiu um grande progresso na análise de amostras aquosas ambientais, especialmente para contaminantes emergentes. Esta abordagem provou ser precisa com tempo de análise reduzido, consumo de solvente e geração mínima de resíduo químico, sem perda na resposta analítica ou risco de entupimento.

A fase de extração de RAM apresenta baixo custo, em torno de U\$ 130,00 (considerando o custo da quantidade necessária de fase suporte, albumina sérica bovina, glutaraldeído e borohidreto de sódio para modificação de RAM, exceção para hardware). Comparando a fase RAM feita em laboratório com cartuchos SPE on-line e colunas RAM vendidas comercialmente (estimado em cerca de R\$ 3.500,00), a fase RAM feita em laboratório apresenta um custo entre cinco e seis vezes menor, respectivamente, resultando em redução do custo final por análise.

3.5 CONCLUSÃO

Neste estudo, um método on-line RAM-UHPLC-MS/MS automatizado, simples e sensível foi desenvolvido e otimizado para determinar compostos farmacêuticos em amostras de águas residuárias em níveis de ng L^{-1} e $\mu\text{g L}^{-1}$. Figuras de mérito para validação do método como linearidade, precisão intra-dia e inter-dia, LD, LQ foram avaliadas e apresentaram concordância com os padrões de validação exigidos internacionalmente, bem como correção do efeito da matriz utilizando os padrões marcados com isótopos.

O método desenvolvido foi aplicado em amostras de águas residuárias e, exceto para NOR e CIP, os demais analitos de interesse foram detectados em pelo menos uma das amostras, representando risco potencial à saúde humana e ao meio ambiente.

O tratamento da amostra on-line demandou apenas filtração prévia, tendo uma manipulação mínima da amostra, baixo consumo de amostra e de solvente, e reduzido tempo de análise. O tempo total de execução foi de 16 min, processando aproximadamente 4 amostras por hora, incluindo preparo e análise cromatográfica. Além disso, o método proposto mostrou-se de baixo custo, visto que a coluna modificada em laboratório apresenta custo estimado em cinco a seis vezes menor do que as fases vendidas comercialmente.

REFERÊNCIAS

- (1) CHINNAIYAN, P. et al. Pharmaceutical products as emerging contaminant in water: relevance for developing nations and identification of critical compounds for Indian environment. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 190, n. 5, p. 288, 2018.
 - (2) GOVERNMENT ACCOUNTABILITY OFFICE (GAO). **Toxic Chemicals-High Risk Issue**. Disponível em: https://www.gao.gov/key_issues/toxic_chemicals/issue_summary. Acesso em: 6 jan. 2020.
 - (3) QUESADA, H. B. et al. Surface water pollution by pharmaceuticals and an alternative of removal by low-cost adsorbents: A review. **Chemosphere**, v. 222, p. 766–780, 2019.
 - (4) MARASCO JÚNIOR, C. A.; LUCHIARI, N. D. C.; LIMA GOMES, P. C. F. Occurrence of caffeine in wastewater and sewage and applied techniques for analysis: a review. **Eclética Química Journal**, v. 44, n. 4, p. 11, 2019.
 - (5) SILVA, C. G. A. DA; COLLINS, C. H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 665–676, 2011.
 - (6) MATTAROZZI, M.; CARERI, M. Liquid Chromatography/Mass Spectrometry in Environmental Analysis. In: MEYERS, R. A. (Ed.). **Encyclopedia of Analytical Chemistry**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2015. p. 1–41.
 - (7) LOOS, G.; VAN SCHEPDAEL, A.; CABOOTER, D. Quantitative mass spectrometry methods for pharmaceutical analysis. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 374, n. 2079, 2016.
 - (8) PÉREZ-FERNÁNDEZ, V. et al. Recent advancements and future trends in environmental analysis: Sample preparation, liquid chromatography and mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 983, p. 9–41, 2017.
 - (9) AXEL, M. et al. An online SPE LC-MS/MS method for the analysis of antibiotics in environmental water. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 9, p. 8692–8699, 2017.
 - (10) GUSMAROLI, L.; INSA, S.; PETROVIC, M. Development of an online SPE-UHPLC-MS/MS method for the multiresidue analysis of the 17 compounds from the EU “Watch list”. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, n. 17, p. 4165–4176, 2018.
 - (11) PAVLOVIĆ, D. M. et al. Sample preparation in analysis of pharmaceuticals. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 11, p. 1062–1075, 2007.
 - (12) RIBEIRO, C. et al. New Trends in Sample Preparation Techniques for Environmental Analysis. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 44, n. 2, p. 142–185, 2014.
 - (13) YAMAMOTO, E. Restricted Access Media: Solid-Phase Extraction. In: **Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering**. Elsevier, 2015.
-

- (14) MONTESDEOCA-ESPONDA, S.; SOSA-FERRERA, Z.; SANTANA-RODRÍGUEZ, J. J. On-line solid-phase extraction coupled to ultra-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry detection for the determination of benzotriazole UV stabilizers in coastal marine and wastewater samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 403, n. 3, p. 867–876, 2012.
- (15) ZHONG, M. et al. Automated online solid-phase extraction liquid chromatography tandem mass spectrometry investigation for simultaneous quantification of per- and polyfluoroalkyl substances, pharmaceuticals and personal care products, and organophosphorus flame retardants in environmental waters. **Journal of Chromatography A**, v. 1602, p. 350–358, 2019.
- (16) ANDRADE-EIROA, A. et al. Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I). **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 80, p. 641–654, 2016.
- (17) ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Method 1694: Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/MS/MS**. 2007.
- (18) BUSZEWSKI, B.; SZULTKA, M. Past, Present, and Future of Solid Phase Extraction: A Review. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 42, n. 3, p. 198–213, 2012.
- (19) FAGUNDES, V. F. et al. Rapid and direct analysis of statins in human plasma by column-switching liquid chromatography with restricted-access material. **Journal of Chromatography B**, v. 947–948, p. 8–16, fev. 2014.
- (20) SADÍLEK, P.; ŠATÍNSKÝ, D.; SOLICH, P. Using restricted-access materials and column switching in high-performance liquid chromatography for direct analysis of biologically-active compounds in complex matrices. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 5, p. 375–384, 2007.
- (21) DE FARIA, H. D. et al. New advances in restricted access materials for sample preparation: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 959, p. 43–65, 2017.
- (22) GORDI, T. et al. Direct analysis of artemisinin in plasma and saliva using coupled-column high-performance liquid chromatography with a restricted-access material pre-column. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 742, n. 1, p. 155–162, 2000.
- (23) DE PAULA, F. C. C. R.; DE PIETRO, A. C.; CASS, Q. B. Simultaneous quantification of sulfamethoxazole and trimethoprim in whole egg samples by column-switching high-performance liquid chromatography using restricted access media column for on-line sample clean-up. **Journal of Chromatography A**, v. 1189, n. 1–2, p. 221–226, 2008.
- (24) OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B. Evaluation of Liquid Chromatographic Behavior of Cephalosporin Antibiotics Using Restricted Access Medium Columns for On-line Sample Cleanup of Bovine Milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 4, p. 1180–1187, 2006.
-

- (25) CHICO, J. et al. Restricted access materials for sample clean-up in the analysis of trace levels of tetracyclines by liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1181, n. 1–2, p. 1–8, 2008.
- (26) MENEZES, M. L.; FÈLIX, G. On Line Extraction and Separation of Bendiocarb, Methomyl, Methylparathion, and Pentachlorophenol Pesticides from Raw Milk. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 21, n. 18, p. 2863–2871, 1998.
- (27) SANTOS NETO, A. J. et al. Automated microcolumn-switching system for drug analysis by direct injection of human plasma. **Journal of Chromatography A**, v. 1105, n. 1–2, p. 71–76, 2006.
- (28) AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017. Guia para validação de métodos analíticos - Julho, 2017.** Disponível em: http://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/19194581/do1-2017-07-25-resolucao-rdc-n-166-de-24-de-julho-de-2017-19194412.
- (29) INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). **Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos - DOC - CGCRE - 008.** 2018. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_07.pdf.
- (30) INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY (IUPAC). **Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis.** v. 74, n. 5, p. 835–855, 2002.
- (31) INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE (ICH). **Validation of analytical procedures: Text and methodology.** 2010. Disponível em: <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>.
- (32) FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics.** 2015. Disponível em: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/analytical-procedures-and-methods-validation-drugs-and-biologics>.
- (33) GÓMEZ-RAMOS, M. DEL M. et al. The evaluation of matrix effects in pesticide multi-residue methods via matrix fingerprinting using liquid chromatography electrospray high-resolution mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 8, n. 23, p. 4664–4673, 2016.
- (34) LIMA GOMES, P. C. F. et al. Rapid determination of 12 antibiotics and caffeine in sewage and bioreactor effluent by online column-switching liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 29, p. 8787–8801, 2015.
-

- (35) MARTINS, G. S. et al. Removal of sulfamethoxazole and trimethoprim using horizontal-flow anaerobic immobilized bioreactor. **Scientia Chromatographica**, v. 9, n. 4, p. 253–264, 2017.
- (36) DETHY, J.-M. et al. Demonstration of Direct Bioanalysis of Drugs in Plasma Using Nanoelectrospray Infusion from a Silicon Chip Coupled with Tandem Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 4, p. 805–811, 2003.
- (37) CLOUSER-ROCHE, A. et al. Beyond pass/fail: A procedure for evaluating the effect of carryover in bioanalytical LC/MS/MS methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, n. 1, p. 146–155, 2008.
- (38) FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Bioanalytical Method Validation: Guidance for Industry**. 2018. Disponível em: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry>.
- (39) INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE (ICH). **Draft Bioanalytical Method Validation M10**. 2019. Disponível em: <https://www.ich.org/page/multidisciplinary-guidelines>.
- (40) CHOI, D. Y.; ROW, K. H. Theoretical analysis of chromatographic peak asymmetry and sharpness by the moment method using two peptides. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 9, n. 6, p. 495–499, 2004.
- (41) CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH (CDER). **Reviewer guidance: validation of chromatographic methods**. 1994. Disponível em: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/reviewer-guidance-validation-chromatographic-methods>.
- (42) YUWONO, M.; INDRAYANTO, G. Validation of Chromatographic Methods of Analysis. In: **Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology**. Elsevier, 2005. v. 32, p. 243–259.
- (43) SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, v. 987, n. 1-2, p. 57-66, 2003.
- (44) LÓPEZ-SERNA, R. et al. Fully automated determination of 74 pharmaceuticals in environmental and waste waters by online solid phase extraction–liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 83, n. 2, p. 410–424, 2010.
- (45) GROS, M.; RODRÍGUEZ-MOZAZ, S.; BARCELÓ, D. Rapid analysis of multiclass antibiotic residues and some of their metabolites in hospital, urban wastewater and river water by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1292, p. 173–188, 2013.
-

- (46) POZO, O. J. et al. Efficient approach for the reliable quantification and confirmation of antibiotics in water using on-line solid-phase extraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1103, n. 1, p. 83–93, 2006.
- (47) TAGIRI-ENDO, M. et al. Rapid determination of five antibiotic residues in swine wastewater by online solid-phase extraction–high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, n. 4, p. 1367–1375, 2009.
- (48) GARCIA-AC, A. et al. On-line solid-phase extraction of large-volume injections coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the quantitation and confirmation of 14 selected trace organic contaminants in drinking and surface water. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 48, p. 8518–8527, 2009.
- (49) LIU, R. et al. Determination of nine benzotriazole UV stabilizers in environmental water samples by automated on-line solid phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 120, p. 158–166, 2014.
- (50) HEUETT, N. V. et al. Analysis of drugs of abuse by online SPE-LC high resolution mass spectrometry: Communal assessment of consumption. **Science of the Total Environment**, v. 511, p. 319–330, 2015.
- (51) VALSECCHI, S. et al. On-line sample extraction and purification for the LC–MS determination of emerging contaminants in environmental samples. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 8, p. 27–37, 2015.
- (52) FERRER-AGUIRRE, A. et al. Simple and quick determination of analgesics and other contaminants of emerging concern in environmental waters by on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1446, p. 27–33, 2016.
- (53) GRACIA-LOR, E.; SANCHE, J. V.; HERNÁNDEZ, F. Multi-class determination of around 50 pharmaceuticals, including 26 antibiotics, in environmental and wastewater samples by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 16, p. 2264–2275, 2011.
- (54) EC-EUROPEAN COMMISSION DOCUMENT N° SANTE/11813/2017. **Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed**. Disponível em: <https://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/tmpl_article.asp?CntID=727>. Acesso em: 15 abr. 2020.
- (55) MILHOME, M. A. L. et al. Multiresidue analysis and evaluation of the matrix effect on 20 pesticides in Brazilian maize (*Zea mays* L.) flour. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 54, n. 11, p. 892–897, 2019.
- (56) FERREIRA, A. P. Caffeine as an environmental indicator for assessing urban aquatic ecosystems. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, n. 6, p. 1884–1892, 2005.
-

- (57) BIEL-MAESO, M. et al. Occurrence, distribution and environmental risk of pharmaceutically active compounds (PhACs) in coastal and ocean waters from the Gulf of Cadiz (SW Spain). **Science of the Total Environment**, v. 612, p. 649–659, 2018.
- (58) CAMPANHA, M. B. et al. A 3-year study on occurrence of emerging contaminants in an urban stream of São Paulo State of Southeast Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 7936–7947, 2015.
- (59) GONÇALVES, E. S.; RODRIGUES, S. V.; SILVA-FILHO, E. V. DA. The use of caffeine as a chemical marker of domestic wastewater contamination in surface waters: seasonal and spatial variations in Teresópolis, Brazil. **Ambiente e Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 12, n. 2, p. 192–202, 2017.
- (60) SPOSITO, J. C. V. et al. Emerging contaminants in Brazilian rivers: Occurrence and effects on gene expression in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Chemosphere**, v. 209, p. 696–704, 2018.
- (61) CHEN, H. et al. Characterization of antibiotics in a large-scale river system of China: Occurrence pattern, spatiotemporal distribution and environmental risks. **Science of the Total Environment**, v. 618, p. 409–418, 2018.
- (62) METCALFE, C. D. et al. Antidepressants and their metabolites in municipal wastewater, and downstream exposure in an urban watershed. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, n. 1, p. 79–89, 2010.
- (63) MA, L. et al. Occurrence and source analysis of selected antidepressants and their metabolites in municipal wastewater and receiving surface water. **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 20, n. 7, p. 1020–1029, 2018.
- (64) MIAO, X.-S.; YANG, J.-J.; METCALFE, C. D. Carbamazepine and Its Metabolites in Wastewater and in Biosolids in a Municipal Wastewater Treatment Plant. **Environmental Science & Technology**, v. 39, n. 19, p. 7469–7475, 2005.
- (65) PAÍGA, P. et al. Presence of pharmaceuticals in the Lis river (Portugal): Sources, fate and seasonal variation. **Science of the Total Environment**, v. 573, p. 164–177, 2016.
-

Capítulo 4

**UMA ABORDAGEM RÁPIDA E ALTERNATIVA PARA
DETECTAR COMPOSTOS DE EXPOSIÇÃO
AMBIENTAL UTILIZANDO MRM-PROFILING PARA
ANÁLISE EXPLORATÓRIA EM AMOSTRAS
BIOLÓGICAS**

4 UMA ABORDAGEM RÁPIDA E ALTERNATIVA PARA DETECTAR COMPOSTOS DE EXPOSIÇÃO AMBIENTAL UTILIZANDO MRM-PROFILING PARA ANÁLISE EXPLORATÓRIA EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

4.1 INTRODUÇÃO

O exposoma faz parte das ciências da saúde ambiental e é definido como a totalidade das exposições ambientais experimentadas pelos indivíduos ao longo de suas vidas e o impacto dessas exposições na suscetibilidade a doenças crônicas ¹⁻³.

O principal objetivo da pesquisa consiste em avaliar e identificar exposições a produtos químicos, sendo que a exposição ambiental a produtos químicos resulta em respostas biológicas diversas ^{4,5}. Como exemplo, podemos considerar a cafeína e a cotinina. A cafeína é rapidamente absorvida pelo sistema gastrointestinal, mas aproximadamente 5 % da cafeína não é metabolizada e é excretada na urina ⁶. Já a cotinina tem um metabolismo lento e persiste no corpo por cerca de 16 horas, demonstrado pelo fato de que altas concentrações séricas (ca. 500 ng L⁻¹) podem ser detectadas em fumantes ativos ⁷.

A Environmental Protection Agency (EPA) tem realizado grandes esforços para testar, estudar e registrar produtos químicos atualmente consumidos pela população ou acumulados no meio ambiente, na tentativa de garantir um uso saudável e seguro por meio da TSCA (Toxic Substances Control Act) ⁸. Porém, cerca de 1500 novos produtos químicos são inseridos no meio ambiente a cada ano e isso supera a velocidade dos estudos e a capacidade das técnicas e ferramentas atuais de detectá-los na mesma velocidade em que são introduzidos ⁹. Sob este ponto de vista, o NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health) tem direcionado sua pesquisa em fornecer informações cada vez mais detalhadas e precisas entre a exposição a uma substância e o possível efeito causado.

Para tanto, a pesquisa de exposoma está estritamente ligada ao uso de métodos analíticos avançados, como a espectrometria de massas (MS), que permite a detecção simultânea de uma ampla gama de compostos químicos. A técnica MRM-profiling pode ser uma técnica exploratória potencial para análise de exposoma, visto que é uma estratégia que economiza tempo de instrumento em comparação com os métodos convencionais, como análises de LC-MS/MS, é rápida e sensível e utiliza a introdução direta da amostra, sendo a separação cromatográfica reservada para uma etapa final de validação/confirmação estrutural, se necessária. As aplicações da técnica incluem a identificação de bactérias que desenvolveram resistência a medicamentos ¹⁰, perfil de lipídios epidérmicos em um modelo de dermatite em camundongo ¹¹, avaliação das alterações metabólicas nos eritrócitos após o consumo de

amêndoas ¹² e caracterização do tecido adiposo peri-ovariano ¹³. Também foi integrado com proteômica na análise da nanopartículas de ouro biocorona em populações saudáveis e obesas ¹⁴, entre outros estudos ¹⁵⁻¹⁷.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O objetivo inicial deste estudo é apresentar uma estratégia exploratória simples e informativa para ser aplicada à análise exploratória de produtos químicos ambientais existentes e novos. Para isso, foram selecionados 310 MRMs (235 no modo positivo e 75 no modo negativo) relacionados a 87 compostos de exposoma utilizados para analisar um total de 12 amostras de urina humana. Os MRMs apresentando intensidade de íons igual ou 30% maior que o branco em pelo menos em uma das amostras foram selecionados para aquisição de dados de varredura de íons produto (product ion scan). Íons produto esperados para metformina, metoprolol, acetaminofeno, acrilamida e paraxantina foram observados e orientaram a validação estrutural adicional por LC-MS/MS.

4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

4.3.1 Preparo de amostra

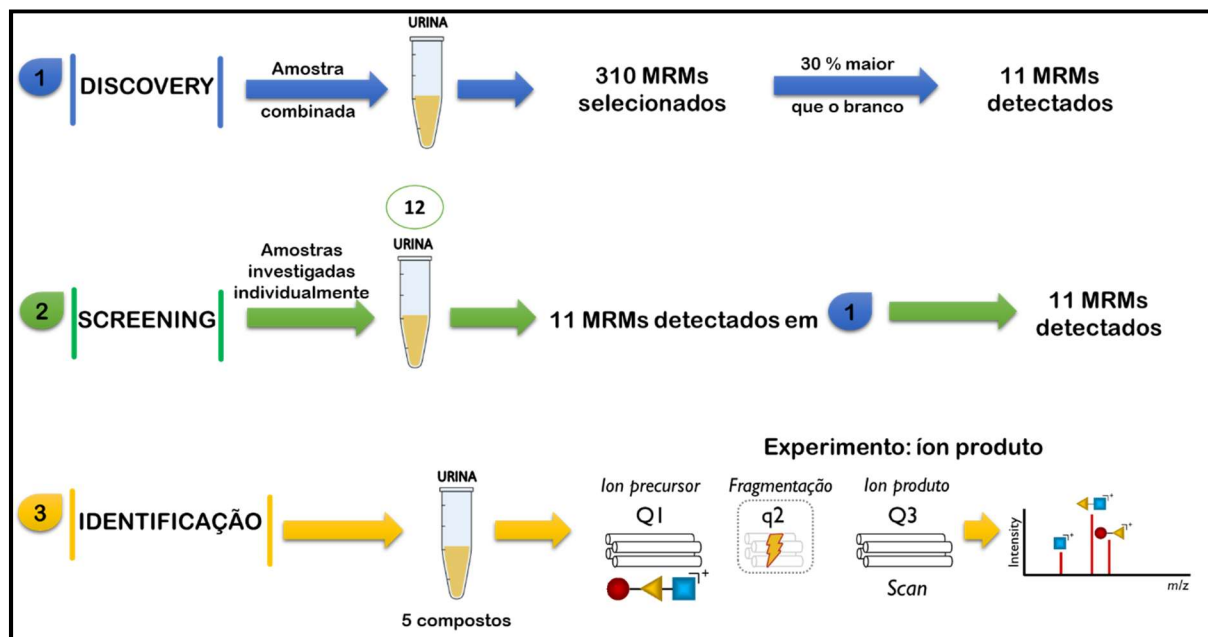
Amostras de urina humana (n = 12) foram fornecidas a partir de um ambiente clínico de colaboradores da Indiana University. As amostras foram preparadas de acordo com o protocolo Bligh-Dyer ¹⁸ e os experimentos foram realizados utilizando a fase polar. Após secagem em centrifuga a vácuo por cerca de 12 horas, os extratos das amostras de urina foram redissolvidos em 200 µL de H₂O:ACN (95:5) com 0,1 % de ácido fórmico. Para as injeções, uma solução estoque foi diluída em solvente de injeção ACN/MeOH/NH₄Ac 300mM 3:6,65:0,35 (v/v/v) 200x para amostras de urina para realizar os experimentos de MRM-profiling e varredura de íons produto.

4.3.2 Fundamentação da técnica MRM-profiling para análise de exposoma

MRM-profiling é uma metodologia de MS que envolve dois estágios. Primeiro, usamos uma lista de 310 MRMs relacionados a 87 compostos de exposoma, que encontram-se listados no **Apêndice A**, encontrados no banco de dados METLIN ¹⁹ e na literatura ²⁰⁻⁴³ para rastrear a amostra de urina combinada. Esses MRMs foram selecionados usando uma gama de configurações de energia de colisão (15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 V). Em seguida, como segunda fase, selecionamos os MRMs de intensidade igual ou 30 % maior que a amostra em branco para

a triagem de 12 amostras de urina humana. Como uma etapa final da análise exploratória, os compostos relacionados para os MRMs com a maior intensidade de íons na fase anterior foram selecionados para experimentos de varredura de íons produto a fim de obter evidências estruturais da presença dos compostos nas amostras. O fluxo de trabalho do estudo pode ser visualizado na **Figura 4.1**.

Figura 4.1 - Visão geral do arranjo experimental realizado para as amostras de urina humana (310 MRMs selecionados para analisar 12 amostras de urina humana).



Fonte: autoria própria.

Na primeira fase (discovery), 11 MRMs apresentaram sinal igual ou 30 % superior ao da amostra em branco nas amostras de urina humana. Em seguida, as amostras foram analisadas, individualmente, na segunda fase (screening) de acordo com os MRMs selecionados na fase anterior e os 11 MRMs para as amostras de urina mostraram-se 30 % maiores que o branco. Na etapa de identificação, foi realizada a varredura de íons produto para esses MRMs, referentes a 5 compostos (metformina, metoprolol, acetaminofeno, acrilamida e paraxantina) para as amostras de urina, cujos resultados sugeriram a presença destes cinco compostos nas amostras.

Os experimentos foram realizados usando um espectrômetro de massa triplo quadrupolo, Agilent QQQ 6410 (Santa Clara, CA), equipado com amostrador automático Agilent G1367A 1100 series (Santa Clara, CA). As amostras foram introduzidas no espectrômetro de massas por injeção de fluxo direto ESI, ou seja, sem separação cromatográfica. A voltagem na fonte ESI era de 4,0 kV, com *dwell time* de 25 ms. A energia de

colisão (CE) foi otimizada na primeira fase do método e 25 V para a amostra de urina foi escolhida como a melhor CE para realizar os experimentos de triagem e identificação.

Para realização das duas primeiras etapas, 8 μL de amostra foram injetados a um fluxo de 10 $\mu\text{L min}^{-1}$. Os solventes de diluição de amostra e as concentrações foram baseados em um estudo de otimização para definir a diluição e concentração de amostra apropriada para aquisição de dados (dados não mostrados). Amostras de controle de qualidade (Equisplash Mix®, Avanti, contendo 1,2 ng de lipídio) foram usadas para monitorar o desempenho do instrumento. Para limpeza do sistema entre as injeções, 8 μL de solvente de mistura de metanol:água (50:50 v/v) foi utilizada.

Após a aquisição de dados, as transições que se apresentaram pelo menos 30 % maiores nas contagens de íons do que as amostras em branco foram selecionadas. Outros valores de limites ou critérios de filtragem de dados poderiam ter sido empregados, mas a compensação entre as informações químicas e o tempo total do instrumento necessário teve um efeito no próximo estágio, portanto, optamos por ser conservadores para evitar a perda de informações químicas. Além disso, como foram utilizadas amostras representativas, manter mais transições é benéfico para reter o máximo possível de informações químicas.

No total, das 310 transições relacionadas a 87 compostos de exposoma, das quais 235 estavam no modo positivo de ionização e 75 no modo negativo. Desta lista de trabalho, 11 transições resultaram da primeira etapa para a amostra combinada de urina humana.

Essa lista serviu como um conjunto de candidatos para a construção de métodos MRM para o próximo estágio (screening). As transições selecionadas foram então organizadas em 1 método MRM (em modo de ionização positivo) para investigar individualmente as amostras de urina usando os mesmos parâmetros de instrumento da fase anterior (discovery). Dado que o tempo de triagem para cada método é de 2 minutos, isso resulta em um tempo total de análise de 2 minutos para triagem de cada amostra de urina.

Como etapa final do método exploratório, ou seja, fase de identificação, realizamos as varreduras de íons produto (volume de injeção de 15 μL) para avaliar se um ou mais íons produto esperados estavam presentes nas amostras de urina, fornecendo um dado adicional para a presença desses compostos nas amostras. Para esta etapa, foram selecionados 5 compostos, que foram metformina (METF), metoprolol (METP), acetaminofeno (ACTM), acrilamida (ACRL) e paraxantina (PRXT).

4.3.3 Análise e tratamento de dados

Os sinais iônicos dos MRMs monitorados foram comparados aos sinais iônicos de um branco (solvente de injeção) e foram consideradas transições iguais ou 30 % maiores que o branco, na fase discovery e screening. Os compostos que atenderam ao requisito previamente estabelecido foram selecionados para o experimento de varredura de íons produto, e o perfil de fragmentação foi observado de acordo com as transições utilizadas para realização dos experimentos de MRM.

4.3.4 Validação de método por LC-MS/MS

4.3.4.1 Reagentes

Os padrões analíticos de METF, METP, ACTM e ACRL foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, EUA). O padrão PRXT foi adquirido na Cayman Chemical® (Ann Arbor, MI, EUA).

J.T. Baker® (Phillipsburg, NJ, EUA) forneceu acetonitrila (ACN) grau HPLC e ácido fórmico (88 %) usado como aditivo de eluente. A água foi purificada usando uma estação Simplicity UV da Merck® (Darmstadt, Hessen, DEU). Soluções estoque de 1 mg mL⁻¹ foram preparadas em metanol para ACTM e PRXT e em água para ACRL, METF e METP. As soluções foram armazenadas sob refrigeração (-20 °C) e diluições posteriores foram preparadas em água por demanda.

4.3.4.2 Condições espectrometria de massas

A detecção por espectrometria de massa foi realizada usando um espectrômetro de massas AB SCIEX 3200 QTRAP (Foster City, CA, EUA) equipado com uma fonte de ionização por electrospray (ESI) turbo V Ion Source.

Os parâmetros dependentes da fonte de ionização por electrospray foram otimizados por análise de injeção de fluxo (FIA), tais como: gás de cortina (CUR) 15 V, nitrogênio gás de colisão de médio (CAD), temperatura da fonte (TEM) 650 °C, voltagem do ion spray (IS) 5000 V, gás de nebulização (GS1) 40 psi e gás de secagem (GS2) 40 psi. A fase móvel utilizada foi água e acetonitrila (50:50 v/v) com ácido fórmico 0,1 % na vazão de 0,6 mL min⁻¹, com injeções de 20 µL de uma solução a 1 mg L⁻¹ contendo todos os analitos.

Parâmetros de detecção de espectrometria de massa, como potencial de decaimento (DP), energia de colisão (CE), potencial de entrada (EP), potencial de entrada da célula de colisão (CEP) e potencial de saída de célula de colisão (CXP) foram otimizados por infusão

direta de solução padrão de cada composto a uma concentração de 1 mg L⁻¹ com adição de 0,1 % de ácido fórmico para melhorar a ionização.

O espectrômetro de massas foi operado no modo de ionização positiva (ESI+) com monitoramento da reação selecionada (SRM). Para fins quantitativos, três transições SRM diferentes foram monitoradas para cada analito. As transições SRM e os parâmetros MS para detecção são mostrados na **Tabela 4.1**. A resolução no primeiro e terceiro quadrupolo (Q1 e Q3) foi definida como unitária e o atraso entre as varreduras foi de 5 ms. Todos os dados foram coletados e processados no software Analyst® 1.5.2.

Tabela 4.1 - Lista de compostos com íons precursores e produtos, bem como os parâmetros para detecção de MS e tempo de retenção (RT) usados para o método SRM.

Analitos	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	Dwell time (ms)	DP	EP	CEP	CE	CXP	Tempo de retenção (min)
METF	130	$\frac{71}{60}$	150	41.0	7.00	10.0	$\frac{25.0}{13.0}$	4.00	2.29
METP	268	$\frac{116}{77}$	200	41.0	7.50	8.00	$\frac{21.0}{75.0}$	4.00	9.55
ACTM	152	$\frac{110}{65}$	150	46.0	6.50	8.00	$\frac{23.0}{37.0}$	4.00	5.83
ACRL	72	$\frac{55}{44}$	200	31.0	6.50	10.0	$\frac{15.0}{21.0}$	4.00	3.32
PRXT	181	$\frac{124}{69}$	150	96.0	9.50	16.0	$\frac{33.0}{39.0}$	4.00	6.05

Fonte: autoria própria.

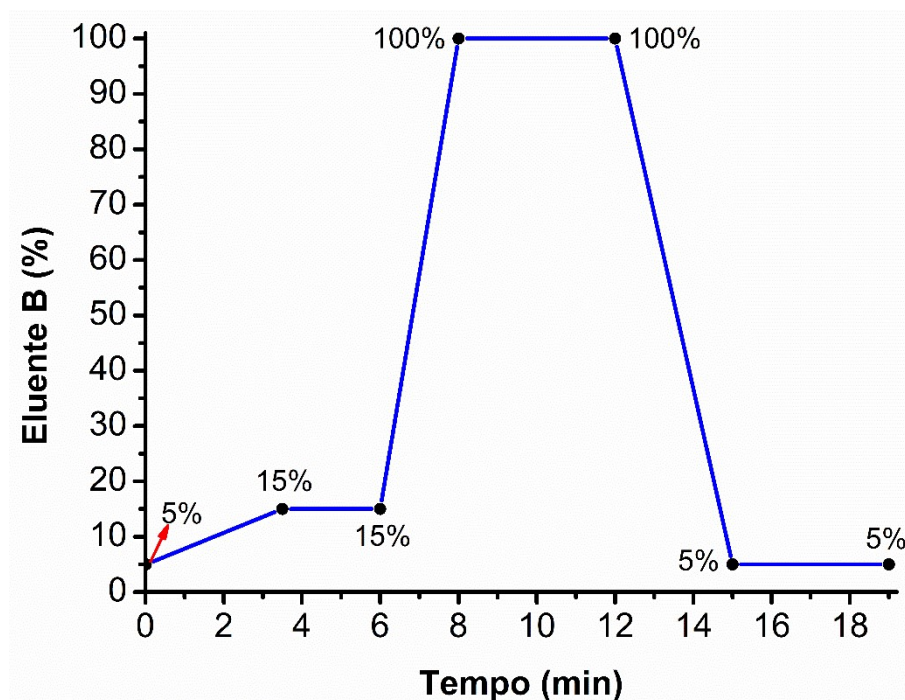
4.3.4.3 Análises por cromatografia líquida

A separação por cromatografia líquida foi realizada utilizando um sistema Shimadzu® Nexera X2 HPLC/UHPLC (Kyoto, JPN) equipado com duas bombas LC-30AD (modo de bombeamento de fluxo binário), integradas a uma unidade degaseificadora DGU-20A3R, amostrador automático SIL-30AC com injeção capacidade de 0,1 a 50 µL, e um compartimento de forno de coluna CTO-20A. Para completar o sistema modular, um controlador de sistema HPLC CBM-20A atua como interface para conectar a instrumentação à estação de trabalho do LC.

Phenomenex Kinetex® PFP 100 Å (150 × 4,6 mm, 5 µm) foi utilizada como coluna analítica na separação cromatográfica. A coluna analítica foi mantida a 40 °C no compartimento do forno de coluna. O volume de injeção adotado foi de 10 µL. Os eluentes foram água ultrapura

com 0,1 % de ácido fórmico (A) e acetonitrila com 0,1 % de ácido fórmico (B) em uma vazão de 0,6 mL min⁻¹. Uma eluição em modo gradiente foi empregada de acordo com a **Figura 4.2**.

Figura 4.2 - Programação de eluição de gradiente baseada no eluente B (acetonitrila com 0,1 % de ácido fórmico), com vazão de 0,6 mL min⁻¹, utilizada na separação cromatográfica de metformina, metoprolol, acetaminofeno, acrilamida e paraxantina.



Fonte: autoria própria.

A válvula do espectrômetro de massas foi mantida até 1,9 min direcionada para o descarte. De 2 min a 10,9 min, o fluxo do sistema foi direcionado para o espectrômetro de massas. A válvula retornou à sua posição inicial após 11 min, permanecendo nesta posição até o final da análise. Após cada conjunto de análise, o sistema foi lavado com eluentes da fase móvel e uma injeção de acetonitrila limpar as linhas e evitar efeito memória (carryover) no sistema.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1 MRM-profiling aplicado nas amostras de urina humana

O MRM-profiling foi aplicado em duas fases. Primeiro, uma lista de MRMs relacionados aos compostos de exposoma presentes no banco de dados METLIN e na literatura foi aplicada para investigar a amostra de urina combinada utilizando diferentes valores de energias de colisão. Em seguida, os MRMs de intensidade igual ou maior que 30 % em relação ao branco foram selecionados para investigação individual das amostras, cuja energia de colisão

escolhida foi aquela que forneceu maior número informações, ou seja, maior número de MRMs detectados.

Como etapa final da análise exploratória, os MRMs de maior intensidade foram selecionados para experimentos de varredura de íons produto, a fim de obter mais evidências da presença dos compostos nas amostras. Além disso, uma fase adicional de confirmação utilizando a validação LC-MS/MS foi realizada para confirmar a presença dos compostos apontados pelo MRM-profiling nas amostras, a fim de validar e garantir a confiabilidade do método.

Na fase discovery, 11 MRMs, apenas no modo positivo, foram detectados com intensidade 30 % maior que o branco em pelo menos uma amostra de urina, tendo 25V como melhor energia de colisão.

Na fase screening, apenas os MRMs detectados na etapa anterior, seguindo o critério de seleção estabelecido, foram utilizados para investigação individual das amostras e, conforme demonstrado pela **Tabela 4.2**, estes 11 MRMs mostraram intensidade 30% superior em relação ao branco em pelo menos uma das 12 amostras analisadas.

Tabela 4.2 – Fold change, mudança observada entre a medida original (branco) e a medida real (amostra), para os compostos METF, METP, ACTM, PRXT e ACRL, possivelmente, presentes nas amostras de urina humana.

Analito	MRM	Fold change
Metformina	130>71	15678.7
Metformina	130>46	3885.9
Metformina	130>60	2528.1
Metoprolol	268>56	111.8
Acetaminofeno (paracetamol)	152>110	106.0
Metoprolol	268>74	66.6
Acetaminofeno (paracetamol)	152>65	46.2
Metoprolol	268>116	22.1
Paraxantina	181>124	7.3
Acrilamida	72>44	6.3
Acrilamida	72>55	5.9

Fonte: autoria própria.

A varredura de íons produto para os MRMs observados na fase screening sugeriu a presença de metformina (130>71; 130>46; 130>60), metoprolol (268>56; 268>74; 268>116), acetaminofeno (152>110; 152>65), acrilamida (72>55; 72>44) e paraxantina (181>124) nas amostras.

Dentre as 12 amostras analisadas, metade delas incluía pacientes que se encontravam em quadro clínico de infecção urinária e que estavam submetidos ao tratamento da mesma, o

que justifica a presença de acetaminofeno, indicado para alívio dos sintomas deste tipo de infecção. Além disso, alguns dos pacientes faziam uso regular de alguns dos medicamentos detectados pelo estudo devido as suas condições clínicas pré-existentes, como foi o caso do metoprolol e da metformina, utilizados para tratamento de hipertensão arterial e prevenção a diabetes, respectivamente.

Notamos também que as maiores mudanças de medida foram observadas nesta parcela da população do estudo, em torno de 10 MRMs (90,9%), devido, possivelmente, ao tratamento a que os pacientes estavam submetidos e ao uso de medicamentos regulares, o que pode ter possibilitado a detecção destes possíveis candidatos de exposição ambiental.

4.4.1.1 Etapa de identificação nas amostras de urina

Uma nova amostra de urina combinada foi preparada e o experimento de varredura de íons produto foi realizado visando encontrar a fragmentação monitorada apenas para os compostos que apresentaram sinal 30 % maior que o branco após os dois estágios anteriores, ou seja, 5 compostos (correspondente aos 11 MRMs).

Após a realização do experimento, notou-se que alguns compostos apresentaram os fragmentos monitorados, que também podem ser encontrados em artigos e no banco de dados, destacando entre eles, metformina, paracetamol, metoprolol, acrilamida e paraxantina, cujas fragmentações obtidas para cada analito pela varredura de íons produto podem ser observadas no **Apêndice B**. Conforme discutido anteriormente, o tratamento a que os pacientes foram submetidos com esses compostos pode contribuir para aumentar o número de MRMs detectados nas fases discovery e screening e também, na fase de identificação, uma vez que os resultados sugeriram a presença de todos eles (100 % dos compostos monitorados no total). Esses resultados não são especificamente uma vantagem do método, mas mostram que a condição da amostra influencia na resposta analítica. Em outras palavras, provavelmente, a resposta do método pode estar diretamente relacionada à abundância de algum composto na amostra, e isso contribui para aumentar a intensidade do íon.

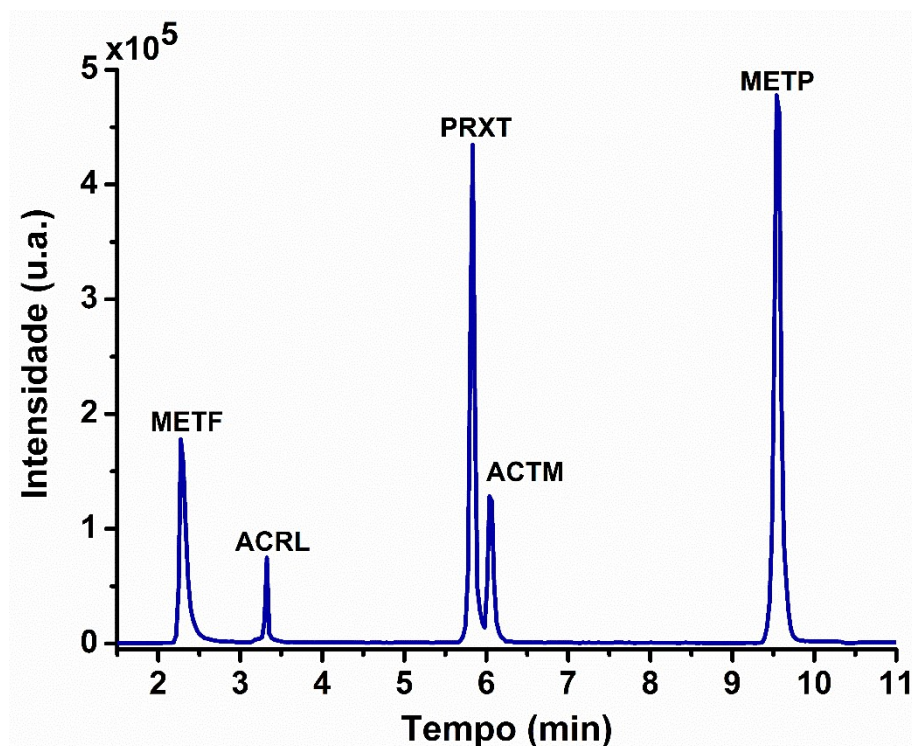
4.4.2 Validação analítica por LC-MS/MS

Um critério adicional foi estabelecido com base na confirmação por LC-MS/MS para garantir e confirmar a presença dos compostos apontados anteriormente. O método foi realizado por meio da injeção de soluções padrão individuais no sistema LC-MS/MS. Os compostos foram analisados em modo positivo, e o íon $[M+H]^+$ foi usado como íon precursor para todos

resultando em pelo menos dois íons produto, e as duas transições de maior intensidade foram usadas como íons qualificadores.

O método SRM teve 617 varreduras por corrida cromatográfica, com *dwell time* variando de 150 a 200 ms de acordo com o número de transições de SRM monitoradas. Foram obtidos picos cromatográficos com 10 pontos para todos os compostos, permitindo a determinação simultânea dos analitos selecionados, como mostrado na **Figura 4.3**.

Figura 4.3 - Cromatograma de íons totais (TIC) de solução padrão 300 $\mu\text{g L}^{-1}$: METF (130>71); ACRL (72>55); PRXT (181>124); ACTM (152>110) e METP (268>116).



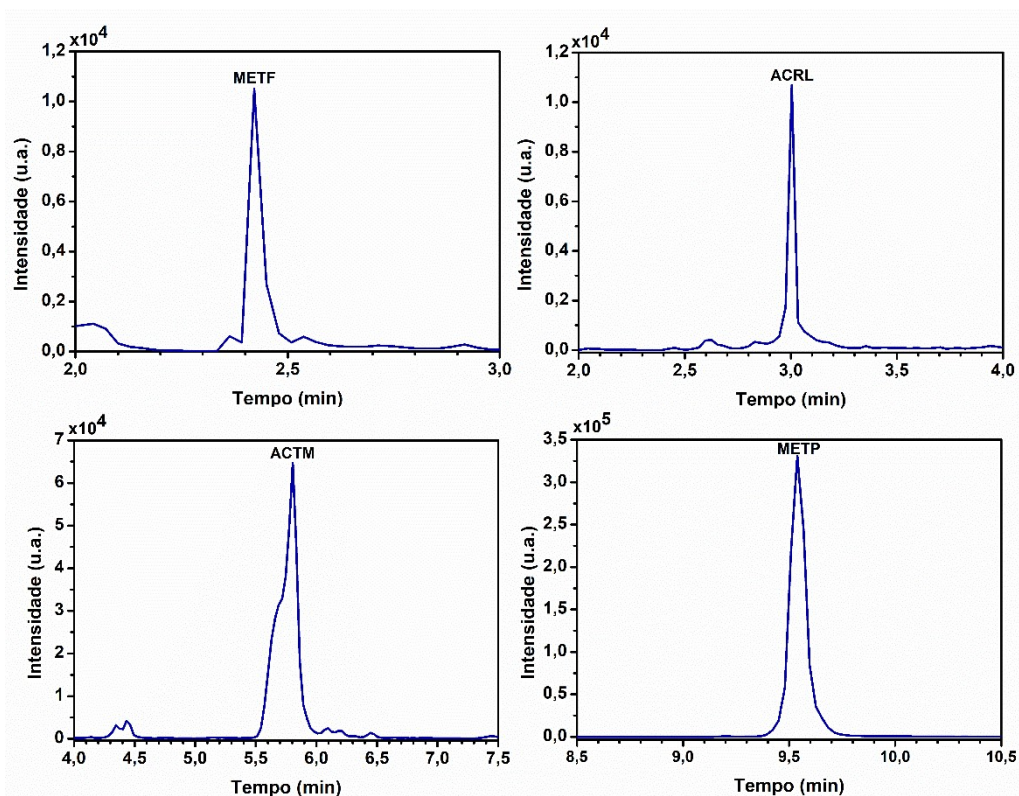
Fonte: autoria própria.

As condições cromatográficas como, a vazão de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ e volume de injeção de $50 \mu\text{L}$, mostraram-se satisfatórios dada a finalidade de eluição um curto tempo de análise. O ácido fórmico a 0,1 % foi escolhido como aditivo do eluente, uma vez que concentrações mais elevadas não aumentaram a resposta do sinal analítico.

Neste estudo, nenhum efeito de memória (carryover) foi observado para qualquer composto. O tempo total de análise foi de 19 min, incluindo a lavagem da coluna e a etapa de reequilíbrio. Amostras de controle de qualidade, ou seja, padrões a $300 \mu\text{g L}^{-1}$ foram preparados em água ultrapura e analisados regularmente antes e depois de cada conjunto de amostras. Esse procedimento foi adotado para garantir o desempenho e a confiabilidade do método. Além disso, após as amostras de QC, acetonitrila foi injetada para limpeza do sistema e evitar o efeito memória antes do início de um novo conjunto de análise.

Com exceção da PRXT, todas as amostras continham pelo menos um dos analitos de interesse. Um exemplo dos compostos alvo encontrados nas amostras pode ser visualizado na **Figura 4.4**.

Figura 4.4 - Cromatograma de íons extraídos (XIC) dos compostos detectados nas amostras de urina humana: METF (130>71); ACRL (72>55); ACTM (152>110) e METP (268>116).



Fonte: autoria própria.

Os resultados apresentados pela análise de LC-MS/MS confirmaram a presença de compostos indicada por MRM-profiling nas amostras (80 % dos compostos alvo MRM-profiling), demonstrando que o método pode ser usado para uma primeira etapa de triagem no campo do exposoma como um método exploratório flexível, amplo e rápido de possíveis candidatos à exposição ambiental.

Outra abordagem permitida pelo método MRM-profiling é a utilização da fase polar advinda do preparo de amostra pelo método Bligh-Dyer para obter informações adicionais da mesma, uma vez que a técnica foi criada para estudo lipidômico, que para esta finalidade faz uso da fase apolar. Desta forma, utilizando a fase polar para realização do método proposto, pode-se explorar completamente a amostra, obter informações adicionais, além de ampliar o uso da técnica e contribuir para os estudos no campo do exposoma, que, até o momento, tem focado em algumas classes de compostos, como perfluoroalquil, éteres difenílicos

polibromados, organoclorados, ftalatos, fenóis, organofosforados, parabenos e compostos como cotinina e acrilamida, conforme apontado por Steckling et al. (2018) ⁴⁴ e no relatório HELIX ⁴⁵ elaborado pela União Europeia.

4.5 CONCLUSÃO

O fluxo de trabalho do método exploratório desenvolvido mostrou-se adequado para a proposta, sendo uma ferramenta rápida e informativa no estudo expositivo. Foi criado um método exploratório de possíveis candidatos à exposição ambiental como uma etapa de análise prévia capaz de fornecer um perfil exploratório de possíveis candidatos à exposição ambiental que também estão presentes em amostras biológicas. Além disso, o fluxo de trabalho proposto pode ser aplicado a diversas medidas de interesse clínico, como modelos de progressão da doença, estudos epidemiológicos, avaliação da eficácia do tratamento e se o medicamento atingiu os níveis desejados. A simplicidade do tratamento dos dados e o método também podem ser usados para orientar a seleção de moléculas a serem posteriormente estudadas por LC-MS/MS ou mesmo por espectrometria de massas de alta resolução (HRMS).

Além disso, o método possibilitou uma análise rápida e exploratória de amostras para estudo de exposoma, orientando os pesquisadores quais compostos possivelmente se encontram nas amostras, principalmente em amostras biológicas, além de contribuir para o crescimento e desenvolvimento de informações sobre o estudo em exposoma. Este estudo é apenas o primeiro passo em um amplo campo que necessita de mais informações e estudos, cujos próximos passos são tentar quantificar alguns desses compostos bem como os seus metabólitos.

REFERÊNCIAS

- (1) WILD, C. P. The exposome: from concept to utility. **International Journal of Epidemiology**, v. 41, n. 1, p. 24–32, 2012.
 - (2) MILLER, G. W. The Explosion of -Omic-Based Technology and its Impact on the Exposome. In: **The Exposome**. Elsevier, 2014. p. 27–37.
 - (3) CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Exposome and Exposomics**. Disponível em: <https://www.cdc.gov/niosh/topics/exposome/default.html>. Acesso em 16 out. 2019.
 - (4) DEBORD, D. G. et al. Use of the “Exposome” in the Practice of Epidemiology: A Primer on -Omic Technologies. **American Journal of Epidemiology**, v. 184, n. 4, p. 302–314, 2016.
 - (5) SMITH, M. T.; DE LA ROSA, R.; DANIELS, S. I. Using exposomics to assess cumulative risks and promote health: Using Exposomics to Assess Cumulative Risks. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 56, n. 9, p. 715–723, 2015.
 - (6) JAMES, J. E. Critical Review of Dietary Caffeine and Blood Pressure: A Relationship That Should Be Taken More Seriously: **Psychosomatic Medicine**, v. 66, n. 1, p. 63–71, 2004.
 - (7) CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC); DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. **Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals**, 2009.
 - (8) ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **TSCA Chemical Substance Inventory**. Disponível em: <https://www.epa.gov/tsca-inventory/about-tsca-chemical-substance-inventory>. Acesso em 22 nov. 2019.
 - (9) GOVERNMENT ACCOUNTABILITY OFFICE (GAO). **Toxic Chemicals-High Risk Issue**, 2019. Disponível em: <https://www.gao.gov/key_issues/toxic_chemicals/issue_summary>. Acesso em 6 jan. 2020.
 - (10) XIE, Z. et al. Multiple Reaction Monitoring Profiling (MRM-Profilng) of Lipids To Distinguish Strain-Level Differences in Microbial Resistance in *Escherichia coli*. **Analytical Chemistry**, v. 91, n. 17, p. 11349–11354, 2019.
 - (11) FRANCO, J. et al. Profiling of epidermal lipids in a mouse model of dermatitis: Identification of potential biomarkers. **PLOS ONE**, v. 13, n. 4, 2018.
 - (12) DHILLON, J. et al. Multiple Reaction Monitoring Profiling to Assess Compliance with an Almond Consumption Intervention. **Current Developments in Nutrition**, v. 1, n. 9, 2017.
 - (13) DIPALI, S. S. et al. Histologic analysis and lipid profiling reveal reproductive age-associated changes in peri-ovarian adipose tissue. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 17, n. 1, p. 46, 2019.
-

- (14) KOBOS, L. M. et al. An Integrative Proteomic/Lipidomic Analysis of the Gold Nanoparticle Biocorona in Healthy and Obese Conditions. **Applied In Vitro Toxicology**, v. 5, n. 3, p. 150–166, 2019.
- (15) FERREIRA, C. R. et al. Chemical profiling of cerebrospinal fluid by multiple reaction monitoring mass spectrometry. **Analyst**, v. 141, n. 18, p. 5252–5255, 2016.
- (16) YANNELL, K. E. et al. Multiple reaction monitoring (MRM)-profiling with biomarker identification by LC-QTOF to characterize coronary artery disease. **Analyst**, v. 143, n. 20, p. 5014–5022, 2018.
- (17) LIMA, C. B. et al. Comprehensive lipid profiling of early stage oocytes and embryos by MRM profiling. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 53, n. 12, p. 1247–1252, 2018.
- (18) BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911–917, 1959.
- (19) METLIN. Disponível em: https://metlin.scripps.edu/landing_page.php?pgcontent=mainPage. Acesso em 17 jun. 2019.
- (20) SHAH, D.; BURGESS, J. A Simple, Fast, and Reliable LC-MS/MS Method for Determination and Quantification of Phthalates in Distilled Beverages. Application note (Waters).
- (21) BORTON, C.; OLSON, L. Analysis of Endocrine Disruptors, Pharmaceuticals, and Personal Care Products in River Water. Application note (AB Sciex).
- (22) SANCHIS, Y.; COSCOLLÀ, C.; YUSÀ, V. Analysis of four parabens and bisphenols A, F, S in urine, using dilute and shoot and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **Talanta**, v. 202, p. 42–50, 2019.
- (23) FIERENS, T. et al. Analysis of phthalates in food products and packaging materials sold on the Belgian market. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 7, p. 2575–2583, 2012.
- (24) ATEŞ, E.; MITTENDORF, K. Analysis of Plasticizer Contaminants in Beverages and Milk using an Automated System Based on Turbulent-flow Chromatography Coupled to LC-MS/MS. Application note (Thermo Scientific).
- (25) KUMAR, R. et al. Assessment of drugs of abuse in a wastewater treatment plant with parallel secondary wastewater treatment train. **Science of the Total Environment**, v. 658, p. 947–957, 2019.
- (26) TAYLOR, R. R. et al. Comparison of the quantification of acetaminophen in plasma, cerebrospinal fluid and dried blood spots using high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 83, p. 1–9, 2013.
- (27) CHO, H. S. et al. Detection of 11-nor-9-carboxy-tetrahydrocannabinol in the hair of drug abusers by LC–MS/MS analysis. **Forensic Science International**, v. 295, p. 219–225, 2019.
-

- (28) DUNLOP, A. J. et al. Determination of Cotinine by LC-MS-MS with Automated Solid-Phase Extraction. **Journal of Chromatographic Science**, v. 52, n. 4, p. 351–356, 2014.
- (29) SADIADI, S. et al. Determination of Phthalates, Including DEHP, by LC/MS/MS and GC/MS to Aid in Food Safety Analysis. Application note (Phenomenex).
- (30) GARCÍA IBARRA, V. et al. Estimates of dietary exposure of Spanish population to packaging contaminants from cereal based foods contained in plastic materials. **Food and Chemical Toxicology**, v. 128, p. 180–192, 2019.
- (31) MASTOVSKA, K. et al. Improved LC/MS/MS Pesticide Multiresidue Analysis Using Triggered MRM and Online Dilution. Application note (Agilent).
- (32) SCHREIBER, A. LC-MS/MS Analysis of Emerging Food Contaminants. Application note (AB Sciex).
- (33) SCHREIBER, A. et al. Increasing Selectivity and Confidence in Detection when Analyzing Phthalates by LC-MS/MS. Application note (AB Sciex).
- (34) PTOLEMY, A. S. et al. Quantification of theobromine and caffeine in saliva, plasma and urine via liquid chromatography–tandem mass spectrometry: A single analytical protocol applicable to cocoa intervention studies. **Journal of Chromatography B**, v. 878, n. 3–4, p. 409–416, 2010.
- (35) GICQUEL, T. et al. Quantitative Analysis of Acetaminophen and its Primary Metabolites in Small Plasma Volumes by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 37, n. 2, p. 110–116, 2013.
- (36) MORATO, N. M. et al. Quantitative Swab Touch Spray Mass Spectrometry for Oral Fluid Drug Testing. **Analytical Chemistry**, v. 91, n. 11, p. 7450–7457, 2019.
- (37) LIANG, S.-H. Rapid and Accurate LC-MS/MS Analysis of Nicotine and Related Compounds in Urine Using Raptor™ Biphenyl LC Columns and MS-Friendly Mobile Phases. Application note (Restek).
- (38) PENG, L. et al. Rapid and Reproducible Extraction of Acrylamide in French Fries using a Single SPE Sorbent - Strata™-X-C. Application note (Phenomenex).
- (39) LI, Y.; EMM, T.; YELESWARAM, S. Simultaneous determination of fluoxetine and its major active metabolite norfluoxetine in human plasma by LC-MS/MS using supported liquid extraction: LC-MS/MS determination of fluoxetine in human plasma. **Biomedical Chromatography**, v. 25, n. 11, p. 1245–1251, 2011.
- (40) JIANG, J. et al. Simultaneous determination of primary and secondary phthalate monoesters in the Taihu Lake: Exploration of sources. **Chemosphere**, v. 202, p. 17–24, 2018.
-

- (41) SCHEIDWEILER, K. B.; SHAKLEYA, D. M.; HUESTIS, M. A. Simultaneous quantification of nicotine, cotinine, trans-3'-hydroxycotinine, norcotinine and mecamylamine in human urine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Clinica Chimica Acta**, v. 413, n. 11–12, p. 978–984, 2012.
- (42) PENG, Y.; GAUTAM, L.; HALL, S. W. The detection of drugs of abuse and pharmaceuticals in drinking water using solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. **Chemosphere**, v. 223, p. 438–447, 2019.
- (43) LEE, I. et al. Urinary phthalate metabolites among children in Saudi Arabia: Occurrences, risks, and their association with oxidative stress markers. **Science of the Total Environment**, v. 654, p. 1350–1357, 2019.
- (44) STECKLING et al. Biomarkers of exposure in environment-wide association studies - Opportunities to decode the exposome using human biomonitoring data. **Environmental Research**, v. 164, p. 597-624, 2018.
- (45) EUROPEAN UNION (EU). **Final Report Summary – HELIX** (The Human Early-Life Exposome – novel tools for integrating early-life environmental exposures and child health across Europe), 2018.
-

APÊNDICE A – Lista de compostos selecionados para o estudo de exposoma

Tabela A-1. Lista de compostos selecionados para o estudo de exposoma com as respectivas relações m/z e modo de ionização.

Analito	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	Ionização
Cafeína	195	138	+
Cafeína	195	110	+
Cafeína	195	42	+
Acrilamida	72	55	+
Acrilamida	72	54	+
Acrilamida	72	44	+
Cotinina	177	99	+
Cotinina	177	98	+
Cotinina	177	80	+
Cotinina	177	146	+
Cotinina	177	90	+
DEET (N,N-Dietil-m-toluamida)	192	119	+
DEET ((N,N-Dietil-m-toluamida)	192	91	+
Carbamazepina	237	194	+
Carbamazepina	237	192	+
Carbamazepina	237	193	+
Venlafaxina	278	260	+
Venlafaxina	278	58	+
Venlafaxina	278	121	+
Venlafaxina	278	215	+
Norfluoxetina	296	159	+
Norfluoxetina	296	134	+
Norfluoxetina	296	105	+
Ciprofloxacina	332	314	+
Ciprofloxacina	332	288	+
Ciprofloxacina	332	254	+
Norfloxacin	320	231	+
Norfloxacin	320	282	+
Norfloxacin	320	254	+
Chlorsulfuron	356	190	-
Chlorsulfuron	356	139	-
Chlorsulfuron	356	107	-
Chlorsulfuron	358	141	+
Chlorsulfuron	358	167	+
Chlorsulfuron	358	57	+
Halosulfuron	433	154	-
Halosulfuron	433	252	-
Halosulfuron	433	78	-
Halosulfuron	435	182	+
Halosulfuron	435	403	+

Halosulfuron	435	139	+
Teobromina	181	42	+
Teobromina	181	138	+
Morfina	286	165	+
Morfina	286	191	+
Morfina	286	153	+
Morfina	286	152	+
Morfina	286	128	+
Morfina	286	201	+
Aflatoxina B1	311	296	-
Aflatoxina B1	311	283	-
Aflatoxina B1	311	212	-
Aflatoxina B1	313	241	+
Aflatoxina B1	313	285	+
Aflatoxina B1	313	269	+
Sulfametoxazol	254	92	+
Sulfametoxazol	254	156	+
Sulfametoxazol	254	188	+
Trimetoprima	291	230	+
Trimetoprima	291	123	+
Trimetoprima	291	261	+
Paroxetina	330	192	+
Paroxetina	330	70	+
Paroxetina	330	135	+
Paroxetina	330	151	+
Paroxetina	330	123	+
Sertralina	306	159	+
Sertralina	306	275	+
Sertralina	306	129	+
Diazepam	285	193	+
Diazepam	285	222	+
Diazepam	285	241	+
Diazepam	285	154	+
Famotidina	336	148	-
Famotidina	336	187	-
Famotidina	336	95	-
Famotidina	338	259	+
Famotidina	338	138	+
Famotidina	338	71	+
Sinvastatina	419	285	+
Sinvastatina	419	303	+
Sinvastatina	419	267	+
Amidosulfuron	368	78	-
Amidosulfuron	368	259	-
Amidosulfuron	368	109	-

Capítulo IV

Amidosulfuron	370	218	+
Amidosulfuron	370	261	+
Amidosulfuron	370	139	+
Foramsulfuron	451	296	-
Foramsulfuron	451	268	-
Foramsulfuron	451	154	-
Foramsulfuron	453	182	+
Foramsulfuron	453	272	+
Foramsulfuron	453	255	+
Dietil ftalato	223	149	+
Dietil ftalato	223	177	+
Dibutil ftalato	279	149	+
Dibutil ftalato	279	205	+
Benzil Butil ftalato	313	91	+
Benzil Butil ftalato	313	149	+
Dietil hexil ftalato	391	149	+
Dietil hexil ftalato	391	167	+
Metcatinona	164	146	+
Metcatinona	164	131	+
Metcatinona	164	105	+
Cocaína	304	182	+
Cocaína	304	77	+
Cocaína	304	150	+
Cocaína	304	82	+
Metadona	310	265	+
Metadona	310	105	+
Metadona	310	91	+
Metadona	310	219	+
Nicotina	163	132	+
Nicotina	163	106	+
Nicotina	163	130	+
Ciclofosfamida	259	223	-
Ciclofosfamida	259	79	-
Ciclofosfamida	259	58	-
Ciclofosfamida	261	156	+
Ciclofosfamida	261	106	+
Ciclofosfamida	261	58	+
Ifosfamida	261	92	+
Ifosfamida	261	154	+
Ifosfamida	261	56	+
Gemcitabina	262	110	-
Gemcitabina	262	129	-
Gemcitabina	262	109	-
Gemcitabina	264	95	+
Gemcitabina	264	87	+

Gemcitabina	264	112	+
Etoposido	589	229	+
Etoposido	589	405	+
Etoposido	589	185	+
Docetaxel	806	672	-
Docetaxel	806	121	-
Docetaxel	806	188	-
Docetaxel	808	105	+
Docetaxel	808	182	+
Docetaxel	808	226	+
Paclitaxel	852	525	-
Paclitaxel	852	792	-
Paclitaxel	854	569	+
Paclitaxel	854	509	+
Paclitaxel	854	286	+
Vincristina	823	733	-
Vincristina	823	703	-
Vincristina	823	59	-
Vincristina	825	807	+
Vincristina	825	765	+
Tamoxifeno	372	129	+
Tamoxifeno	372	72	+
Tamoxifeno	372	70	+
Doxorrubicina	542	321	-
Doxorrubicina	542	395	-
Doxorrubicina	542	365	-
Doxorrubicina	544	397	+
Doxorrubicina	544	379	+
Doxorrubicina	544	361	+
Procarbazona	222	106	+
Procarbazona	222	191	+
Procarbazona	222	176	+
Valsartana	434	179	-
Valsartana	434	350	-
Valsartana	434	116	-
Valsartana	436	291	+
Valsartana	436	235	+
Valsartana	436	306	+
Azitromicina	749	591	+
Azitromicina	749	158	+
Azitromicina	749	116	+
Metronidazol	172	82	+
Metronidazol	172	128	+
Cetoprofeno	255	209	+
Cetoprofeno	255	177	+

Cetoprofeno	255	103	+
Metoprolol	268	56	+
Metoprolol	268	116	+
Metoprolol	268	74	+
Loratadina	383	267	+
Loratadina	383	266	+
Loratadina	383	337	+
Omeprazol	346	198	+
Omeprazol	346	151	+
Omeprazol	346	136	+
Cimetidina	253	95	+
Cimetidina	253	159	+
Cimetidina	253	117	+
Fentanil	337	105	+
Fentanil	337	188	+
Fentanil	337	146	+
Tramadol	264	58	+
Tramadol	264	59	+
Verapamil	455	165	+
Verapamil	455	150	+
Verapamil	455	303	+
Varfarina	309	155	+
Varfarina	309	251	+
Varfarina	309	183	+
Sildenafil	475	58	+
Sildenafil	475	99	+
Sildenafil	475	100	+
Digoxina	781	97	+
Digoxina	781	651	+
Digoxina	781	391	+
Digoxina	803	283	+
Digoxina	803	802	+
Doxazosina	452	344	+
Doxazosina	452	247	+
Doxazosina	452	290	+
Fenitoína	253	182	+
Fenitoína	253	225	+
Fenitoína	253	104	+
Dexametasona	393	355	+
Dexametasona	393	373	+
Dexametasona	393	337	+
Metformina	130	60	+
Metformina	130	71	+
Metformina	130	46	+
Mirtazapina	252	195	+

Mirtazapina	252	209	+
Mirtazapina	252	194	+
Finasterida	373	317	+
Finasterida	373	305	+
Finasterida	373	95	+
Minoxidil	210	164	+
Minoxidil	210	110	+
Minoxidil	210	137	+
Diciclohexil ftalato	331	167	+
Diciclohexil ftalato	331	149	+
Diciclohexil ftalato	331	249	+
Paraxantina	181	124	+
Paraxantina	181	42	+
Paraxantina	181	55	+
Paraxantina	181	69	+
Paraxantina	181	109	+
Atrazina	216	174	+
Atrazina	216	137	+
Atrazina	216	68	+
Meloxicam	350	286	-
Meloxicam	350	210	-
Meloxicam	350	146	-
Meloxicam	352	115	+
Meloxicam	352	141	+
Domperidona	426	175	+
Domperidona	426	147	+
Cloranfenicol	321	152	-
Cloranfenicol	321	257	-
Cloranfenicol	321	121	-
Cloranfenicol	323	165	+
Cloranfenicol	323	164	+
Cloranfenicol	323	119	+
Imidacloprida	254	210	-
Imidacloprida	254	153	-
Imidacloprida	254	86	-
Imidacloprida	256	209	+
Imidacloprida	256	212	+
Imidacloprida	256	175	+
Fluoxetina	310	44	+
Fluoxetina	310	117	+
Fluoxetina	310	148	+
Fluoxetina	310	91	+
Acetaminofeno (paracetamol)	152	110	+
Acetaminofeno (paracetamol)	152	65	+
Piroxicam	332	121	+

Piroxicam	332	95	+
Piroxicam	332	164	+
Alprazolam	309	205	+
Alprazolam	309	274	+
Alprazolam	309	281	+
Clozapina	325	249	-
Clozapina	325	192	-
Clozapina	325	178	-
Clozapina	327	84	+
Clozapina	327	270	+
Clozapina	327	227	+
Clozapina	327	296	+
Clozapina	327	192	+
Haloperidol	376	165	+
Haloperidol	376	123	+
Dimetil ftalato	195	163	+
Dimetil ftalato	195	77	+
Dimetil ftalato	195	133	+
Dioctil ftalato	391	261	+
Dioctil ftalato	391	149	+
Bisfenol A	227	212	-
Bisfenol A	227	133	-
Ibuprofeno	205	161	-
Ibuprofeno	205	155	-
Ibuprofeno	205	61	-
Genfibrozila	249	127	-
Genfibrozila	249	121	-
Genfibrozila	249	106	-
Metilparabeno	151	136	-
Metilparabeno	151	92	-
Etilparabeno	165	136	-
Etilparabeno	165	92	-
Propilparabeno	179	136	-
Propilparabeno	179	92	-
Butilparabeno	193	136	-
Butilparabeno	193	92	-
Metotrexato	453	324	-
Metotrexato	453	367	-
Metotrexato	453	409	-
Diclofenaco	294	214	-
Diclofenaco	294	250	-
Diclofenaco	294	178	-
Aspirina	179	137	-
Aspirina	179	59	-
Aspirina	179	93	-

APÊNDICE B – Varreduras de íons produto

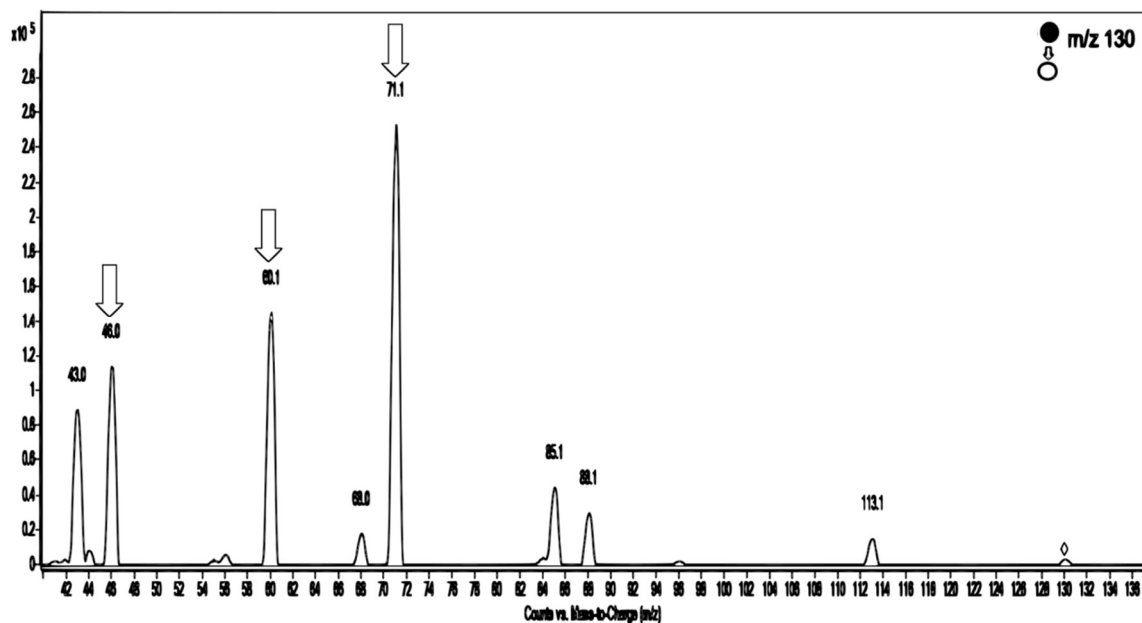
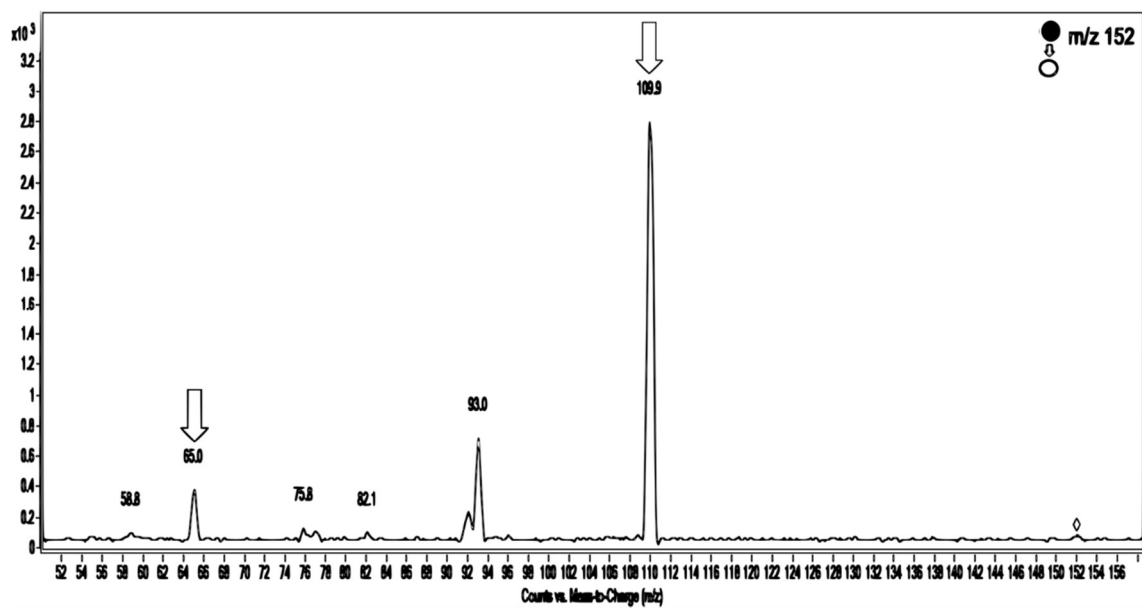
Figura A-1. Varredura de íon produto para metformina (m/z 130) em amostra de urina humana.Figura A-2. Varredura de íon produto para acetaminofeno (m/z 152) em amostra de urina humana.

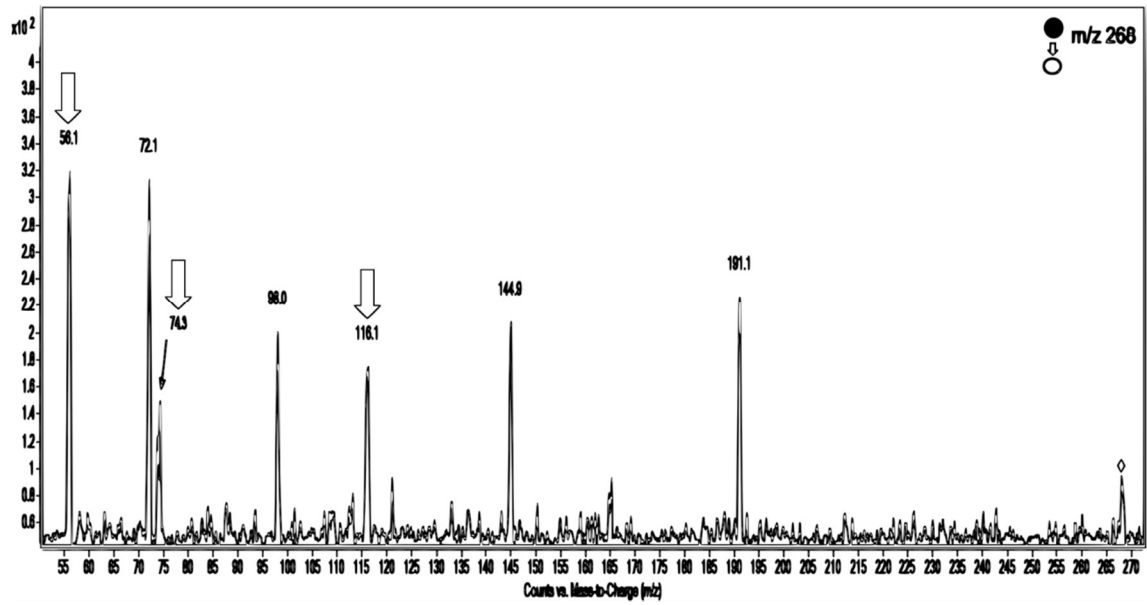
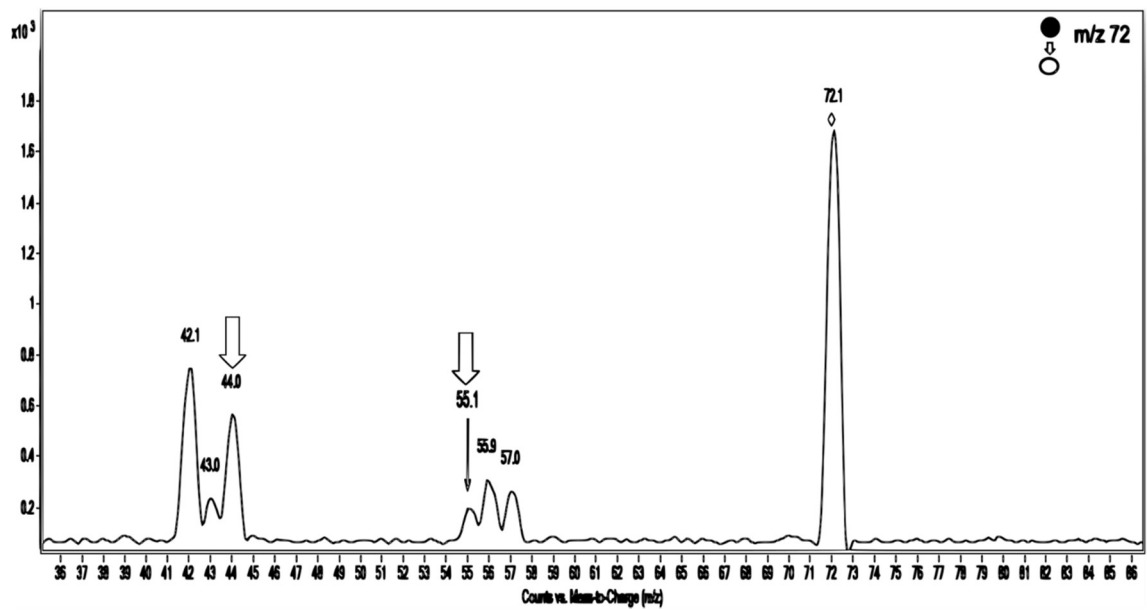
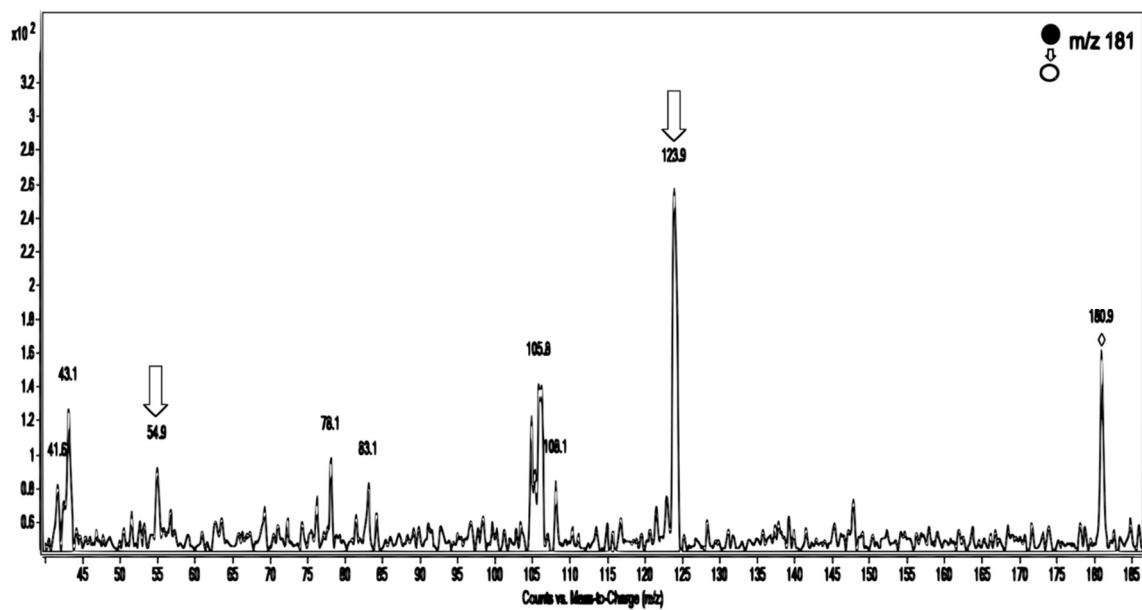
Figura A-3. Varredura de íon produto para metoprolol (m/z 268) em amostra de urina humana.**Figura A-4.** Varredura de íon produto para acrilamida (m/z 72) em amostra de urina humana.

Figura A-5. Varredura de íon produto para paraxantina (m/z 181) em amostra de urina humana.



Capítulo 5

CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS

5.1. CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS

A revisão da literatura apresentada no primeiro capítulo demonstrou a crescente preocupação dos pesquisadores ao redor do mundo com a problemática dos contaminantes emergentes, desde a ocorrência aos efeitos ecotoxicológicos que podem causar. Em vista disso, a necessidade de desenvolvimento de métodos cada vez mais rápidos tem se apresentado como um dos principais focos de pesquisa abordando esta temática.

Apesar da crescente preocupação acerca do tema, em muitos países, principalmente naqueles em desenvolvimento, como o Brasil, a velocidade dos estudos ainda tem se mostrado incipiente e deixado evidente a necessidade de realização de pesquisas como a presente.

Os métodos desenvolvidos com o procedimento automatizado de preparo de amostras por meio da técnica de column switching e acoplamento ao sistema LC-MS/MS permitiram um grande progresso na análise de amostras aquosas ambientais, especialmente para contaminantes emergentes, provando ser preciso, com reduzido tempo de análise, menor consumo de solvente, reduzida geração de resíduo químico comparado ao tradicional preparo de amostra usando SPE off-line e, principalmente, sem perda de resposta analítica.

Ainda que tenham sido realizados em sistemas cromatográficos distintos, mas com mesmo detector, o tempo total de execução do método utilizando o cartucho de pré-concentração OASIS HLB foi de 24 minutos, atingindo alto rendimento, incluindo preparo de amostra e separação cromatográfica.

Comparando esta primeira abordagem ao da coluna RAM feita em laboratório, cujo tempo total de execução foi de 16 minutos, percebemos que o método atingiu alto rendimento assim como o anterior, em um tempo de análise ainda menor incluindo preparo de amostra e análise cromatográfica. Além disso, mostrou-se de baixo custo, com custo estimado cinco ou seis vezes menor do que as fases vendidas comercialmente.

Em termos de validação, ambas as abordagens se mostraram satisfatórias, apresentando figuras de mérito em consonância com diretivas nacionais e internacionais de validação. Em relação à eficiência analítica, percebemos também resultados semelhantes e em acordo com as regras que regem o desenvolvimento de métodos cromatográficos.

Entretanto, percebemos que apesar do custo relativamente elevado e de um tempo análise em torno de oito minutos mais longo, o método desenvolvido utilizando a fase comercial OASIS HLB mostrou ser mais versátil e eficaz que a coluna RAM, o que fica evidenciado pela detecção de analitos a níveis de concentração mais baixo, vide os limites de quantificação atingidos serem superiores aos atingidos pela coluna feita em laboratório, o que por sua vez,

influenciou diretamente, nos resultados obtidos na quantificação das amostras. Ou seja, a fase comercial OASIS HLB atingiu limites de quantificação ainda menores que os alcançados pela coluna RAM e nos permitiu a quantificação de analitos que não tinham sido apontados pela coluna RAM em algumas amostras. Gostaríamos de ressaltar que este método, conforme apontado nos objetivos do trabalho, também foi aplicado na avaliação de remoção dos fármacos ciprofloxacina, norfloxacina, cafeína e carbamazepina, auxiliando um integrante do grupo de pesquisa em seus ensaios de adsorção na avaliação do biocarvão de bagaço de cana-de-açúcar como matriz adsorvente.

Ambos os métodos desenvolvidos foram aplicados em amostras de águas residuárias e se mostraram adequados, confiáveis e sensíveis, podendo ser utilizados para análises de rotina de vários contaminantes orgânicos em baixas concentrações em amostras de águas residuárias ambientais.

Com relação ao conteúdo apresentado utilizando MRM-profiling aplicada a análise de exposoma, é possível destacar a intenção de criar um método não supervisionado e exploratório de possíveis candidatos à exposição ambiental capaz de fornecer um perfil de possíveis compostos passíveis de serem encontrados em determinada amostra biológica. Dessa forma, essa ferramenta irá orientar os analistas para quais compostos possivelmente podem ser encontrados na amostra, e assim, otimizar as análises de interesse clínico, como modelos de progressão da doença, estudos epidemiológicos, avaliação da eficácia do tratamento e se o medicamento atingiu os níveis e locais desejados, além de contribuir para o desenvolvimento do campo de exposoma.

A simplicidade do tratamento dos dados e o método também podem ser usados para orientar a seleção de moléculas a serem posteriormente estudadas por LC-MS/MS ou mesmo por espectrometria de massas de alta resolução (HRMS). Este estudo é apenas o primeiro passo em um amplo campo que necessita de mais informações e os próximos passos, possam ser tentar quantificar alguns desses compostos nas amostras ou mesmo identificar e quantificar seus metabólitos.
