



TAMIRES VALIM MARQUES

**Desenvolvimento e validação de método analítico
empregando DLLME e HPLC/UV para
determinação de benzodiazepínicos em amostra de
água.**

Número da publicação: 26/2014

**CAMPINAS
2014**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA**

TAMIRES VALIM MARQUES

**Desenvolvimento e validação de método analítico
empregando DLLME e HPLC/UV para a
determinação de benzodiazepínicos em amostra
de água.**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Engenharia Mecânica da
Universidade Estadual de Campinas como
parte dos requisitos exigidos para obtenção
do título de Mestre em Engenharia Mecânica,
na Área de Materiais e Processos de
Fabricação.

Orientador: Rodnei Bertazzoli

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA TAMIRES
VALIM MARQUES E ORIENTADA PELO
PROF^o DR. RODNEI BERTAZZOLI.

ASSINATURA DO ORIENTADOR

Prof. RODNEI BERTAZZOLI
Matr. n. 08519-5
FEM - UNICAMP

Campinas

2014

iii

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

M348d Marques, Tamires Valim, 1987-
Desenvolvimento e validação de método analítico empregando DLLME e HPLC/UV para determinação de benzodiazepínicos em amostra de água. / Tamires Valim Marques. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Rodnei Bertazzoli.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica.

1. Cromatografia líquida. 2. CLAE (Cromatografia líquida de alta eficiência). I. Bertazzoli, Rodnei, 1965-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Mecânica. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Development and validation of analytical method employing DLLME and HPLC/UV for the determination of benzodiazepines in water sample.

Palavras-chave em inglês:

Liquid chromatography

HPLC - High performance liquid chromatography

Área de concentração: Materiais e Processos de Fabricação

Titulação: Mestra em Engenharia Mecânica

Banca examinadora:

Rodnei Bertazzoli [Orientador]

Solange Cadore

Christiane de Arruda Rodrigues

Data de defesa: 12-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Mecânica

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA
COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO

**Desenvolvimento e Validação de método analítico
empregando DLLME e HPLC/UV para determinação
de benzodiazepínicos em amostra de água.**

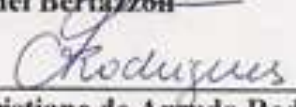
Autor: Tamires Valim Marques

Orientador: Rodnei Bertazzoli

A Banca Examinadora composta pelos membros abaixo aprovou esta Dissertação:



Prof^o Dr. Rodnei Bertazzoli



Prof^a Dra. Christiane de Arruda Rodrigues



Prof^a Dra. Solange Cadore

Campinas, 12 de fevereiro de 2014

Agradecimentos

Este trabalho não poderia ser terminado sem a ajuda de diversas pessoas às quais presto minha homenagem:

Aos meus pais pelo incentivo em todos os momentos da minha vida.

Ao meu orientador, que me mostrou os caminhos a serem seguidos e proporcionou viver esta experiência acadêmica maravilhosa.

A todos meus amigos e colegas do departamento, que ajudaram de forma direta e indireta na conclusão deste trabalho.

Resumo

A crescente preocupação com a poluição das águas por novos poluentes denominados emergentes tem se intensificado, visto que aumentou o número destes compostos detectados em água. Dentre estes compostos encontram-se os fármacos e produtos de higiene pessoal, usados cotidianamente pela população.

O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um método simples, rápido e sensível utilizando a microextração líquido líquido (DLLME) combinada com a cromatografia líquida de ultra eficiência (HPLC) com detecção ultravioleta (UV) para a determinação de alguns benzodiazepínicos (bromazepam, clonazepam e diazepam) em amostras de água.

A determinação foi realizada em uma coluna C18 de acordo com as condições cromatográficas ótimas (fase móvel acetonitrila:água (60:40, v/v); vazão 1,2 mL min⁻¹; detecção 225 nm).

No método de extração, uma mistura apropriada de solvente extrator e dispersor foi injetada rapidamente na amostra aquosa (10 mL) com auxílio de uma seringa. De modo que uma solução turva foi formada, esta solução é caracterizada por conter pequenas partículas do solvente extrator que se dispersa na fase aquosa.

Os parâmetros da extração, tais como natureza e volume dos solventes extrator e dispersor, tempo de extração, pH da amostra, força iônica, velocidade e tempo de centrifugação, foram estudados para a otimização.

Com as condições ótimas definidas (solvente extrator: clorofórmio, 200 µL; solvente dispersor: metanol, 700 µL; pH da amostra 9,0; velocidade e tempo de extração: 5000 rpm, 1 minuto; força iônica: adição de 1% (p/v) de (NH₄)₂SO₄) o método proposto foi validado seguindo as figuras de método preconizadas pela ANVISA na Resolução N° 899 de 2003.

A faixa linear para cada fármaco foram 8,0 – 96 µg L⁻¹ para bromazepam, 4,0 – 48 µg L⁻¹ para clonazepam e 1,0 – 12 µg L⁻¹ para diazepam. Todas as curvas obtiveram valores de (r) superiores a 0,999. Os limites de detecção e quantificação obtidos foram 2,4 e 8,0 µg L⁻¹ para bromazepam, 1,2 e 4,0 µg L⁻¹ para clonazepam, 0,2 e 1,0 µg L⁻¹ para diazepam, respectivamente. As recuperações variaram de 50 a 110% com RSD (Desvio Padrão Relativo) inferiores a 12,7 %.

Finalmente, o método proposto foi aplicado em amostras coletadas na represa Billings localizada no município de Diadema-SP.

Palavras Chave: Poluente emergente, benzodiazepínicos, água, DLLME, HPLC-UV.

Abstract

The growing concern over water pollution caused by so-called new emerging pollutants has intensified since increased the number of these compounds detected in water. Among these compounds are pharmaceuticals and personal care products used daily by the population.

This study aimed to develop a simple, rapid and sensitive liquid using liquid micro extraction (DLLME) combined with ultra-performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet detection (UV) for the determination of some benzodiazepines (bromazepam, clonazepam and diazepam) in water samples .

The determination was performed on a C18 column in accordance with the optimal chromatographic conditions (mobile phase acetonitrile: water (60:40, v/v), flow rate 1.2 mL min⁻¹, detection 225 nm).

In the extraction method, a suitable mixture of extractant and dispersing solvent was injected rapidly into the aqueous sample (10 ml) with a syringe. So that a cloudy solution was formed, this solution is characterized by containing fine drops of the extractor solvent is dispersed in the aqueous phase.

The parameters of the extraction, such as the nature and volume of the extractor and disperser solvents, extraction time, sample pH, ionic strength, speed and time of centrifugation, were studied for optimization.

With the defined optimal conditions (extracting solvent: chloroform, 200 µL; disperser solvent: methanol, 700 µL, sample pH 9.0, extraction time and speed: 5000 rpm, 1 minute; ionic strength: adding 1% (p/v) (NH₄)₂SO₄) the proposed method was validated following the figures of merit recommended by the ANVISA Resolution No. 899 of 2003.

The linear ranges for each drug were 8.0 to 96 µg L⁻¹ for bromazepam, 4.0 to 48 µg L⁻¹ for clonazepam and 1.0 to 12 µg L⁻¹ for diazepam. All curves obtained values (r) greater than 0.999. The limits of detection and quantification obtained were 2.4 and 8.0 µg L⁻¹ to bromazepam, 1.2 and 4.0 µg L⁻¹ to clonazepam, 0.2 and 1.0 µg L⁻¹ for diazepam, respectively. Recoveries ranged from 50 to 110% with RSD (Relative Standard Deviation) of less than 12.7%.

Finally, the proposed method was applied to samples collected in the Billings dam located in Diadema-SP.

Key Words: Emerging pollutants, benzodiazepines, water, DLLME, HPLC-UV.

Lista de Ilustrações

Figura 1	Possíveis rotas dos fármacos no meio ambiente.....	5
Figura 2	Consumo de medicamentos no Brasil estimado pela pesquisa IBOPE 2012.....	8
Figura 3	Estrutura química do Benzodiazepina.....	13
Figura 4	Estrutura química do Bromazepam.....	15
Figura 5	Estrutura química do Clonazepam.....	16
Figura 6	Estrutura química do Diazepam.....	17
Figura 7	Faixa de aplicação do GC e do HPLC para determinação de poluentes orgânicos emergentes baseados em suas propriedades físico-químicas de polaridade e volatilidade.....	20
Figura 8	Equipamento básico de um HPLC. a) reservatório da fase móvel; b) bomba de alta pressão; c) válvula de injeção; d) coluna; e) detector e f) registrador.....	22
Figura 9	Esquema representativo das etapas envolvidas no processo de extração DLLME	26
Figura 10	Espectros de absorção obtidos por espectrofotômetro de uma solução analítica contendo 5,0 mg L ⁻¹ de cada fármaco.....	53
Figura 11	Cromatograma resultante da análise realizada em uma amostra de água obtida através de um sistema Milli-Q. Condições cromatográficas: fase móvel acetonitrila:água (70:30 v/v), fluxo 1,0 mL min ⁻¹ , comprimento de onda 230 nm e temperatura do forno 25°C.....	55
Figura 12	Avaliação da absorção dos analitos em diferentes comprimentos de onda.....	57
Figura 13	Avaliação da sensibilidade dos analitos empregando diferentes temperaturas na coluna.....	58
Figura 14	Cromatogramas obtidos das análises para seleção do padrão interno nas condições cromatográficas otimizadas: fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v), fluxo 1,0 mL min ⁻¹ , comprimento de onda 225nm e temperatura do forno 30°C. (a) tiramina, (b) β-estradiol e (c) amoxicilina, todos na concentração de 5 µg mL ⁻¹	60

Figura 15	Cromatograma da separação bromazepam (1), clonazepam (2), β -estradiol PI (3) diazepam (4) na concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Coluna fase reversa C18 phenomenex luna, fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v), fluxo $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, comprimento de onda 225 nm e temperatura do forno 30°C	61
Figura 16	Cromatogramas obtidos das análises para seleção da melhor vazão: fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v), comprimento de onda 225 nm e temperatura do forno 30°C . (a) vazão $0,8 \text{ mL min}^{-1}$, (b) $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e (c) $1,2 \text{ mL min}^{-1}$, ambos na concetração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$	62
Figura 17	Cromatogramas obtidos das análises para seleção do melhor solvente de dissolução da amostra. Condições cromatográficas: fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v), comprimento de onda 225nm e temperatura do forno 30°C , vazão $1,2 \text{ mL min}^{-1}$, ambos na concetração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. (a) acetonitrila 100%, (b) Fase móvel e (c) metanol.....	63
Figura 18	Cromatograma da separação dos fármacos, na sequência: bromazepam, clonazepam, β -estradiol (PI) e diazepam com concentração de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Condições cromatográficas otimizadas: coluna fase reversa C18 phenomenex luna, fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v), vazão $1,2 \text{ mL min}^{-1}$, comprimento de onda 225 nm e temperatura do forno 30°C	65
Figura 19	Efeito dos diferentes tipos de solventes extratores na recuperação dos fármacos. Condições de extração: volume de amostra 10 mL, volume de solvente extrator 200 μL , solvente dispersor acetonitrila com volume 800 μL ...	68
Figura 20	Efeito do solvente dispersor na recuperação dos fármacos. Condições de extração: volume de amostra 10 mL, volume de solvente extrator 200 μL , volume de solvente dispersor 800 μL	69
Figura 21	Efeito do volume de solvente extrator na recuperação dos fármacos. Condições de extração: volume de amostra 10 mL, volume de solvente dispersor 800 μL	70

Figura 22	Efeito do volume de solvente dispersor na recuperação dos fármacos. Condições de extração: Solvente extrator clorofórmio, solvente dispersor acetonitrila, volume de solvente extrator 200 µL.....	71
Figura 23	Efeito do tempo de extração na recuperação dos fármacos por DLLME. Condições de extração: Solvente dispersor metanol (700 µL), solvente extrator clorofórmio (200 µL), concentração dos fármacos 100 µg L ⁻¹	72
Figura 24	Avaliação da velocidade de centrifugação na eficiência da extração. Condições de extração: Solvente dispersor metanol (700 µL), solvente extrator clorofórmio (200 µL), concentração dos fármacos 100 µg L ⁻¹	73
Figura 25	Avaliação do tempo de centrifugação na eficiência da extração. Condições de extração: Solvente dispersor metanol (700 µL), solvente extrator clorofórmio (200 µL), concentração dos fármacos 100 µg L ⁻¹	74
Figura 26	Avaliação do efeito da adição do sal (NH ₄) ₂ SO ₄ na eficiência da extração. Condições de extração: Solvente dispersor metanol (700 µL), solvente extrator clorofórmio (200 µL), concentração dos fármacos 100 µg L ⁻¹	75
Figura 27	Avaliação do efeito da variação do pH da amostra na eficiência da extração. Condições de extração: Solvente dispersor metanol (700 µL), solvente extrator clorofórmio (200 µL), concentração dos fármacos 100 µg L ⁻¹	76
Figura 28	Esquema das etapas envolvidas na extração por DLLME com os parâmetros otimizados.....	78
Figura 29	Cromatograma de confirmação de seletividade do método. Condições cromatográficas: fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v), vazão 1,2 mL min ⁻¹ , comprimento de onda 225 nm e temperatura do forno 30°C. Analitos: (1) bromazepam 24 µg L ⁻¹ , (2) clonazepam 12 µg L ⁻¹ , (3) diazepam 3 µg L ⁻¹ e PI β-estradiol 1 mg L ⁻¹	79
Figura 30	Curva analítica do bromazepam.....	80
Figura 31	Curva analítica do clonazepam.....	80
Figura 32	Curva analítica diazepam.....	80
Figura 33	Gráficos resíduos (a) bromazepam; (b) clonazepam e (c) diazepam.....	81

Figura 34 Cromatogramas obtidos da análise das amostras coletadas na represa Billings. Condições cromatográficas: fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v), vazão 1,2 mL min⁻¹, comprimento de onda 225 nm e temperatura do forno 30°C. Analitos: (1) bromazepam, (2) clonazepam, (3) diazepam e (PI) β-estradiol.....

85

Lista de Tabelas

Tabela 1	Concentração de fármacos detectados em água potável.....	07
Tabela 2	Potencial Anual de Consumo para Medicamentos por Classe.....	09
Tabela 3	Fármacos encontrados em águas brasileiras.....	10
Tabela 4	Propriedades Físico-Químicas dos fármacos estudados.....	18
Tabela 5	Comparação de DLLME-HPLC-UV com outros métodos similares.....	28
Tabela 6	Aplicações da DLLME com HPLC.....	30-31
Tabela 7	Solventes utilizados no desenvolvimento do trabalho.....	42
Tabela 8	Fármacos utilizados como Substâncias Químicas de Referência de grau padrão analítico.....	42
Tabela 9	Condições cromatográficas otimizadas para o HPLC-UV.....	64
Tabela 10	Parâmetros cromatográficos obtidos para a separação dos analitos nas condições cromatográficas otimizadas.....	65
Tabela 11	Características físico-químicas dos solventes extratores.....	67
Tabela 12	Parâmetros das curvas analíticas obtidos por padronização interna para os analitos utilizando DLLME-HPLC-UV.....	81
Tabela 13	Limites de detecção e quantificação obtidos pelo método DLLME-HPLC- UV/Vis.....	82
Tabela 14	Recuperação, repetitividade e precisão intermediária obtida para o método desenvolvido.....	83

Lista de Abreviaturas e Siglas

Letras Gregas

μ – micro

λ – comprimento de Onda

α – Fator de separação

.....

Abreviações

ABES – Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC – Associação da Comunidade Analítica (*Association of Analytical Communities*)

BRZ – Bromazepam

BZPs – Benzodiazepínicos

CAS – Serviço de Resumos Químicos (*Chemical Abstracts Service*)

CLZ – Clonazepam

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

CQA – Controle de Qualidade Alto

CQB – Controle de Qualidade Baixo

CQM – Controle de Qualidade Médio

CV – Coeficiente de Variação

DAD – Detector por Arranjo de Diodos (*Diode Array Detector*)

DLLME – Microextração Dispersiva Líquido Líquido (*Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*)

DWI – Inspeção de Água Potável (*Drinking Water Inspectorate*)

DZP – Diazepam

ECD – Detector por Captura de Elétrons (*Electron Capture Detector*)

EF – Fator de Enriquecimento (*Enrichment Factor*)

EPA – Agência de Proteção Ambiental (*Environmental Protection Agency*)

ER – Recuperação da Extração (*Extraction Recovery*)

ETA – Estação de Tratamento de Água

ETAE – Estação de Tratamento de Água e Esgoto

ETE – Estação de Tratamento de Esgoto

FDA – Administração de Comidas e Remédios (*Food and Drug Administration*)

FID – Detector por Ionização de Chama (*Flame Ionization Detector*)

FM – Fase Móvel

GABA – Ácido gama-aminobutírico (*Gamma Amino Butyric Acid*)

GC – Cromatografia Gasosa (*Gas Chromatography*)

HPLC-UV – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector Ultravioleta (*High Performance Liquid Chromatography Ultraviolet Detector*)

IBOPE – Instituto Brasileiro de Opinião Pública e Estatística

ICH – International Conference on Harmonization

INCQs – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

k – fator de retenção

LC-MS/MS – Cromatografia Líquida acoplada Espectrometria de Massas Sequencial (*Liquid Chromatography – Mass Spectrometry tandem Mass Spectrometry*)

LD – Limite de Detecção

LLE – Extração Líquido Líquido (*Liquid Liquid Extraction*)

LPME – Microextração em Fase Líquida (*Liquid Phase Microextraction*)

LQ – Limite de Quantificação

MS – Espectrometria de Massas (*Mass Spectrometry*)

MS – Ministério da Saúde

Ofwat – Escritório de Serviços de Água (*Office of Water Services*)

OWCs – Contaminantes de Efluentes Orgânicos (*Organic Wastewater Contaminants*)

PEC – Poluentes de Preocupação Emergente

PI – Padrão Interno

PPCPs – Produtos de Cuidados Pessoais e Fármacos (*Pharmaceuticals and Personal Care Products*)

PTs – Produtos de Transformação

REACH – Registro, Avaliação, Autorizações e restrição de substâncias químicas
(Registration, Evaluation, Authorizations and Restriction of Chemical substances)

Rs – Resolução

RSD – Desvio Padrão Relativo (*Relative Standard Desviation*)

SDWA – Lei da Água Potável Segura (*Safe Drinking Water Act*)

SNC – Sistema Nervoso Central

SPE – Extração em Fase Sólida (*Solid Phase Extraction*)

SPME – Microextração em Fase Solida (*Solid Phase Microextraction*)

THF – Tetrahidrofurano

t_m – Tempo morto

t_r – Tempo de retenção

USEPA – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unido (*United States Environmental Protection Agency*)

USGS – Pesquisa Geológica dos Estados Unidos (*United States Geological Survey*)

Vis – Visível

SUMÁRIO

Agradecimentos	vii
Resumo.....	ix
Abstract	xi
Lista de Ilustrações.....	xiii
Lista de Tabelas.....	xvii
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	xix
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO.....	13
2.1 Objetivo Geral:.....	13
2.2 Objetivos Específicos:.....	13
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 A classe dos benzodiazepínicos	15
3.2 Fármacos selecionados para o estudo.	16
3.2.1 Bromazepam	17
3.2.2 Clonazepam.....	17
3.2.3 Diazepam	18
3.3 Propriedades Físico-Químicas	19
3.3.1 Solubilidade	19
3.3.2 Constante de ionização ácido-base (Ka) e pKa.....	20
3.3.3 Pressão de vapor.....	20
3.4 Métodos Analíticos	21
3.4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	23
3.4.2 Detector Ultra Violeta (UV)	25
3.5 Técnicas de pré-concentração e extração	25
3.6 Princípios da microextração dispersiva líquido-líquido.....	27
3.6.1 DLLME combinada com HPLC-UV.	29
3.7 Parâmetros cromatográficos.....	33
3.7.1 Resolução (Rs)	33
3.7.2 Fator de retenção (k)	34
3.7.3 Fator de separação (α).....	34

3.8 Validação Analítica.....	35
3.8.1 Seletividade.....	36
3.8.2 Linearidade, faixa linear de trabalho.....	37
3.8.4 Exatidão	39
3.8.5 Limite de Detecção	40
3.8.6 Limite de Quantificação.....	40
3.8.7 Robustez.....	41
4. MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1 Materiais.....	43
4.1.1 Instrumentos.....	43
4.1.2 Padrões, reagentes e soluções.	43
4.2 Métodos.....	44
4.2.1 Preparação da solução estoque e de trabalho	44
4.2.2 Confirmação dos espectros de absorção	45
4.2.3 Amostras de água	45
4.3 Determinação e otimização das condições cromatográficas	46
4.3.1 Preparo e escolha da fase móvel	46
4.3.2 Escolha do volume de injeção.....	47
4.3.3 Escolha da vazão da fase móvel.....	47
4.3.4 Escolha do comprimento de onda de máxima absorção	47
4.3.5 Determinação da temperatura da coluna.....	48
4.4 Padrão Interno	48
4.5 Otimização do procedimento de extração por DLLME.....	48
4.5.1 Escolha do solvente extrator	49
4.5.2 Escolha do solvente dispersor	49
4.5.3 Escolha do volume de solvente extrator	50
4.5.4 Escolha do volume de solvente dispersor	50
4.5.5 Avaliação do tempo de extração	50
4.5.6 Efeito da velocidade de centrifugação	51
4.5.7 Efeito do tempo de centrifugação	51
4.5.8 Avaliação da força iônica.....	51
4.5.9 Efeito do pH da amostra.....	51
4.6 Avaliação da separação cromatográfica.....	48

4.7 Validação do método	52
4.7.1 Seletividade	52
4.7.2 Linearidade ou faixa linear de trabalho	52
4.7.3 Precisão	53
4.7.4 Exatidão	54
4.7.5 Limite de Detecção	54
4.7.6 Limite de Quantificação	54
4.7.7 Robustez	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	55
5.1 Confirmação dos espectros de absorção	55
5.3 Amostra de água como branco	56
5.4 Determinação e otimização das condições cromatográficas	57
5.4.1 Escolha do comprimento de onda de máxima absorção	58
5.4.2 Determinação da temperatura da coluna	59
5.5 Escolha do padrão interno	60
5.6 Outros parâmetros avaliados e otimizados das condições cromatográficas	62
5.7 Avaliação da separação cromatográfica do método otimizado	66
5.8 Avaliação e otimização da técnica de extração DLLME	67
5.8.1 Seleção do tipo de solvente extrator	67
5.8.2 Seleção do tipo de solvente dispersor	69
5.8.3 Escolha do volume de solvente extrator	70
5.8.4 Escolha do volume de solvente dispersor	72
5.8.5 Efeito do tempo de extração	73
5.8.6 Avaliação da velocidade e tempo de centrifugação	74
5.8.7 Estudo do efeito da força iônica	75
5.8.8 Estudo do efeito do pH da amostra	77
5.8.9 Condições otimizadas da DLLME	78
5.9 Validação do método DLLME combinada com HPLC-UV	79
5.9.1 Seletividade	79
5.9.2 Linearidade ou faixa linear de trabalho	80
5.9.3 Limite de detecção e limite de quantificação	82
5.9.4 Exatidão e Precisão	83
5.9.5 Robustez	84

5.10 Análise das amostras coletadas na represa Billing no município de Diadema-SP	84
6. CONCLUSÕES	87
Referências	89

1. INTRODUÇÃO

Atualmente existe uma infinidade de resíduos domésticos, industriais e agrícolas que são gerados decorrentes do crescimento populacional, urbanização mal planejada, expansão das atividades industriais e do aumento da produção agrícola, promovendo a poluição do meio ambiente, principalmente da água.

A preocupação com o consumo desenfreado da água e sua contaminação adquire complexidade quando se tratam dos aspectos econômicos, ambientais, políticos e sociais. A degradação ambiental que afeta a qualidade das águas dos lagos e rios, provenientes do grande desenvolvimento industrial é um fator que atua de maneira negativa no país.

O Brasil é um país privilegiado em recursos hídricos, quanto ao seu volume. Porém, cerca de 73% de água doce encontra-se na região do Amazonas onde se concentra cerca de 5 % da população brasileira. Esta abundância serviu como suporte durante muito tempo, para a cultura do desperdício da água disponível e até hoje não existe um saneamento básico e ambiental adequado, que preserve totalmente este recurso (MONTAGNER, 2007).

Além disso, a qualidade da água é tão importante quanto à quantidade. A água é contaminada muitas vezes em consequência da falha em separar os efluentes do abastecimento de água. A propagação de doenças pela água continua a ser um dos flagelos da humanidade. Em muitas partes do mundo, a necessidade crucial de água limpa é quase sempre negligenciada (SPIRO e STIGLIANI, 2010).

Um dado que pode ser considerado relevante para o entendimento da complexidade que envolve a poluição ambiental é que em março de 2004, quase 23 milhões de substâncias orgânicas e inorgânicas foram indexadas em seu registro CAS, pelo Serviço de Resumos Químicos (Chemical Abstracts Service) da Sociedade Americana de Química (American Chemical Society). Cerca de um terço já estavam comercialmente disponível, o que representou um aumento de 23% durante o período de 9 meses (DAUGHTON, 2004).

Cerca de onze milhões de substâncias químicas são conhecidas em todo o mundo, sendo três mil produzidas em larga escala. Nos Estados Unidos, 1.200 a 1.500 novos registros são feitos a cada ano.

Entre eles, numerosos compostos químicos de uso doméstico, industrial e agrícola possuem comprovada atividade hormonal (FONTENELE *et al.*, 2010).

A grande maioria dos produtos químicos liberados para o ambiente por descargas permitidas são substâncias como: fármacos, agrotóxicos, produtos de higiene pessoal, desinfetantes, detergentes, solventes, entre outros produtos, estão presentes tanto em efluentes industriais quanto em residenciais. Assim, são constantemente inseridos no meio ambiente através de tratamento de água e esgoto, secundariamente, terrestres run-offs (a partir de telhados, calçadas, estradas e terrenos agrícolas) e por deposição atmosférica.

Essas substâncias posteriormente serão consideradas poluentes emergentes ou mais corretamente poluentes de “preocupação emergente” que são aqueles cuja presença tem sido recentemente elucidada, mas que há muito tempo já foram introduzidas, diferente dos poluentes emergentes (aqueles que tem entrada no meio ambiente porque são novos no comércio) (DAUGHTON, 2001).

Os “contaminantes emergentes” possuem como principal característica a de não necessitar a persistência no meio ambiente para poder causar efeitos negativos, visto que suas altas taxas de transformação e de remoção são compensadas pelas suas contínuas introduções e também pela ineficiência na remoção, através dos tratamentos de água existentes atualmente.

O termo emergente reflete apenas um aspecto da questão mais geral em torno da necessidade de minimizar ou prevenir riscos de exposição. Devido a isso, o termo pode deturpar e obscurecer o problema global. Esses riscos provenientes da poluição química podem ser classificados em quatro categorias principais: (1) crescimento/desenvolvimento, (2) escondido/latente, (3) emergente e (4) futuro. Claramente, o termo emergente representa apenas uma das quatro categorias possíveis de riscos de exposição anteriormente não reconhecidos ou imprevistos, mas este termo é, no entanto, usado para englobar todas às quatro categorias (DAUGHTON, 2001).

Uma vez libertados para o ambiente, estes poluentes estão sujeitos a processos que contribuem para a sua eliminação como, por exemplo, a biodegradação, a degradação química e a fotoquímica. Dependendo de onde os produtos químicos sintéticos estão presentes no ambiente (por exemplo, na água subterrânea, na água de superfície e em sedimentos) ou na tecnosfera (por exemplo, estação de tratamento de água (ETA), estação de tratamento de esgoto (ETE) e instalações de água potável), diferentes transformações podem ocorrer. Por exemplo, os produtos de transformação de alguns poluentes são muitas vezes mais persistentes do que os seus compostos correspondentes, além de exibir uma maior toxicidade. Um exemplo disso é o produto principal de biodegradação dos etoxilados de

nonilfenol, o nonilfenol, que é muito mais persistente do que o composto de origem e pode imitar as propriedades estrogênicas (FARRÉ, M. *et al.*, 2008).

Diante da infinidade de novas substâncias que são introduzidas anualmente e da preocupação que elas exibem, em 2007 foi criado na Europa o REACH (*Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*), um regulamento para registro de novos produtos químicos, bem como sua utilização segura. Este sistema foi criado afim de melhorar a proteção à saúde humana e ao meio ambiente através da identificação, melhor e mais precoce das propriedades intrínsecas das substâncias químicas.

Nos EUA, existe a EPA (*Environmental Protection Agency*) que trata os poluentes emergentes como poluentes de preocupação emergente (PEC), uma vez que não são novas substâncias, mas que foram recentemente “descobertos” em corpos d’água, muitas vezes por causa dos avanços das técnicas da química analítica como consequência da obtenção de menores limites de detecção (BENNETT. R. *et al.*, 2008).

Um dos primeiros relatos de poluente emergente foi feito por Garrison e colaboradores em 1976, abordando a presença de um fármaco na estação ETE de um rio localizado em Kansas nos Estados Unidos. O fármaco encontrado por Garrison foi o ácido clofíbrico, onde a concentração detectada foi de $2 \mu\text{g L}^{-1}$ utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.

Um estudo realizado nos Estados Unidos pela USGS (*United States Geological Survey*) fornece um bom exemplo da prevalência de uma vasta gama de PEC em corpos d’água dos EUA, sendo encontrado em 80% dos riachos amostrados. Com o avanço da química analítica, foram usados métodos para documentar a ocorrência do que os autores chamam contaminantes orgânicos de águas residuais, OWCs (*Organic Wastewater Contaminants*), que estão sendo lançados em águas de superfície através das estações de tratamento de águas residuais (ETAR). Os OWCs alvo incluem PPCPs (*Pharmaceuticals and Personal Care Products*), medicamentos veterinários e outros desreguladores endócrinos (KOLPIN, D. *et al.*, 2002).

Diante dessa ameaça potencial associada à contaminação da água, os governos federais e órgãos reguladores promulgaram regulamentos para a água tratada e água potável. Esses regulamentos variam entre países e regiões, principalmente devido a diferenças nos contextos de locais sociais, culturais, econômicos e ambientais.

Na Europa, o conselho da União Européia (UE) implantou diretivas sobre a qualidade da água destinada ao consumo humano, isto é, do Conselho da UE Diretiva 80/778/CEE e 98/83/CE.

(XAGORARAKI e KUO, 2011), exceto para Inglaterra e país de Gales, que desenvolveram um sistema de regulamentação único tripartido, envolvendo a agência do meio ambiente, a DWI (*Drinking Water Inspectorate*) e a Ofwat (*Office of Water Services*).

Nos EUA, em 1974 o Congresso aprovou a SDWA (*Safe Drinking Water Act*), sob a qual a EPA (*Environmental Protection Agency*) ficou encarregada de estabelecer normas de qualidade para a água potável. Atualmente, a USEPA (*United States Environmental Protection Agency*) estabelece padrões que estão divididos em primários e secundários. Adicionalmente, a qualidade da água engarrafada é regulada pela FDA (*Food and Drug Administration*), utilizando padrões da USEPA (EPA, 2012).

No Brasil, os padrões são estabelecidos e controlados pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) e o Ministério da Saúde (MS), onde o estudo, a avaliação e o controle da qualidade das águas de abastecimento no nosso país estão associados fundamentalmente a dois dispositivos legais: a) a Portaria MS no. 2914, de 12 de dezembro de 2011, do Ministério da Saúde, que dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade e cabe também ao Ministério da Saúde, em articulação com as autoridades sanitárias competentes dos estados, Distrito Federal e municípios, a adoção das medidas necessárias ao fiel cumprimento da legislação; b) a Resolução 357/2005 do CONAMA, que define a classificação das águas do território nacional com os objetivos de assegurar seus usos preponderantes, definir o grau de exigência para tratamento de efluentes, facilitar o enquadramento e o planejamento do uso de recursos hídricos, além de criar instrumentos para avaliar a evolução da qualidade das águas e preservar a saúde humana e o equilíbrio ecológico aquático (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Entretanto, no Brasil os estudos sobre poluentes emergentes ou poluentes de “preocupação emergente” ainda são poucos, e diante disso as preocupações em regulamentar novas substâncias também são reduzidas, pois o Ministério da Saúde relatou que são necessários mais estudos que apontem a presença e toxicidade destes contaminantes antes que se possam estabelecer suas quantidades limites, mesmo sabendo que na Europa e EUA a discussão está bem mais avançada.

Segundo uma recente reportagem na revista Veja, que relata a ocorrência de poluentes emergentes no Brasil e sobre a última atualização da lei, cientistas chamaram atenção para a necessidade de controlar alguns dos poluentes emergentes. "Os pesquisadores sempre insistem para que a portaria traga novos parâmetros, enquanto as distribuidoras de água puxam para o outro lado", diz a engenheira Cassilda Teixeira, presidente da Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental (ABES). O fato dos distribuidores serem contra a implementação de novos parâmetros é devido à

necessidade que surgirá para aquisição de novos sistemas para a retirada e controle destes poluentes (VEJA, 2012).

Os chamados PPCPs necessitam de uma atenção privilegiada, pois após serem excretados ou lavados do corpo humano são diretamente descartados para o sistema de esgotos e consequentemente para os cursos de água, principalmente através das águas residuais de efluentes insuficientemente tratadas pelas estações de tratamento de água (ETA) e estações de tratamento de esgoto (ETE).

O fato de que os PPCPs são introduzidos em uma base contínua para o ambiente aquático, através de esgotos tratados e não tratados, dá essencialmente uma qualidade de "persistência" para estes compostos que não apresentam estabilidade inerente ambiental. No entanto, a sua remoção ou transformação (por biodegradação, hidrólise, fotólise, etc) é continuamente anulada pela sua reposição permanente. A Figura 1 apresenta as possíveis rotas pelas quais os fármacos entram no meio ambiente. A falta de dados completos de exposição (o que para o ambiente aquático, em contraste com o ambiente terrestre, por vezes pode ser inferida a partir de simplesmente ocorrência / concentração de dados) é uma limitação fundamental para o avanço da avaliação de riscos (DAUGHTON, 2011).

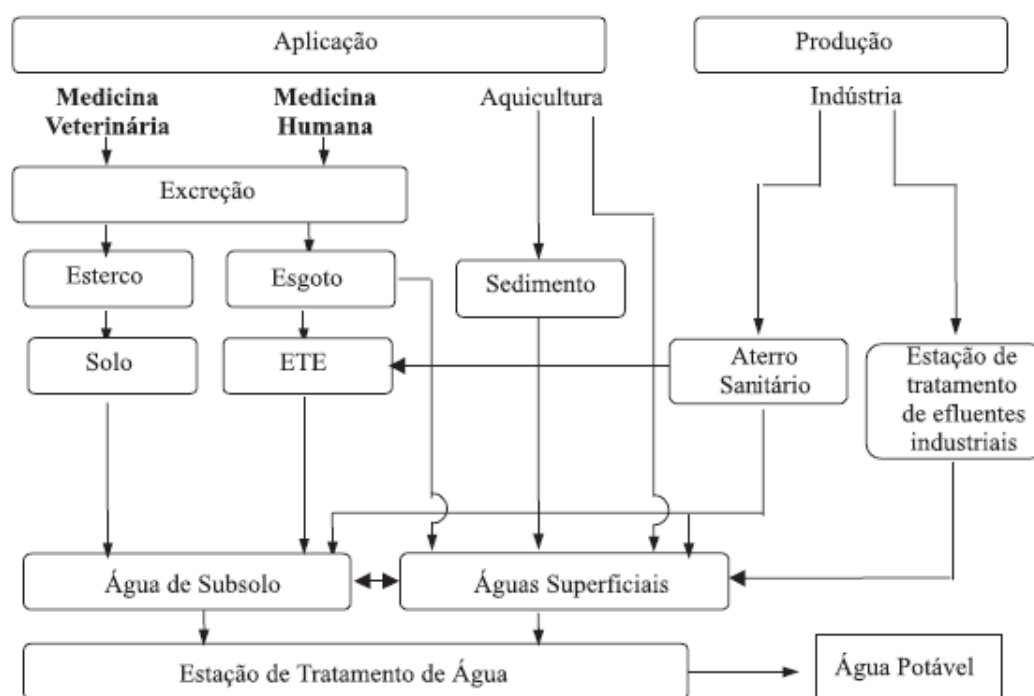


Figura 1 – Possíveis rotas dos fármacos no meio ambiente (BILA e DEZOTI, 2003).

A ocorrência de fármacos residuais no meio ambiente pode apresentar efeitos adversos a organismos aquáticos e terrestres. Esses efeitos podem ser em qualquer nível de hierarquia biológica desde células, órgãos, organismos, população e ecossistema. Alguns destes efeitos podem ser observados em concentrações de ordem de ng L^{-1} (BILA e DEZOTI, 2003).

Na grande maioria dos estudos realizados sobre os efeitos terapêuticos de drogas são baseados na ingestão de curto prazo de doses relativamente elevadas. Pouco se sabe sobre os efeitos potenciais à saúde associados com a ingestão crônica em longo prazo de baixas concentrações através da água potável. Além disso, existe a possibilidade da exposição a fármacos múltiplos, mesmo em baixas concentrações, que podem ter conseqüências sinérgicas para a saúde humana (MAYCOCK e WATTS, 2011).

Os fármacos mais comumente encontrados no meio ambiente, relatado em quase todos os estudos envolvendo o tema de “fármacos em água”, são os pertencentes à classe dos antibióticos (DEBLONDE T. *et al*, 2011; MOMPELAT, S. *et al.*, 2008; MAYCOCK e WATTS, 2011; FRAM e BELITZ, 2011; VERLICCHI, P. *et al.*, 2012). Estes têm diferentes efeitos sobre o meio ambiente, onde um deles é a contribuição no desenvolvimento de bactérias mais resistentes, e há indícios que esta resistência é favorecida por baixas concentrações (BILA e DEZOTI, 2003).

Em março de 2009, na página da EPA, foram relatados dados de uma pesquisa que a agência realizou em amostras de peixe, onde foi confirmada a presença de produtos farmacêuticos e de higiene pessoal nas amostras. Sete compostos farmacêuticos foram detectados nas amostras de tecido e no fígado, enquanto apenas cinco foram detectados em filés. Os produtos farmacêuticos que ocorreram com mais frequência foram difenidramina, norfluoxetina e sertralina. Norfluoxetina e sertralina (antidepressivos) ocorreram nos filés em três e dois lugares, respectivamente. Difenidramina (anti-histamínico) ocorreu em fígados em quatro locais e nos filés em três locais. Dois produtos químicos de higiene pessoal foram detectados nos filés de peixe e em todos os outros cinco locais: galaxolide e tonalide, que são as duas fragrâncias (almíscares) (EPA, 2011).

Em outro estudo foi confirmada a presença de fármacos da classe de inibidores seletivos da recaptação da serotonina: fluoxetina e sertralina e os metabólitos norfluoxetina e desmetilsertralina foram detectados em níveis superiores a $0,1 \text{ ng g}^{-1}$ em todos os tecidos examinados, a partir de peixes residentes em um fluxo de efluentes municipal. As populações de peixes foram coletadas a partir de um fluxo de referência de efluentes dominado no norte do Texas, EUA (BROOKS, B. W. *et al.*, 2005).

O contraceptivo oral sintético (17a-etinilestradiol), por exemplo, ocorre geralmente em baixa concentração (1 a 7 ng L⁻¹) em estações de tratamento de esgotos e efluentes. Estes hormônios sintéticos de esteróides, presentes em pílulas anticoncepcionais, têm uma produção anual de apenas algumas centenas de quilos por ano nos Estados Unidos devido ao fato de, apesar de eficazes, são muito persistentes no meio ambiente. São conhecidos também por serem disruptores/endócrinos que provocam efeitos de feminilização em populações de peixes (MAYCOCK e WATTS, 2011). Na Tabela 1, estão relacionados alguns fármacos detectados em água potável no mundo.

Tabela 1 - Concentração de fármacos detectados em água potável

Fármaco	Grupo	Concentração máxima detectada (ng L⁻¹)	País	Referência
Atenolol	B-bloqueadores	18	USA	Mompelat, Bot e Thomas, 2009
Bezafibrate	Regulador Lipídico	27	Alemanha	Maycock e Watts, 2011
Carbamezepina	Antiepilético	140-258	USA	Mompelat, Bot e Thomas, 2009
		60	Alemanha	
		43,2	França	
		24	Canadá	Maycock e Watts, 2011
Diazepam	Droga Psiquiátrica	0,33	USA	Maycock e Watts, 2011
		10	UK	Maycock e Watts, 2011; Mompelat, Bot e Thomas, 2009
		23,5	Itália	
Diclofenaco	Analgésico	6-35	Alemanha	Mompelat, Bot e Thomas, 2009
		2.5	França	
Fluoxetina	Antidepressivo	0.82	USA	Maycock e Watts, 2011
Fenazona	Antiinflamatório e antipirético	250-400	Alemanha	Mompelat, Bot e Thomas, 2009
Ibuprofeno	Analgésico e antipirético	3	Alemanha	Maycock e Watts, 2011
		120	USA	
		3	Alemanha	Mompelat, Bot e Thomas, 2009
		0.6	França	
		8.5	Finlândia	
Iopamidol	Contraste Raios-X	79	Alemanha	Maycock e Watts, 2011
Meprobamato	Droga Psiquiátrica	42	USA	Maycock e Watts, 2011
Propifenazona	Antiinflamatório e antipirético	80-120	Alemanha	Maycock e Watts, 2011
Sulfametoxazol	Antibiótico	3	USA	Maycock e Watts, 2011

A quantidade de fármacos introduzidos no meio ambiente esta diretamente relacionada com a quantidade de medicamentos fabricados, a frequência e quantidade de dosagem e consumo, na eficiência do metabolismo e da excreção do composto original e dos metabolitos, e capacidade de transformação biológica subsequente ao tratamento de esgoto.

Entre os fatores citados acima, os que são considerados de maior relevância são os de frequência e quantidade de dosagem e consumo de fármacos, visto que o consumo desenfreado de medicamentos vem aumentando com o passar dos anos.

Segundo pesquisa do Instituto Brasileiro de Opinião Pública e Estatística (IBOPE), foi previsto para o ano de 2012 um gasto de R\$ 63,01 bilhões em medicamentos onde, desse total, 51,50% são da região Sudeste, o que totaliza R\$ 32,45 bilhões conforme pode ser observado na Figura 2 (EXAME, 2012).

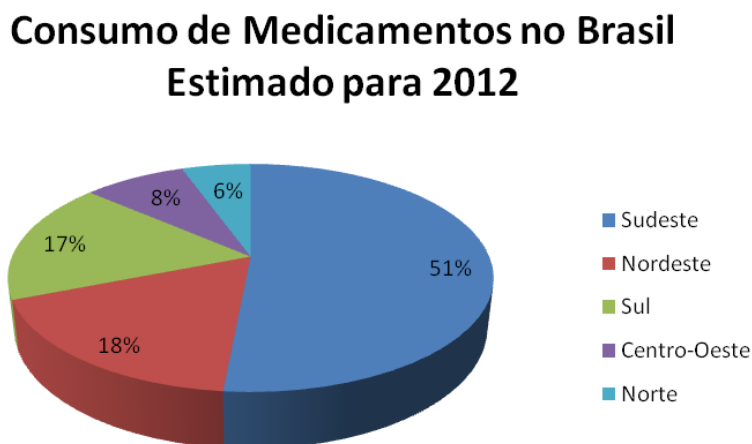


Figura 2 - Consumo de medicamentos no Brasil estimado pela pesquisa IBOPE 2012.

Outro fato também relatado pela pesquisa foi uma análise relacionando o consumo de medicamentos com as classes sociais brasileiras, onde a classe C aparece em 1º lugar seguida pela classe B, conforme é apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 – Potencial Anual de Consumo para Medicamentos por Classe

Classe	Números de Domicílios em Área Urbana	% Domicílios	Potencial de Consumo (R\$ Bilhões)	% Potencial de Consumo
A	1.302.104	2,60	6,55	10,40
B	12.241.533	24,45	23,09	36,65
C	26.226.959	52,38	27,24	43,22
DE	10.303.381	20,58	6,13	9,73
Brasil	50.073.977	100	63,01	100

Fonte: IBOPE, 2012.

Os antibióticos, analgésicos, anti-inflamatórios, hormônios e ansiolíticos, estão na lista dos mais vendidos e, conseqüentemente, mais consumidos pela população brasileira. Estudos mostram os medicamentos mais frequentemente encontrados em águas brasileiras e as suas respectivas concentrações. Na Tabela 3 estão listados alguns destes fármacos.

Entretanto, são poucos os trabalhos que relatam a presença de fármacos em águas no Brasil, possivelmente devido à baixa concentração encontrada e a necessidade de equipamentos e técnicas analíticas mais sensíveis ou também pelo fato de não ter muitos estudos apontando os efeitos da ingestão crônica de baixas concentrações desses medicamentos.

Tabela 3 – Fármacos encontrados em águas brasileiras

Fármaco	Classe	Concentrações médias no ambiente	Condições	Referências
Ac. Clofibrato (metabolito Clofibrato)	Antilipêmico	1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	Esgoto Doméstico	Bila e Dezotti, 2003
		0,02 a 0,03 $\mu\text{g L}^{-1}$	Água superficial	
Benzafibrato	Antilipêmico	1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	Efluente ETE	Bila e Dezotti, 2003
		0,025 $\mu\text{g L}^{-1}$	Água superficial	
		1,2 $\mu\text{g L}^{-1}$	Esgoto Doméstico	
		1,2 $\mu\text{g L}^{-1}$	Esgoto bruto	Melo et. al, 2009
		0,18 $\mu\text{g L}^{-1}$	Água superficial	
Cetoprofeno	Antiinflamatório	0,15 $\mu\text{g L}^{-1}$	Esgoto bruto	Melo et. al, 2009
		0,22 $\mu\text{g L}^{-1}$	Água superficial	
Diclofenaco	Antiinflamatório	0,02 a 0,06 $\mu\text{g L}^{-1}$	Água Superficial	Bila e Dezotti, 2003
		2,9 $\mu\text{g L}^{-1}$	Efluente	Melo et. al, 2009
		1,8 $\mu\text{g L}^{-1}$	Esgoto bruto	
		4,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	Água superficial	
Ibuprofeno	Antiinflamatório	54,2 $\mu\text{g L}^{-1}$	Esgoto bruto	Melo et. al, 2009
		48,4 $\mu\text{g L}^{-1}$	Efluente	
		0,01 $\mu\text{g L}^{-1}$	Água superficial	Bila e Dezotti, 2003
17 α Etinilestradiol	Hormônio contraceptivo	0,005 $\mu\text{g L}^{-1}$	Esgoto Bruto	Melo et. al, 2009
		5,8 $\mu\text{g L}^{-1}$	Esgoto Bruto	
		5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	Efluente	
17 β Estradiol	Hormônio	0,021 $\mu\text{g L}^{-1}$	Esgoto doméstico	Bila e Dezotti, 2003

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral:

Desenvolver e validar um método analítico empregando a extração por DLLME e determinação por HPLC-UV dos benzodiazepínicos bromazepam, clonazepam e diazepam, em amostras de água.

2.2 Objetivos Específicos:

- Fazer a injeção individual dos analitos a fim de obter seus respectivos tempos de retenção;
- Testar diferentes composições de fase móvel para avaliação da melhor separação cromatográfica;
- Otimizar os parâmetros para HPLC-UV;
- Otimizar a metodologia de extração DLLME, e comparar a eficiência quando a introdução do ultrason à técnica;
- Validar a metodologia, avaliando: curva analítica, linearidade, sensibilidade, seletividade, limite de detecção e de quantificação, precisão e exatidão;
- Aplicar o método desenvolvido nas amostras coletadas na represa Billing no município de Diadema-SP;
- Investigar a ocorrência dos fármacos: bromazepam, clonazepam e diazepam nas amostras.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A classe dos benzodiazepínicos

Os benzodiazepínicos (BZPs) clássicos são caracterizados quimicamente pela presença de um anel benzênico fundido nas posições 10 e 11 do anel 1,4-diazepina, como pode ser observado na Figura 3. Todos os BZPs importantes contêm um anel de 5-fenil (em muitos casos, este anel, sofre uma substituição adicional de halogêneo, F, Cl ou Br, na posição-RH), um halogênio ou um grupo nitro na posição-7 (BORGES *et al.*, 2009).

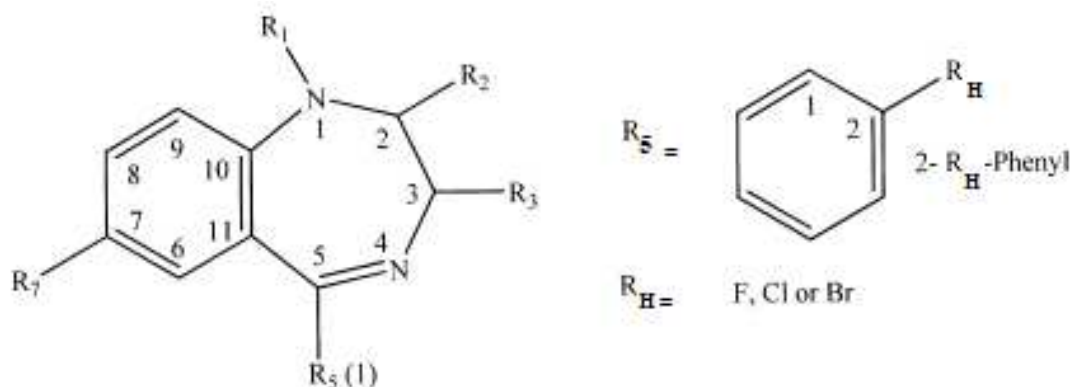


Figura 3 – Estrutura química do Benzodiazepina. (BORGES *et al.*, 2009).

Os benzodiazepínicos são fármacos cuja ação principal é deprimir o Sistema Nervoso Central (SNC), provocando a calma ou sedação, sendo então classificados como sedativo-hipnóticos. Os efeitos mais proeminentes relacionados a esta classe são a sedação, hipnose, diminuição da ansiedade, relaxante muscular e atividades anticonvulsivantes. Estes efeitos são decorrentes da interação entre os receptores de neurotransmissores inibitórios diretamente ativados pelo GABA, mais especificamente com o GABA_A, com os quais são formadas pelo menos cinco famílias diferentes de proteínas que funcionam regulando a abertura e o fechamento dos canais de íons cloretos, responsáveis pela propagação dos estímulos para os neurônios pós-sinápticos (FOSCARINI, 2010).

O Clordiazepóxido foi o primeiro BDZ lançado no mercado (1960), cinco anos após a descoberta de seus efeitos ansiolíticos. Este foi sintetizado pela primeira vez em 1954 pelo químico Leo Henryk Sternbach. Em 1963 foi lançado o Diazepam, seguido pelo Oxazepam e Nitrazepam. O Diazepam ("Valium"), o qual é duas vezes e meia mais potente que o Clordiazepóxido, tornou-se incrivelmente popular nos Estados Unidos, sendo o medicamento mais prescrito no período de 1969 a 1982.

Com o passar dos anos, outros benzodiazepínicos foram sintetizados, sendo que atualmente existem 35 substâncias diferentes disponíveis para uso médico. No Brasil, de acordo com estatísticas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os benzodiazepínicos: Clonazepam, Bromazepam e Alprazolam foram às substâncias controladas mais consumidas pela população brasileira no período de 2007 a 2010. Dentre eles, o mais consumido foi o Clonazepam, este conhecido comercialmente por Rivotril, do qual foram vendidas 10 milhões de caixas em 2010. O segundo foi o Bromazepam com 4,4 milhões de unidades vendidas (2010), seguido pelo Alprazolam, que registrou 4,3 milhões de unidades (2010) (TUOTO, 2009).

3.2 Fármacos selecionados para o estudo.

Os fármacos selecionados para o desenvolvimento do presente estudo foram escolhidos levando em conta o alto crescimento no seu consumo nos últimos cinco anos, sem levar em consideração seu consumo em anos anteriores, ou seja, desde sua sintetização.

Conforme já mencionado, os fármacos da classe dos benzodiazepínicos estão entre os mais consumidos pelos brasileiros, dentre eles destacam-se: Bromazepam, Clonazepam e Alprazolam, diante disso, optou-se pela escolha destes fármacos. Contudo, devido à dificuldade na aquisição do padrão do fármaco Alprazolam o mesmo foi substituído pelo fármaco Diazepam que é um pioneiro na classe dos benzodiazepínicos encontrando-se disponível no mercado desde início da década de 60 e também já possui relatos em recentes pesquisas sobre a presença desse fármaco em amostras de águas ambientais fora do país como pode ser observado na Tabela 1.

3.2.1 Bromazepam

Bromazepam (BRZ), pertence à classe da 1,4-benzodiazepina de compostos ansiolíticos, foi sintetizada pela primeira vez por Fryer em 1964, desde então a sua introdução na prática clínica tem sido amplamente aplicada nas terapias de ansiedade (LE SOLLEU, et al. 1993).

Este composto possui dois substituintes químicos na estrutura da benzodiazepina, um na posição 5-(2-piridina) e a outra na posição 7-bromo. Figura 4.

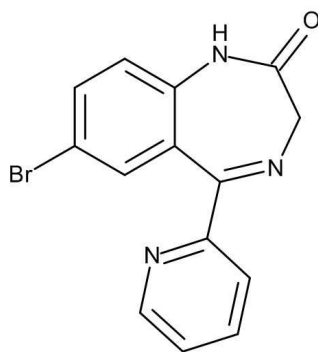


Figura 4 – Estrutura química do Bromazepam.

3.2.2 Clonazepam

Clonazepam (CZP), também pertencente à classe da 1,4-benzodiazepina de compostos ansiolíticos, possui dois substituintes em sua estrutura 1,4 benzodiazepina, um na posição 5-(2-clorofenil) e na posição 7-nitro. Figura 5.

O Clonazepam é comercializado sob o nome comercial de "Klonopin" nos Estados Unidos, de "Rivotril" (Brasil, Portugal, Austrália, Canadá, etc.) e também de "Navotrax". É um derivado clorado do Nitrazepam, possuindo uma meia-vida longa, de 18 a 50 horas. Esta foi a substância controlada mais consumida pela população brasileira no período de 2007 a 2010 com 10 milhões de caixas vendidas em 2010 (TUOTO, 2009).

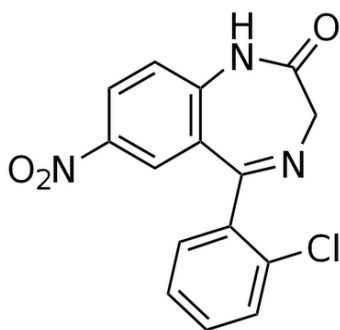


Figura 5 – Estrutura química do Clonazepam.

3.2.3 Diazepam

O Diazepam (DZP) foi lançado em 1963, com o nome comercial de "Valium", foi a segunda benzodiazepina a ser introduzida na prática clínica, depois do clordiazepóxido, e ainda hoje é uma das drogas mais prescritas desta classe (MERCOLINI *et. al*, 2009). Sua estrutura 1,4 benzodiazepina possui substituições nas posições, 1- metil, 5-fenil e 7-cloro. Figura 6.

O Diazepam, que é duas vezes e meia mais potente que o clordiazepóxido, tornou-se incrivelmente popular nos Estados Unidos, sendo o medicamento mais prescrito no período de 1969 a 1982.

O Diazepam atingiu um pico de vendas em 1978 de 2,3 bilhões de comprimidos, o que contribuiu para transformar o laboratório Rochê em um gigante da indústria farmacêutica. A substância faz parte da "Relação de Medicamentos Essenciais" da Organização Mundial da Saúde (TUOTO, 2009).

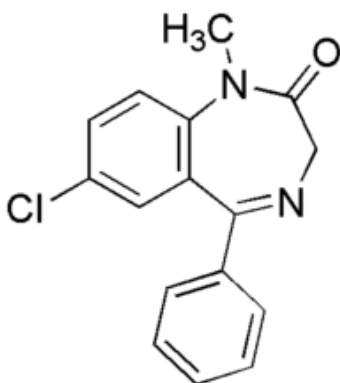


Figura 6 – Estrutura química do Diazepam

3.3 Propriedades Físico-Químicas

O comportamento e o destino dos compostos químicos no meio ambiente são influenciados por suas propriedades físico-químicas, tais como a solubilidade, polaridade e volatilidade. O grupo funcional e o caráter ácido-base são de grande importância na otimização do método de extração e da análise cromatográfica.

3.3.1 Solubilidade

É definida como a máxima concentração de uma substância química que pode ser dissolvida em um determinado solvente, em condições tais que inexistam outros compostos e de forma que o único equilíbrio existente seja aquele entre a substância e solvente em questão.

Dados disponíveis sobre a solubilidade dos compostos são apresentados na sua grande maioria em relação à água. Isso auxilia a indicar se a extração no meio aquoso será fácil, difícil ou impossível e um composto é considerado pouco solúvel quando a solubilidade em água é inferior a 0,5-1,0 mg L⁻¹.

3.3.2 Constante de ionização ácido-base (Ka) e pKa

É considerada de grande importância a capacidade de ionização em meio aquoso, que em geral possui um pH em torno de 5-8. As substâncias ácidas, com valores de pKa inferiores a 3-4, apresentam pH em torno de 5-8 e dispõem de maior mobilidade em meio aquático. As de pKa superior a 10 são consideradas substâncias com tendência a ficarem retidas no solo. Assim, conhecer o pKa dos compostos de interesse é útil na hora de selecionar o pH mais adequado para a extração e posterior análise.

3.3.3 Pressão de vapor

É definida como a pressão na qual uma substância coexiste em equilíbrio com sua fase líquida ou sólida. As substâncias voláteis apresentam pressões de vapor elevadas.

Considerando a importância destas propriedades para análise de compostos em matrizes ambientais aquosas, foi esquematizada a Tabela 4 abordando estas propriedades.

Tabela 4 – Propriedades Físico-Químicas dos fármacos estudados

Analito	Pressão de Vapor (mmHg) 25°C	Solubilidade em água (g L ⁻¹) 25°C	pKa (25°C)
Bromazepam	4,06 10 ⁻⁴	5,4 10 ⁻¹	pKa ₁ = 2,9 pK ₂ = 11,0
Clonazepam	7,10 10 ⁻⁵	1,4 10 ⁻¹	pKa ₁ = 1,5 pKa ₂ = 10,5
Diazepam	2,26 10 ⁻⁴	1,6 10 ⁻¹	3,3

3.4 Métodos Analíticos

Atualmente existe disponível na literatura uma infinidade de métodos analíticos empregados para a determinação de poluentes. (LOCATELLI, SODRÉ e JARDIM, 2011; RODIL, *et al.* 2009; MADUREIRA, *et al.* 2009; GUITART e READMAN, 2010; YU e WU, 2012). Dentre esses poluentes, destacam-se os fármacos que recentemente vêm recebendo bastante atenção de pesquisadores da área.

Desta forma, houve um aumento significativo da necessidade no desenvolvimento de métodos analíticos cada vez mais sensíveis para identificar e quantificar estes compostos, necessitando limites de concentrações na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} .

Dentre as técnicas mais utilizadas para análise de fármacos em água, está a cromatografia, que é sem dúvida a principal.

A cromatografia gasosa foi amplamente empregada utilizando os mais diversos tipos de detecções, como detecção por captura de elétrons (ECD), detecção por ionização em chama (FID) e o principal deles, a espectrometria de massas (MS) (GUITART e READMAN, 2010; YU e WU, 2012; KOUTSOUBA *et al.*, 2003; DARIAS *et al.*, 2010; VARGA *et al.*, 2010; BISCEGLIA *et al.*, 2010; LIN, CHEN e DING, 2005).

Entretanto, a derivatização é necessária para análise por cromatografia gasosa de fármacos, devido à grande maioria dos fármacos possuírem propriedades físico-químicas, como a instabilidade térmica e baixa pressão de vapor, o que impossibilita as análises por cromatografia gasosa sem derivatização.

No trabalho de YU e WU (2012), foi desenvolvido um método para análise de disruptores endócrinos (bisfenol A, estrona, nonilfenol e octilfenol) fármacos e produtos de higiene pessoal (ácido acetilsalicílico, carbamazepina, ácido clofibrílico, diclofenaco, ibuprofeno, gemfibrozil, cetoprofeno, naproxeno, paracetamol e triclosan). Estes foram analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, mas antes a derivatização dos analitos com n-tercbutildimetilsilil-n-metiltrifluoracetamida foi necessária.

Carlos e Readman (2010), também desenvolveram um método para a determinação de poluentes onde alguns deles são fármacos como diclofenaco, fenoprofeno, naproxeno, ácido tolfenâmico, gemfibrozil, ácido clofibrílico, ibuprofeno, ácido acetil salicílico, acetaminofeno e cetoprofeno. A análise foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas após a

derivatização com n-tercbutildimetilsilil-n-metiltrifluoracetamida sem 1% de terc-butildimetilhidroclorosilano.

A derivatização supera o problema para alguns casos, mas o tempo de preparação aumenta no processo e especialmente com grande quantidade de amostra, muitas vezes tornando esta opção inviável.

Na Figura 7, podemos observar a faixa de aplicação da Cromatografia Gasosa (GC) e da Cromatografia de Alta Eficiência (HPLC) para a determinação de compostos.

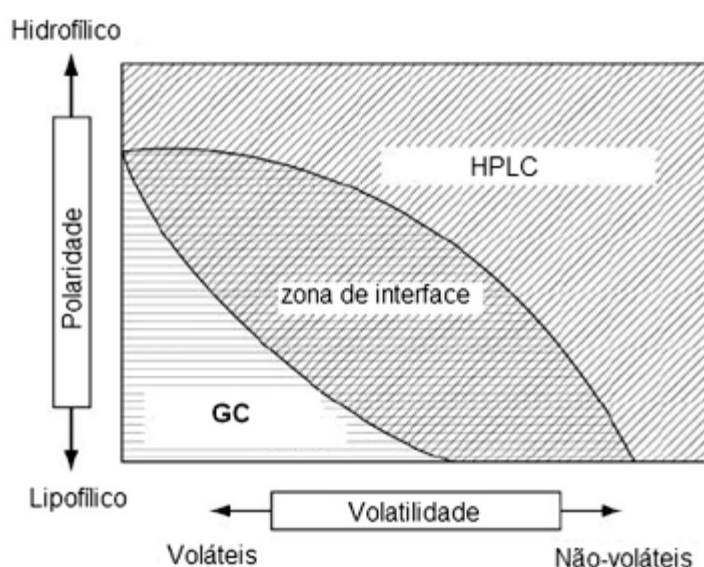


Figura 7 – Faixa de aplicação do GC e do HPLC para determinação de poluentes orgânicos emergentes baseados em suas propriedades físico-químicas de polaridade e volatilidade. (SILVA e COLLINS, 2011).

Através da Figura 7, percebemos que a técnica empregando HPLC é a mais adequada para compostos orgânicos que apresentam polaridade mais alta, volatilidade baixa e instabilidade térmica, que são características de alguns fármacos.

A cromatografia líquida de alta eficiência com espectrometria de massas (MS), com detector de arranjo de díodos (DAD) e de ultravioleta (UV) são os mais comuns para este fim, mais uma vez destacando a espectrometria de massas, por possuir alta seletividade e baixos limites de detecção

(PETROVIC, *et al.*, 2005; MAGNÉR, FILIPOVIC e ALSBERG, 2010; MADUREIRA, *et al.*, 2009; RODIL, *et al.*, 2009; AL-ODAINI, *et al.*, 2010; CONLEY, *et al.*, 2008; PATROLECCO, *et al.*, 2013).

Rodil *et al.* (2009), desenvolveram e validaram um método para a determinação simultânea de 53 poluentes orgânicos emergentes em amostras de água usando a técnica de extração SPE (*Solid Phase Extraction*) e LC-MS/MS (*Liquid Chromatography - Mass Espectrometry tandem Mass Espectrometry*) para identificação e posterior quantificação. Dentre os seus analitos encontram-se alguns fármacos (carbamazepina, ibuprofeno, diclofenaco, fenoprofeno, etc), que foram extraídos por SPE com um volume de amostra variando de 200 a 500 mL com pH ajustado em 7, e utilizando cartuchos Oasis HLB de 200 mg. A precisão do método calculando o desvio padrão relativo foi abaixo de 15% para todos os compostos e todas as matrizes testadas. O limite de detecção do método variou de 0,3 ng L⁻¹ a 30 ng L⁻¹. Os mesmos autores aplicaram o método em amostras de água e esgoto onde foram detectados compostos em concentrações de 10 µg L⁻¹ e 0,3 µg L⁻¹. Contudo, devido ao alto custo para aquisição de um equipamento com esta tecnologia, longo tempo no preparo das amostras e a necessidade de um operador qualificado, podem ser considerados desvantagens para alguns pesquisadores. Desta forma, a busca por técnicas de preparo de amostras que pré-concentrem o analito de interesse, pode ser uma alternativa para análises em baixas concentrações com equipamentos mais simples.

3.4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A cromatografia líquida de alta eficiência é um importante membro de toda uma família de técnicas de separação, uma vez que consegue separar misturas que contêm um grande número de compostos similares. Vários nomes têm sido utilizados para denominar essa técnica de cromatografia líquida: alta velocidade, alta pressão, alto desempenho, alta resolução e alta eficiência. A HPLC tem capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande variedade de compostos presentes em diversos tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e detectabilidade. A Figura 8 ilustra um sistema cromatográfico LC.

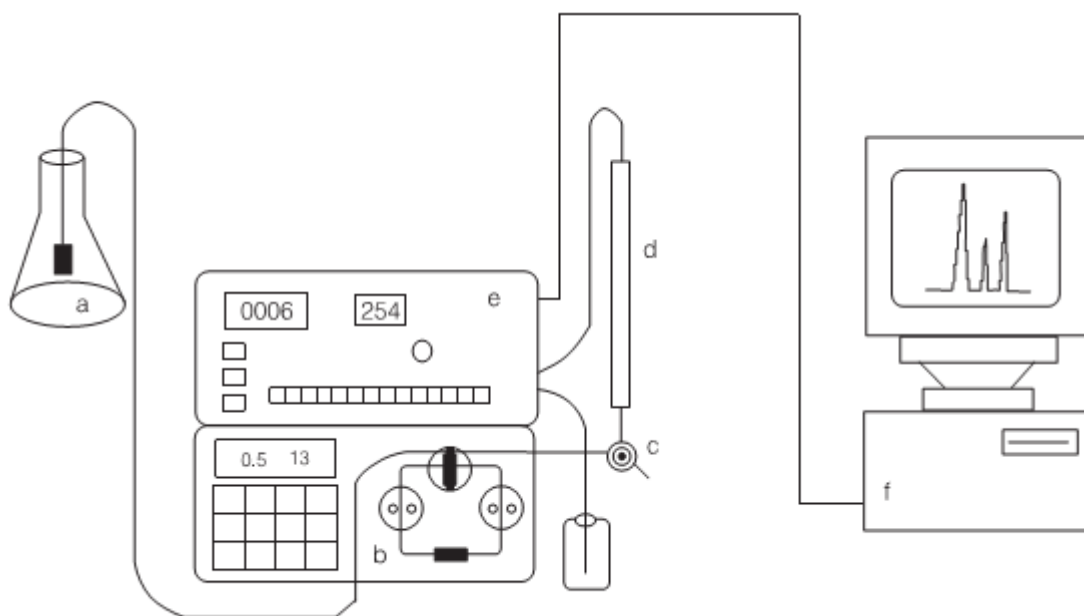


Figura 8 - Equipamento básico de um HPLC. a) reservatório da fase móvel; b) bomba de alta pressão; c) válvula de injeção; d) coluna; e) detector e f) registrador (DEGANI, CASS e VIEIRA, 1998).

O equipamento utilizado possui um reservatório que contém fase móvel, injetor para introduzir a amostra no sistema, coluna cromatográfica para a separação dos compostos, bomba de alta pressão para eluição de fase móvel, detector e sistema de processamento de dados.

O HPLC apresenta como vantagens: alta resolução, ou seja, é possível análise de compostos presentes em misturas complexas, boa análise qualitativa, na qual comparamos os tempos de retenção dos analitos; tempo reduzido de análise, separações podem ser realizadas em poucos minutos; boa análise quantitativa, pois são de fácil execução e apresentam grande precisão nos resultados; boa detectabilidade, permitindo medidas ao nível de até 10-12 pg (picogramas) e é uma técnica versátil, podendo ser aplicada tanto para compostos orgânicos como inorgânicos, amostras líquidas ou sólidas, iônicas ou covalentes, baixa ou alta massa molar.

Como toda técnica apresenta suas limitações, o HPLC possui alto custo da instrumentação e operação e o operador do equipamento deve ter considerável experiência no seu manuseio.

3.4.2 Detector Ultra Violeta (UV)

O funcionamento dos detectores espectrofotométricos baseia-se na absorvância da luz por parte da amostra, ao passar através dela qualquer radiação eletromagnética, que estão entre as regiões do ultravioleta (UV) e visível (vis). A maioria das substâncias absorve radiação UV, na qual se inclui substâncias que apresentam elétrons π e elétrons desemparelhados.

No presente trabalho foi utilizado detector UV, desta forma, as substâncias são eluídas pela coluna e absorvem radiação, resultando em alterações mensuráveis no nível de energia, nas quais podem ser detectadas.

3.5 Técnicas de pré-concentração e extração

Existe uma infinidade de métodos analíticos utilizados para a detecção de resíduos de fármacos em amostras ambientais de água, sendo que a mais comumente utilizada, e já mencionada anteriormente, é a cromatografia acoplada com espectrometria de massas (GUITART e READMAN, 2010; YU e WU, 2012; KOUTSOUBA *et al.*, 2003; DARIAS *et al.*, 2010; VARGA *et al.*, 2010; BISCEGLIA *et al.*, 2010; LIN, CHEN e DING, 2005; LOCATELLI, SODRÉ e JARDIM, 2011; RODIL, *et al.*, 2009; MADUREIRA, *et al.*, 2009).

A dificuldade na análise de resíduos de fármacos em amostras de água é a baixa concentração que se encontram estes compostos, que chega a uma faixa de 10 a 100 ng L⁻¹. Desta forma, um novo método rápido e preciso, de *clean-up* e pré-concentração de amostras são necessários para a análise de fármacos no nível de traços.

A extração em fase sólida é rotineiramente usada como etapa de *clean-up* e pré-concentração em análises de amostras biológicas e ambientais. Comparada com a LLE (*Liquid-Liquid Extraction*), a SPE tem vantagens como simplicidade, rapidez e baixo consumo de solventes orgânicos. Entretanto, a falta de seletividade nos sorventes genéricos, a facilidade com a qual são sujeitos a interferências por substâncias não desejadas com características similares e o alto custo dos cartuchos são consideradas desvantagens deste método.

Recentes pesquisas têm orientado no desenvolvimento de eficiência, economia e minituarização no preparo de amostras. Como resultado, temos a LPME (*Liquid Phase Micro Extraction*) e a SPME (*Solid Phase Micro Extraction*). Comparando com a LLE, a SPME é uma técnica livre de solvente que inclui simultâneas extrações e pré-concentrações de analitos em amostras aquosas e ou amostras “*Headspace*”. Entretanto, este método é considerado caro, sua fibra é frágil, tem um tempo de vida limitado e o efeito “*carry-over*” da amostra pode ser um problema.

A LPME foi desenvolvida como um procedimento de pré-tratamento da amostra com uso de solvente minimizado e que não é caro. Neste método a quantidade de solvente utilizada é mínima e, conseqüentemente, a exposição a solventes orgânicos tóxicos também é reduzida. Entretanto, este método tem algumas desvantagens, como a rápida agitação que pode causar a formação de bolhas de ar, o tempo necessário para a extração e o equilíbrio pode não ser alcançado depois de um longo tempo na maioria dos casos.

Recentemente, uma nova técnica de microextração denominada DLLME (*dispersive liquid-liquid micro extraction*), foi desenvolvida por Rezaee e colaboradores (2006) para determinação de compostos orgânicos em amostra de água, que se baseia em uma mistura ternária homogênea de solventes. Neste método uma mistura apropriada de solvente extrator e solvente dispersor é injetada rapidamente numa amostra aquosa com auxílio de uma seringa e posteriormente a fase extratora é formada. O analito contido na amostra é extraído pelas pequenas gotículas formadas pelo solvente extrator. Após a extração e separação da fase sedimentada por centrifugação, o analito enriquecido na fase sedimentada é determinado por métodos cromatográficos e espectrométricos. As vantagens dos métodos desenvolvidos com DLLME são: simplicidade, rapidez, baixo custo, alta recuperação e elevado fator de enriquecimento. Devido às vantagens apresentadas por este método, inúmeros trabalhos vêm aplicando a DLLME na determinação de traços de compostos nas mais diversas matrizes (XIONG, *et al.*, 2009; HERRERA-HERRERA *et al.*, 2013; BIPARVA, EHSANI e HADJMOHAMMADI, 2012; RANJBARI, GOLBABANEZHAD-AZIZI e HADJMOHAMMADI, 2012).

No trabalho de Melwanki *et al.* (2009), uma técnica utilizando a DLLME junto a LC-MS/MS foi desenvolvida e aplicada para a determinação de 7-aminoflunitrazepam, um metabólito do hipnótico flunitrazepam em amostras de urina. O método foi baseado na formação de pequenas gotículas de um solvente extrator (diclorometano) dissolvido em um solvente orgânico miscível em água, o dispersivo (isopropanol) injetado em uma amostra de água. Primeiro, a fase orgânica extratora foi separada por

centrifugação e transferida para um vial de 300 μL e posteriormente evaporada. O resíduo foi ressuspensionado em 30 μL de fase móvel (20:80 acetonitrila: água) e 20 μL foi coletado e injetado no LC-MS/MS. Os vários parâmetros que afetam a eficiência da extração foram avaliados. A linearidade do método, obtida através do coeficiente de correlação (r) foi de 0,988, onde as concentrações das curvas variaram de 0,05 – 2,5 ng mL^{-1} . O limite de detecção foi 0,025 ng/mL e o fator de enriquecimento igual a 20.

Liu et al. (2010) desenvolveram uma técnica utilizando a DLLME e posterior análise por GC-ECD, que mostrou ser simples, rápido e sensível para identificar quatro piretróides (fenpropatrin, cialotrin, permetrina e tau-fluvalinato) em amostras de água. O método baseou-se na mistura de 8 μL de 1-dodecanol e 500 μL de metanol, a mistura foi injetada rapidamente em 5 mL da amostra contendo 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ de solução padrão, e depois foi centrifugada a 3500 rpm por 2 minutos. Neste método, uma etapa adicional foi realizada baseando na solidificação da gota imergindo em um recipiente contendo gelo. Foi coletado 1 μL de amostra e injetado no GC para análise. O método apresentou limites de detecção que variaram de 1,4 a 2,9 ng L^{-1} e a recuperação variou de 5,1 a 4,8%.

3.6 Princípios da microextração dispersiva líquido-líquido.

A DLLME é uma técnica de extração e pré-concentração de amostras que atende a requisitos de miniaturização, baixo custo, rapidez e eficiência de extração com alto potencial para aplicação direta em campo (MARTINS, *et al.*, 2012).

A técnica baseia-se na utilização de uma mistura contendo um solvente dispersor miscível no solvente extrator (fase orgânica) e na amostra (fase aquosa), bem como um solvente extrator imiscível na fase aquosa (MARTINS, *et al.*, 2012). A mistura de solventes é introduzida na amostra em um tubo cônico, conforme ilustrado na Figura 9, onde ocorre a extração dos analitos por partição e após, a mistura é centrifugada. O solvente extrator sedimentado no fundo é coletado e analisado. Devido a grande área interfacial entre o solvente extrator e a amostra aquosa, o equilíbrio é atingido rapidamente e a extração é independente do tempo, sendo esta a principal vantagem do método (MARTINS, *et al.*, 2012). O processo que envolve a DLLME é a partição dos analitos entre as duas fases líquidas imiscíveis.

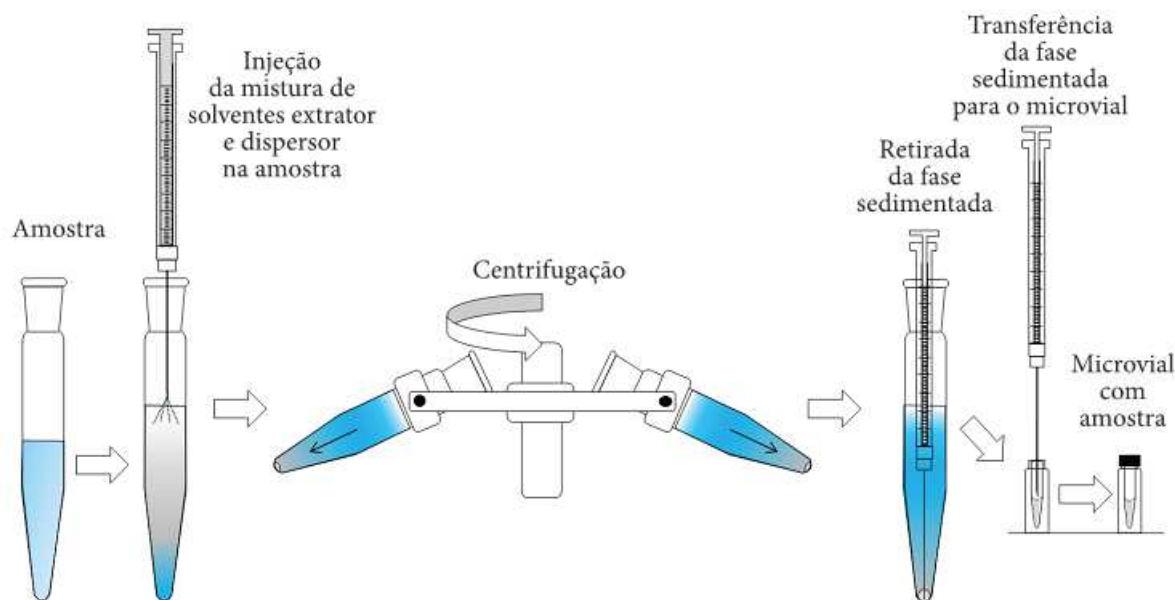


Figura 9 – Esquema representativo das etapas envolvidas no processo de extração DLLME (MARTINS, *et al.*, 2012).

Na DLLME, os fatores que afetam na eficiência da extração são: (1) tipo do solvente extrator, (2) tipo do solvente dispersor, (3) volume do solvente extrator e do dispersor, sendo que a escolha do solvente extrator ideal é o maior parâmetro em DLLME. O volume do solvente extrator tem importante efeito no fator de enriquecimento (*Enrichment Factor* - EF), ou seja, com o aumento do volume de solvente extrator, consequentemente vamos obter um aumento no volume da fase sedimentada e um decréscimo no EF. Já o volume do solvente dispersor afeta diretamente na formação das “gotículas” e também no volume da fase sedimentada. Os fatores que influenciam o volume da fase sedimentada são: (1) solubilidade do solvente extrator em água, (2) volume da amostra, (3) volume do solvente dispersivo e (4) volume do solvente extrator (REZAEI, *et al.*, 2010).

O fator de enriquecimento é definido pela razão entre a concentração do analito na fase sedimentada (C_{sed}) e a concentração inicial do analito na amostra (C_0), de acordo com a equação 1.

$$EF = \frac{C_{sed}}{C_0} \quad (1)$$

Onde:

A recuperação da extração (*Extraction Recovery* - ER) é definida pela concentração do analito na amostra aquosa (n_0), e a concentração do analito na fase sedimentada (n_{sed}) conforme a equação 2.

$$ER = \frac{n_{sed}}{n_0} \times 100 \quad (2)$$

3.6.1 DLLME combinada com HPLC-UV.

Em geral, a técnica de HPLC é amplamente usada como uma ferramenta de quantificação e separação versátil, sendo importante a seleção de um solvente extrator para DLLME compatível com a fase móvel da técnica de HPLC. Entretanto, hidrocarbonetos halogenados, como cloroetileno, tetracloroetileno, tetracloreto de carbono e clorofórmio, usualmente selecionados como solventes extratores em DLLME, não são compatíveis com a fase móvel do sistema fase reversa do HPLC, por causa da sua alta densidade. Assim, uma etapa extra é necessária para a evaporação deste solvente.

Em 2009, Rezaee *et al.*, aplicaram sua técnica (DLLME) combinada com HPLC-UV para análise de bisfenol A em água. Uma mistura apropriada de acetona (solvente dispersor) e clorofórmio (solvente extrator) foi injetada rapidamente na amostra contendo bisfenol A. Depois da extração a fase sedimentada foi analisada por HPLC-UV. Em condições ótimas (solvente extrato: 142 μL , solvente dispersor: 2,0 mL, e adição de sal), a curva de calibração foi linear para a faixa de 0,5 – 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ com limite de detecção de 0,07 $\mu\text{g L}^{-1}$. O desvio padrão relativo ($n=5$) para a extração e determinação de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de bisfenol A, foi de 6,0%. Os resultados apresentados pelo trabalho de Rezaee mostram que a DLLME é muito simples, rápida e sensível.

Rezaee e colaboradores (2009) compararam a DLLME com as técnicas de pré-concentração mais utilizadas entre elas estão: LPME, SPME e SBSE (do inglês, *Stir Bar Sorptive Extraction*). Esta comparação aborda limite de detecção, faixa linear, recuperação, tempo de extração e volume de amostra, conforme pode ser observada na Tabela 5.

Tabela 5 – Comparação de DLLME-HPLC-UV com outros métodos similares (REZAEI et al., 2009)

Métodos	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Faixa Linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Tempo de Extração (min.)	Volume de Amostra (mL)
LPME com derivatização GC-MS	0,2	1-1000	90	10
LPME com derivatização in-situ GC-MS	0,002	0,01-10	90	10
SBSE com derivatização GC-MS	0,5	2-100	45	2
SBSE com derivatização in-situ GC-MS	0,005	0,02-10	45	2
SPME-GC-MS	0,04-1	0,027-195	60	10
SPME-HPLC	0,9	10-500	20	10
DLLME-HPLC	0,07	0,5-100	<3 (equilíbrio)	10

Os resultados apresentados na Tabela 5 mostram que o tempo de extração na DLLME é realmente muito pequeno, com duração de aproximadamente 3 minutos, enquanto SPME, LPME e SBSE levam em torno de 20 a 90 minutos. O mais importante é o limite de detecção atingido com a técnica de $0,07 \mu\text{g L}^{-1}$.

Diante disso, e de uma infinidade de outros trabalhos utilizando a técnica DLLME combinada com HPLC-UV nas análises de compostos nas mais diversas matrizes, tendo ótimos resultados e alcançando baixos limites de detecção, conforme apresentado na Tabela 6, no presente estudo foi desenvolvido um método analítico para investigação dos fármacos: bromazepam, clonazepam e diazepam em amostras de água utilizando DLLME combinada com HPLC-UV.

Tabela 6 - Aplicações da DLLME com HPLC

Analitos	Matriz	Solvente Extrator (volume)	Solvente Dispersivo (volume)	Fator de pré-concitração	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)	Referências
Clenbuterol	Água	25 μL tetracloroetileno	0.50 mL acetona	175	4,9	-	Rezaee, Yamini e Faraji, 2010
Ácidos oxiacéticos clorofenil	Água	tetracloroetileno	THF	131-156	2,3-3,3		Rezaee, Yamini e Faraji, 2010
Herbicidas do grupo das fenilureias	Água	60 μL diclorometano	1,0 mL THF	68-126	0,10-0,28	91,2-104,1	MARTINS, <i>et al.</i> , 2012
Organofosforados	Água e frutas	0,062 g	0,5 mL metanol	300	0,01-0,05	92,7-109,1	MARTINS, <i>et al.</i> , 2012
Parabenos	Panquecas	100 μL 1-octil-3-metilimidazolium hexafluorofosfato	100 μL Acetonitrila	68,2-90,4	1,0-1,5	60,1-79,5	MARTINS, <i>et al.</i> , 2012
Colesterol	Leite, ovos e azeite	35 μL tetracloreto de carbono	0,8 mL etanol	-	0,01	95,0-105,0	MARTINS, <i>et al.</i> , 2012
Atrazina	Água	60 μL tetracloreto de carbono	550 μL metanol	-	0,601	-	Rezaee, Yamini e Faraji, 2010

Tabela 6 – Continuação...

Analitos	Matriz	Solvente Extrator (volume)	Solvente Dispersivo (volume)	Fator de pré-concetração	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)	Referências
Diclorodifenil	Água	50 μL tetracloreto de carbono	600 μL acetonitrila	-	0,32-0,51	-	Rezaee, Yamini e Faraji, 2010
Psychotropic drugs	Urina	20 μL tetracloreto de carbono	0,5 mL acetonitrila	-	7,0-25,0	96-101	Xiong et al., 2009
Antioxidantes sintéticos	Suco	200 μL 2-etil-1-hexanol	50 μL acetona	203-208	0,5-2,5	-	Biparva, Ehsani e Hadjmohammadi, 2012
Piretróides	Suco	300 μL clorofórmio	1,25 mL metanol	62-84	2,0-5,0	-	Boonchiangma, Ngeontae e Srijaranai, 2012

3.7 Parâmetros cromatográficos

Para verificar se o método cromatográfico desenvolvido apresenta as condições necessárias para determinação dos compostos de interesse, e para avaliação dos parâmetros cromatográficos, são empregados fatores como resolução (Rs), fator de separação (α) e fator de retenção (k), que são descritos a seguir.

3.7.1 Resolução (Rs)

A resolução é um fator que se refere à distância entre 2 picos adjacentes e que pode ser obtida pela equação 3:

$$Rs = 2 \frac{(t_{r2} - t_{r1})}{(w_{b2} + w_{b1})} \quad (3)$$

Onde:

t_{r1} e t_{r2} = são os tempos de retenção de 2 picos adjacentes;

w_{b1} e w_{b2} = largura dos picos na base, em unidades de tempo.

Quando $Rs = 1$, os dois picos estão razoavelmente separados, com somente 2% de superposição se as quantidades dos dois componentes forem iguais. Maiores valores de resolução indicam melhor separação, assim $Rs = 1,25$ é suficiente para fins quantitativos e $Rs > 1,5$ indica a separação completa dos compostos (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006).

3.7.2 Fator de retenção (k)

O fator de retenção (k) de um composto é determinado pela razão das quantidades e/ou tempo das suas moléculas que ficam retidas na fase estacionária com aquelas que ficam percorrendo na fase móvel. Este termo pode ser calculado pela equação 4.

$$k = \left(\frac{t_r - t_m}{t_m} \right) \text{ ou } \left(\frac{t'_r}{t_m} \right) \quad (4)$$

Onde:

t_r = tempo de retenção do composto;

t_m = tempo de retenção de um composto não retido;

t'_r = tempo de retenção ajustado.

Os valores ideais para k devem variar de 1 e 10 e quando se tratar de múltiplos componentes são aceitos valores de 0,5 e 20. Quanto maior o valor de k, maior é o tempo que um analito fica retido na coluna, assim valores superiores a 20, os tempos de retenção tornam-se exageradamente longos para serem aplicados experimentalmente (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006).

3.7.3 Fator de separação (α)

O fator de separação (α) assim como a resolução (R_s), relaciona a separação de 2 picos adjacentes, entretanto esta mede a seletividade de um método cromatográfico. Quanto mais seletivo for a retenção pela fase estacionária para o segundo composto, maior será o fator de separação. O cálculo necessário para determinar este valor está descrito na equação 5.

$$\alpha = \left(\frac{k_2}{k_1} \right) \text{ ou } \frac{t'_{r2}}{t'_{r1}} \quad (5)$$

Se $\alpha = 1$, não há separação entre os picos e quando $\alpha > 1$, não se pode confirmar a separação dos picos, pois este dependerá da largura de suas bandas. Entretanto, valores elevados de α são esperados para a indicação de uma boa separação cromatográfica.

3.8 Validação Analítica

A validação analítica se faz necessária, toda vez que se deseja mostrar a qualidade das medições químicas obtidas em um novo método desenvolvido. A fim de assegurar a confiabilidade destes resultados, são delineados certos procedimentos de validação do processo analítico empregado, como garantia da qualidade das medições químicas, através da sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade.

São várias as definições existentes para o termo validação de métodos analíticos. Dentre elas destacam-se as definidas pelas agências credenciadas no Brasil, para verificar a competência de laboratórios de ensaios, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia), abaixo descritas:

“A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados” (ANVISA).

“A validação segundo a ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005, é uma demonstração de que um método é adequado ao uso pretendido” (INMETRO).

Os parâmetros para a validação são definidos por cada organização responsável, seja ela nacional ou internacional, cada uma com seu documento oficial (guia). A ANVISA disponibiliza a RE N° 899 de 29 de maio de 2003, e o INMETRO o DOQ-CGCRE-008 de março de 2003. Em outros países, podemos citar os guias da International Conference on Harmonization (ICH), da Eurachem e da Association of Analytical Communities (AOAC).

Os guias da ICH e da ANVISA estabelecem parâmetros referente à validação de métodos para determinação de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos. Ao comparar estes dois guias é facilmente observado que o guia da ANVISA, é a versão em português do guia da ICH, apresentando os mesmo critérios para validação (MAGALHÃES, 2011).

Já os guias da Eurachem e AOAC estabelecem parâmetros para validação de métodos para análise de diversos compostos nas mais diversas matrizes. O guia da INMETRO apresenta diretrizes semelhantes ao da Eurachem, diferindo somente num menor número de ensaios.

No Brasil, não existe um guia específico relacionado à validação de métodos para análise de fármacos em amostras de água, desta forma no presente trabalho serão considerados os parâmetros apresentados pelas agências da ANVISA e INMETRO, que são também algumas vezes apresentados como figuras de mérito (seletividade, linearidade e faixa de trabalho, precisão exatidão, robustez, limite de detecção e quantificação).

3.8.1 Seletividade

A seletividade é um parâmetro de grande importância na análise de amostras complexas. A seletividade corresponde à capacidade de um método em determinar um analito de maneira inequívoca na presença de outras substâncias suscetíveis de interferirem na determinação (LANÇAS, 2004).

A seletividade em cromatografia é obtida otimizando-se as condições analíticas (fase móvel, temperatura da coluna, fase estacionária, etc.). A verificação da seletividade de métodos cromatográficos pode ser feita através da simples observação de picos na região do tempo de retenção do analito de interesse, injetando-se um branco obtido com a mesma matriz a ser analisada. Neste caso, devem-se empregar várias amostras, e a ausência de picos próximos ao tempo de retenção do analito de interesse deve ser constatada (LANÇAS, 2004).

Entretanto, para algumas matrizes mais complexas, somente este critério pode não ser suficiente, pois a coeluição dos analitos de interesse com componentes endógenos da matriz podem ocorrer. Para tanto, é conveniente a utilização de testes de pureza de pico com auxílio de detectores de arranjo de diodos ou espectrômetro de massas.

3.8.2 Linearidade, faixa linear de trabalho

Linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito questão, dentro de uma determinada faixa de aplicação determinada faixa linear de trabalho (BOTTOLI, *et al.*, 2004).

A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito e verificada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados. Para tal, deve ser verificada a ausência de valores discrepantes para cada nível de concentração, antes de fazer a regressão linear (INMETRO, 2011). Em geral, são necessários vários pontos de calibração para a construção do gráfico, O INMETRO e a AOAC, sugerem 7 ou mais pontos, enquanto a ANVISA e o ICH, sugerem apenas 5 pontos.

A quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito. A linearidade pode ser obtida por padronização externa ou interna e formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real (INMETRO, 2011). A equação da reta que relaciona as duas variáveis é:

$$y = bx + a \quad (6)$$

sendo:

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

x = concentração;

a = intersecção com o eixo y , quando $x = 0$;

b = inclinação da curva analítica = sensibilidade.

O método é mais sensível quando pequenas variações de concentração resultam em maior variação na resposta, ou seja, maior inclinação de (b) (INMETRO, 2011).

A partir dos coeficientes de regressão (a e b), pode-se calcular o coeficiente de correlação (r), que permite obter o grau de relação entre estas duas variáveis a e b . Quanto mais próximo de 1,0 estiver o valor obtido para este coeficiente r , mais forte será a relação entre as variáveis, conferindo ao método respostas lineares.

É importante destacar que para avaliar a linearidade do método analítico, os cálculos da regressão linear não são suficientes, sendo adequado também avaliar os resíduos da regressão. Assim, se os valores desses resíduos estiverem aleatoriamente distribuídos ao longo da linha de regressão, então a linearidade está confirmada (PASCHOAL, *et al*, 2008).

3.8.3 Precisão

De uma maneira simples podemos descrever a precisão como uma expressão da concordância entre vários resultados analíticos obtidos para uma mesma amostra.

A precisão é determinada, pelo desvio padrão absoluto (s) e pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD) também conhecido como coeficiente de variação (CV), conforme apresentados nas equações 7 e 8.

$$s = \sqrt{\frac{(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (7)$$

onde:

$\bar{x}$ = média aritmética de uma pequena quantidade de amostras;

x_i = ao valor individual de uma medição;

n = ao número de medições.

$$RSD \text{ ou } CV \equiv \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (8)$$

Quanto menor a concentração maior será dispersão dos resultados da recuperação, principalmente na análise cromatográfica a de traços ou impurezas. Desta forma a ANVISA estabelece um CV de 20 % aceitável.

A precisão em validação pode ser descrita em dois níveis diferentes: repetitividade e precisão intermediária.

A repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas obtidas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições (analista, instrumento, local) em um curto intervalo de tempo. De acordo com o INMETRO para determinar a repetitividade são necessárias 7 ou mais repetições para o cálculo do CV (%). Já a ANVISA e o ICH, determinam que para o cálculo da repetitividade são necessárias 9 repetições (três níveis e três repetições em cada um) (RIBANI, *et al.*, 2004).

Já a precisão intermediária representa as variações dentro do laboratório devido a eventos como dias diferentes ou analistas ou equipamentos ou até mesmo a combinação destes fatores.

Esta precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório, sendo um dos mais aconselhados a ser adotado, tendo como objetivo a verificação de que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados (RIBANI, *et al.*, 2004). Para determinação da precisão intermediária o INMETRO exige 7 ou mais ensaios e a ANVISA, os mesmos exigidos para repetitividade.

3.8.4 Exatidão

A exatidão expressa a concordância entre o valor encontrado e o valor aceito como verdadeiro ou como referência. (LANÇAS, 2004). A exatidão pode ser obtida mediante uso de material de referência certificado, comparação com outros métodos ou através de ensaios de recuperação (PASCHOAL, *et al.*, 2008), este mais usualmente adotado.

A recuperação (r) do analito pode ser estimada através das análises de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do mesmo, denominado “*spike*” (INMETRO, 2011). Assim, após a extração do analito e a injeção no cromatógrafo, a resposta obtida é comparada com aquela dada pela análise do padrão de referência dissolvido em um solvente puro (LANÇAS, 2004). Entretanto, este procedimento possui uma limitação que é a de que o analito adicionado não está necessariamente na mesma forma que na amostra. A presença de analitos adicionados em uma forma mais facilmente detectável pode ocasionar em avaliações excessivamente otimistas de recuperação (INMETRO, 2011; RIBANI, *et al.*, 2004).

A recuperação pode ser calculada segundo:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{C_1}{C_2} \times 100 \quad (9)$$

Sendo:

C_1 = Concentração do analito determinada na amostra fortificada

C_2 = Concentração do analito adicionado à amostra

Segundo a ANVISA é necessário no mínimo nove determinações, envolvendo no mínimo 3 níveis de concentração com três replicatas de cada para a determinação da exatidão. O INMETRO considera as mesmas nove determinações estipuladas pela ANVISA, entretanto não especifica o número de replicatas de cada amostra.

O intervalo geralmente aceito para recuperação na análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$, porém dependendo da complexidade da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de $\pm 15\%$ (RIBANI, et al., 2004).

3.8.5 Limite de Detecção

O limite de detecção (LD) é definido como a menor concentração de um analito que pode ser detectada pelo método, mas não necessariamente quantificada. A ANVISA recomenda que o LD seja de 2 a 3 vezes superior ao ruído da linha de base (RIBANI, et al., 2004).

3.8.6 Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais do método desenvolvido, assim existem diversas formas de se estabelecer este limite (PASCHOAL, et al., 2008).

De acordo com o INMETRO o LQ pode ser considerado como sendo a concentração do analito correspondente ao valor da média do branco mais 5, 6 ou 10 desvios padrão.

Já a ANVISA diz que o LQ pode ser obtido por meio de análises da amostra branco fortificadas com concentrações decrescentes do analito até o menor nível quantificável com precisão e exatidão aceitáveis.

3.8.7 Robustez

A robustez de um método analítico mede sua suscetibilidade frente a pequenas variações que podem ocorrer durante as análises de rotina. Estes testes são de fundamental importância para que os analistas conheçam quais fatores devem ser estritamente controlados durante a execução de um método (CASSIANO, *et al.*, 2008).

Segundo o INMETRO, a robustez mede a sensibilidade que o método apresenta frente a pequenas variações. Diz-se que o método é robusto quando o mesmo não é afetado por estas variações (INMETRO, 2011). A robustez de um método cromatográfico pode ser avaliada por pequenas variações em parâmetros como a concentração do solvente orgânico, pH, força iônica, temperatura da coluna, vazão da fase móvel e diferentes colunas (lotes ou fabricantes).

Em HPLC, por exemplo, a robustez pode ser avaliada variando o conteúdo de solvente orgânico na fase móvel em $\pm 2\%$, o pH da fase móvel em 0,1 unidades de pH ou a temperatura da coluna em $\pm 5\%$. Se estas mudanças estiverem dentro dos limites de exatidão e precisão aceitáveis, então o método possui robustez e tais variações podem ser incorporadas ao procedimento (RIBANI, *et al.*, 2004).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Instrumentos

Para o desenvolvimento do método foram utilizados os seguintes instrumentos:

- ✓ Cromatógrafo à Líquido Shimadzu LC-10Avp, acoplado com detector UV-Vis SPD-10A.
- ✓ Coluna cromatográfica Phenomenex Luna C18 (2), de partícula 5 μm (250 mm x 4.6 mm DI) e pré-coluna da Waters Symmetry C18.
- ✓ Balança analítica da marca Precisa modelo XR 205SM-DR.
- ✓ Agitador do tipo vortex da Phoenix e ultrassom da Unique modelo Ultra Cleaner 800 A.
- ✓ Espectrofotômetro modelo UV 1601 PC Shimadzu.
- ✓ Seringas Hamilton para HPLC nos volumes de 10, 100, 500 e 1000 μL .
- ✓ Centrífuga modelo Excelsa Baby I Fanem.

4.1.2 Padrões, reagentes e soluções.

Todos os solventes utilizados no presente trabalho foram de grau analítico, sendo suas especificações e respectivos fabricantes descritos na Tabela 7.

Os fármacos utilizados como padrão de referência de grau analítico, foram obtidos através do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS da Fiocruz) e Sigma Aldrich com seus graus de pureza descritos na Tabela 8.

Tabela 7 – Solventes utilizados no desenvolvimento do trabalho

Solventes	Fabricantes
Acetona	J. T. Baker
Acetonitrila	J. T. Baker
Álcool Isopropílico	J. T. Baker
Clorofórmio	Êxodo Científica
Diclorometano	Mallinckrodt Chemicals
Metanol	J. T. Baker
Tetracloroeto de Carbono	Êxodo Científica
Tetracloroetileno	Synth
Tetrahidrofurano	M Tedia

Tabela 8 – Fármacos utilizados como Substâncias Químicas de Referência de grau padrão analítico

Fármacos	Fabricante	Grau de Pureza (%)
Bromazepam	INCQS	99,9
Clonazepam	INCQS	99,5
Diazepam	INCQS	99,9
β-estradiol	Sigma-Aldrich	98

4.2 Métodos

4.2.1 Preparação da solução estoque e de trabalho

Foram preparadas soluções estoque de bromazepam, clonazepam, diazepam, β-estradiol (PI) na concentração de 1 mg mL⁻¹ em metanol grau HPLC partindo da dissolução do padrão sólido, solubilizada por 1 minuto em agitador do tipo vortex e deixada em banho de ultra-som por 5 minutos

sem aquecimento, armazenadas em frascos âmbar e mantidas a temperatura de 4°C. Todos os padrões foram corrigidos na pesagem de acordo com o índice de pureza.

A partir das soluções estoques foram preparadas soluções de trabalho de 5 mg L⁻¹ em metanol, de cada princípio ativo individualmente. Foram também preparadas soluções de 5 mg L⁻¹ e 1 mg L⁻¹ contendo os quatro princípios ativos usados na otimização das condições cromatográficas. Para os ensaios de recuperação da extração, foi preparada uma solução de 10 mg L⁻¹ em fase móvel.

Soluções de concentração 8 mg L⁻¹ foram preparadas de cada fármaco individualmente diluídas em metanol para a obtenção dos seus espectros de absorção.

As soluções utilizadas para os estudos da validação do método, foram todas preparadas a partir da solução estoque de 1 mg mL⁻¹.

A solução estoque foi preparada a cada 6 meses, as de trabalho a cada mês e as posteriores diluições diariamente.

4.2.2 Confirmação dos espectros de absorção

Para a determinação do comprimento de onda a ser utilizado no detector ultravioleta, primeiramente foi realizada uma pesquisa na literatura dos espectros de absorção de cada composto e para confirmação foi realizada uma análise individual a partir de um espectrofotômetro de absorção molecular no ultravioleta e visível. A faixa de varredura adotada para análise foi de 200 a 400 nm. Os comprimentos de absorção máximos obtidos foram: 210 nm para clonazepam, 235 nm para diazepam, 230 nm para bromazepam e 210 nm para β-estradiol.

4.2.3 Amostras de água

As amostras de água em branco utilizadas para a avaliação do método empregando DLLME foram utilizadas a partir de um sistema de água ultrapura Milli-Q da Millipore, com resistividade igual a 18,2 MΩ cm e condutividade elétrica de 0,055 μS cm⁻¹ a 25 °C. A escolha da água ultrapura como

branco foi escolhida de acordo com trabalhos já descritos na literatura para determinação de poluentes em água (REZAEE, et al., 2013)

Para avaliar possíveis interferentes que poderiam prejudicar a quantificação por HPLC-UV/Vis, estas amostras foram analisadas preliminarmente, para identificação de qualquer interferente eluindo no tempo de retenção dos analitos de interesse.

4.3 Determinação e otimização das condições cromatográficas

A polaridade dos fármacos de estudo definiu o uso do método cromatográfico de fase reversa, como também a sua aplicabilidade a esta classe de compostos. Por isso, para o desenvolvimento e otimização do método foi adotada como fase estacionária uma coluna contendo C18 e como fase móvel (FM), diferentes proporções de solventes polares: acetonitrila e água ultrapura.

Para otimização das condições cromatográficas, primeiro foram injetadas individualmente as soluções analíticas dos fármacos selecionados para este estudo, observando-se o tempo de retenção (t_r). Durante as outras etapas de estudo, a ordem de eluição dos compostos foi feita comparando o tempo de retenção dos compostos na mistura com tempo de retenção dos padrões injetados individualmente.

4.3.1 Preparo e escolha da fase móvel

A composição e proporção das fases móveis avaliadas para a determinação e quantificação dos benzodiazepínicos por HPLC-UV/Vis foram de 70:30, 60:40 (v:v) de acetonitrila e água.

Os solventes utilizados foram preparados individualmente, a água ultrapura foi obtida a partir de um sistema Milli-Q. Os solventes foram filtrados à vácuo através de membranas de teflon 0,45 μ m da Millipore, desgaseificados em banho ultrassom por 10 minutos e posteriormente com hélio, a 50 kPa, por 10 minutos.

As fases móveis foram armazenadas em frascos âmbar, próprios para solventes, rotulados com as informações a respeito de sua composição. Os solventes foram desgaseificados diariamente com hélio e a água ultrapura coletada diariamente.

4.3.2 Escolha do volume de injeção

Para que não ocorra sobrecarga de amostra na coluna e que todos os pratos teóricos sejam aproveitados, não se deve injetar um volume maior que 1% da coluna vazia. (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006). Desta forma, a escolha do volume de injeção foi feita baseando-se no descrito na literatura e também no “*loop*” utilizado no sistema cromatográfico de injeção, assim o volume selecionado foi de 50 μL .

4.3.3 Escolha da vazão da fase móvel

A função da bomba é enviar um fluxo de fase móvel reprodutível para a coluna, produzindo uma vazão que permita que as análises sejam realizadas em um curto tempo e uma vazão constante que não interfira no sistema de detecção. A escolha da vazão de fase móvel foi baseada na separação cromatográfica das soluções padrões, testando vazões de 0,8; 1,0 e 1,2 mL min^{-1} .

4.3.4 Escolha do comprimento de onda de máxima absorção

A escolha do comprimento de onda de melhor absorção para os fármacos foi determinada a partir dos espectros obtidos pelo espectrofotômetro. A partir deste resultado foi selecionada uma faixa de comprimento de onda para ser avaliada. A injeção de uma mistura contendo os padrões com concentração de 5 mg L^{-1} foi utilizada para avaliação da melhor resposta, com as análises feitas em

triplicatas. Os comprimentos de onda avaliados foram: 210, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250 e 254nm.

4.3.5 Determinação da temperatura da coluna

A determinação da temperatura da coluna foi baseada na área obtida dos cromatogramas resultantes da análise em triplicata de uma solução contendo uma mistura dos padrões com concentração 5 mg L^{-1} . A faixa selecionada para determinação da temperatura ótima foi 20 a 40 °C com variação de 5 °C.

4.4 Padrão Interno (PI)

Para seleção do padrão interno foram selecionados os seguintes compostos: Amoxicilina, β -estradiol, e Tiramina. A partir delas foram preparadas soluções estoque com concentração de 1 mg mL^{-1} e suas soluções diluídas de concentração 5 mg L^{-1} em metanol.

Foi feita a injeção individual dos compostos no método otimizado para avaliação e obtenção do tempo de retenção. Em seguida, foram preparadas as soluções contendo os padrões internos selecionados junto aos analitos de interesse e novamente injetados e avaliados.

4.5 Avaliação da separação cromatográfica

Os parâmetros empregados para avaliar a separação cromatográfica dos compostos em estudo foram: fator de retenção (k), fator de separação (R_s) e fator de separação (α). Para esta avaliação foi preparada uma solução contendo todos os analitos na concentração 5 mg L^{-1} . O tempo de retenção de

um analito não retido, ou seja, tempo morto (t_m) foi tomado como o tempo de saída da acetonitrila utilizada como fase móvel.

4.6 Otimização do procedimento de extração por DLLME

Os ensaios realizados nesta etapa foram desenvolvidos para otimizar os parâmetros envolvidos na DLLME e que afetam diretamente na eficiência do método, garantido uma boa recuperação dos analitos.

4.6.1 Escolha do solvente extrator

Para escolha do melhor solvente extrator foram realizados ensaios utilizando diclorometano, tetracloreto de carbono, tetracloroetileno e clorofórmio, combinados com acetonitrila (solvente dispersor) em 10 mL de amostra fortificada com $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada fármaco em estudo. Para o procedimento de extração foram utilizados 200 μL de solvente extrator com 800 μL de solvente dispersor.

4.6.2 Escolha do solvente dispersor

Para escolha do melhor solvente dispersor, atendendo a característica de ser solúvel tanto na amostra quanto no solvente extrator, foram selecionados acetonitrila, acetona, etanol e metanol. Foram realizados experimentos utilizando 10 mL de amostra fortificada com $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada fármaco em estudo. Para a extração foram utilizados 200 μL de solvente extrator (clorofórmio) e 800 μL de solvente dispersor.

4.6.3 Escolha do volume de solvente extrator

Para seleção do volume de solvente extrator, foram realizados ensaios de extração em amostras fortificadas com $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada fármaco em estudo, com diferentes volumes de solvente extrator 100, 150, 200, 250 e 300 μL . Para a extração foram utilizados 800 μL de metanol como solvente dispersor e clorofórmio como solvente extrator.

4.6.4 Escolha do volume de solvente dispersor

Depois de selecionados o solvente dispersor (metanol), o solvente extrator (clorofórmio), bem como o volume de solvente extrator a ser utilizado neste procedimento, foram realizados testes comparativos para os volumes de 500, 600, 700, 800, 900 e 1000 μL de solvente dispersor, utilizando 10 mL de amostra fortificada com $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada fármaco em estudo. Para a extração foram utilizados 200 μL de solvente extrator (clorofórmio) e metanol como solvente dispersor.

4.6.5 Avaliação do tempo de extração

O tempo de extração é um dos fatores mais importantes em processos de extração. Na DLLME o tempo de extração é definido pelo intervalo entre a injeção da mistura dos solventes extrator e dispersor antes da etapa de centrifugação (REZAEI *et al.*, 2006). O efeito do tempo de extração dos analitos foi avaliado no intervalo de 1 a 60 minutos, a partir de uma amostra de 10 mL fortificada com $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada fármaco em estudo.

4.6.6 Efeito da velocidade de centrifugação

Na centrifugação as microgotas formadas pelo processo de extração na amostra são sedimentadas no fundo do tubo cônico. Foi investigada a influência da velocidade de centrifugação na eficiência da extração, avaliando as velocidades de 4000, 5000 e 6000 rpm.

4.6.7 Efeito do tempo de centrifugação

O tempo da centrifugação também pode influenciar na eficiência do método de extração. Diante disso, foi investigada esta influência avaliando uma escala de tempo de 1 a 15 minutos.

4.6.8 Avaliação da força iônica

A força iônica da amostra tem grande efeito na eficiência da extração. O aumento da força iônica no meio, ou seja, da adição de uma determinada quantidade de sal na amostra, pode diminuir a solvatação das moléculas dos analitos, devido a dois fatores: a solvatação preferencial das moléculas do sal pela água e da polaridade do analito. Para investigar este parâmetro, vários experimentos foram realizados com a adição de diferentes proporções do sal $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ variando de 0,3 a 2,0 % (p/v) na amostra.

4.6.9 Efeito do pH da amostra

Para a avaliação do efeito do pH da amostra na extração dos fármacos foram avaliados os respectivos valores de pH: 1,0; 3,0; 5,0; 7,0 e 9,0 com a adição de H_3PO_4 5% (v/v) para pH ácido e NaOH 5% (v/v) para pH básico.

4.7 Validação do método

Após a otimização do método de extração e estabelecidas as melhores condições de separação dos fármacos no sistema cromatográfico, foi feita a validação do método por meio da determinação das figuras de mérito: seletividade, linearidade e faixa linear de trabalho, limites de detecção e quantificação, precisão (repetitividade e precisão intermediária) e robustez. Os critérios de aceitação estão de acordo com os preconizados pela ANVISA, Resolução N°899 de 29 de maio de 2003 e em complemento pelo INMETRO, DOQ-CGCRE-008.

4.7.1 Seletividade

A seletividade do método desenvolvido foi avaliada comparando-se a matriz isenta dos fármacos com a matriz fortificada com os padrões para verificar se ocorria a eluição dos mesmos junto aos interferentes da matriz.

4.7.2 Linearidade ou faixa linear de trabalho

A linearidade do método foi avaliada empregando a padronização interna, sendo construídas curvas analíticas a partir de amostras fortificadas com os analitos de interesse em concentrações que variaram de 1 a 96 $\mu\text{g L}^{-1}$. As amostras foram preparadas em 5 níveis de concentração e injetadas em triplicata. As áreas obtidas nos cromatogramas correspondentes aos picos cromatográficos de cada analito foram plotadas em um gráfico *vs* a concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$), obtendo alguns parâmetros estatísticos para o desenvolvimento do trabalho analítico.

O estudo estatístico da linearidade foi feito através de regressão linear aplicada ao conjunto de dados obtidos por padronização interna para a construção da curva analítica. A partir da curva analítica

podem-se obter os coeficientes de regressão (a e b) e o coeficiente de correlação. Também foi construído o gráfico de resíduos para confirmação da linearidade do método.

4.7.3 Precisão

A precisão foi avaliada em termos de repetitividade e precisão intermediária:

- Repetitividade: cálculo do CV (%) para 9 ensaios (3 níveis de fortificação denominados Controle de Qualidade Alto - CQA, Controle de Qualidade Médio - CQM e Controle de Qualidade Baixo - CQB, com triplicata de cada) realizados num mesmo dia.
- Precisão intermediária: cálculo do CV (%) para 9 ensaios (3 níveis de fortificação denominados Controle de Qualidade Alto - CQA, Controle de Qualidade Médio - CQM e Controle de Qualidade Baixo - CQB, com triplicata de cada) realizados em 2 dias, com intervalo de 1 semana.

Para a determinação dos 3 níveis de fortificação, o método foi baseado no indicado pelo guia (ANVISA, 2003):

- CQA – nível superior da curva analítica (bromazepam $96 \mu\text{g L}^{-1}$, clonazepam $48 \mu\text{g L}^{-1}$ e diazepam $12 \mu\text{g L}^{-1}$);
- CQM – nível médio da curva analítica (bromazepam $48 \mu\text{g L}^{-1}$, clonazepam $24 \mu\text{g L}^{-1}$ e diazepam $6 \mu\text{g L}^{-1}$);
- CBQ – nível inferior da curva analítica (LQ) (bromazepam $8 \mu\text{g L}^{-1}$, clonazepam $4 \mu\text{g L}^{-1}$ e diazepam $1 \mu\text{g L}^{-1}$).

4.7.4 Exatidão

A exatidão do método foi obtida através de ensaios de recuperação realizados em 3 níveis de concentração (CQB, CQM e CQA) em triplicatas, resultando num total de 9 determinações, conforme sugerido pela ANVISA.

4.7.5 Limite de Detecção

Para a determinação do limite de detecção o presente trabalho baseou-se no método de relação sinal/ruído, ou seja, obteve o limite de detecção através da comparação entre a medição dos sinais das amostras em baixas concentrações conhecidas e um branco dessas amostras para estabelecer a concentração mínima na qual o analito pode ser detectado. A proporção entre sinal/ruído usado como estimativa do LD foi de 3:1, o teste foi realizado em triplicata.

4.7.6 Limite de Quantificação

O limite de quantificação foi obtido através do método de relação sinal/ruído com a proporção estabelecida de 10:1, os ensaios foram realizados em triplicatas.

4.7.7 Robustez

Para a avaliação da robustez do método desenvolvido foram avaliadas pequenas variações na proporção de fase móvel $\pm 2\%$ (61,2 de acetonitrila: 38,8 de água) e vazão ($1,25 \text{ mL min}^{-1}$), no decorrer das análises.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Confirmação dos espectros de absorção

Os espectros de absorção dos fármacos em estudo foram obtidos através do espectrofotômetro de absorção molecular na região do ultravioleta para a confirmação dos espectros disponibilizados na literatura. Os espectros foram obtidos através da análise individual de cada composto, diluído em metanol, e podem ser observados na Figura 10.

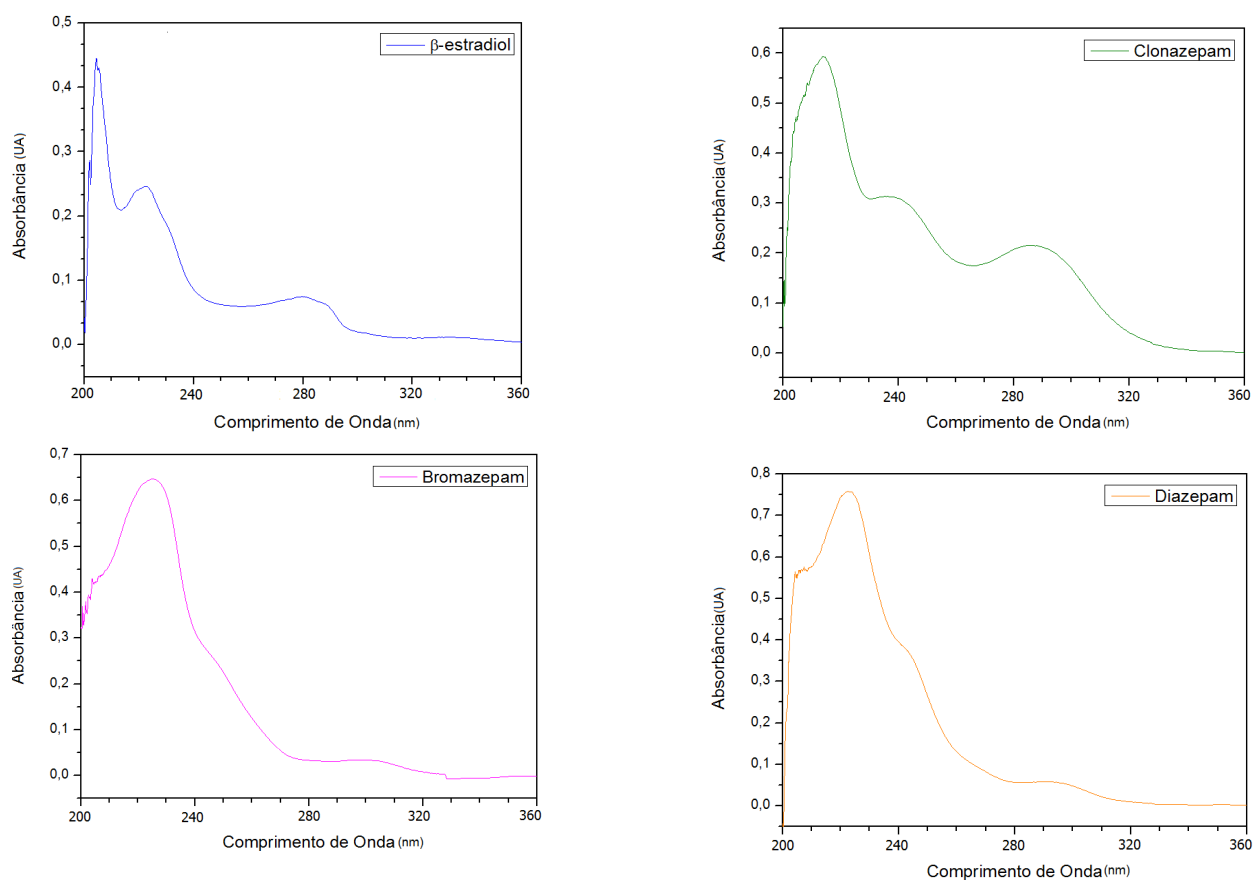


Figura 10 – Espectros de absorção obtidos por espectrofotômetro de uma solução analítica contendo $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de cada fármaco.

A faixa de varredura escolhida foi a de 200 a 400 nm cobrindo toda a região do ultravioleta, entretanto, no gráfico só é apresentado até a região de 360 nm, pois a partir deste ponto não foi observada absorção por parte dos analitos.

O comprimento de absorção máxima de cada composto é respectivamente: Bromazepam 230 nm, Clonazepam 210 nm, Diazepam 235 nm e B-estradiol 210 nm, concordando com os disponíveis na literatura de JINNO LABORATORY (2012).

De acordo com a literatura, as bandas de absorbância de uma substância na faixa de comprimento de onda de 200 a 300 nm representam as ligações duplas e triplas conjugadas da molécula. Nos analitos em estudo o grupo cromóforo predominante representa as ligações duplas conjugadas existentes em anéis. Desta forma, todos os compostos apresentam a absorção na região da faixa mencionada na literatura.

5.3 Amostra de água como branco

Para escolha da amostra de água como branco, esta deve possuir características semelhantes a da amostra real, e ser isenta de interferentes que possam co-eluir com os fármacos em estudo, assim interferindo na indentificação e quantificação dos compostos. Desta forma, através da injeção em triplicata de amostras de água provenientes de um sistema milli-Q, pode ser confirmada a isenção de interferentes nos tempos de retenção dos analitos em estudo conforme é mostrado na Figura 11.

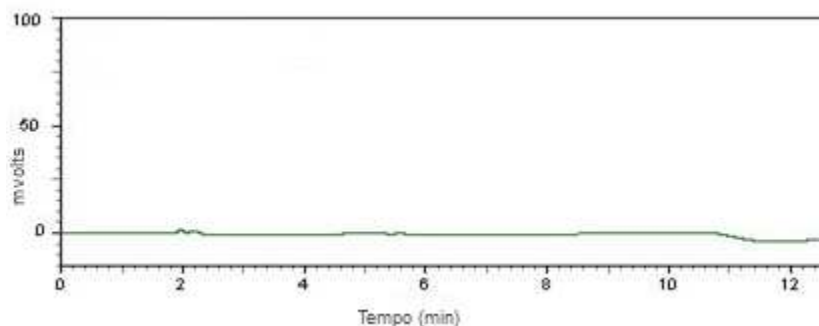


Figura 11 – Cromatograma resultante da análise realizada em uma amostra de água obtida através de um sistema Milli-Q. Condições cromatográficas: fase móvel acetonitrila:água (70:30 v/v), fluxo 1,0 mL min⁻¹, comprimento de onda 230 nm e temperatura do forno 25°C.

5.4 Determinação e otimização das condições cromatográficas

No desenvolvimento das condições cromatográficas para a separação dos fármacos, buscou-se o uso das condições mais simples, ou seja, fase móvel sem ajuste de pH e eluição isocrática. Desta forma, a primeira proporção escolhida para a fase móvel para teste foi a de 70:30 (acetonitrila:água). Entretanto, nesta proporção os fármacos bromazepam e clonazepam tiveram uma pequena co-eluição. Assim, foi investigada a proporção 60:40, onde foi obtida uma boa separação, adotando esta como a proporção de fase móvel de trabalho.

O volume de injeção selecionado foi de 50 µL, uma vez que o “loop” utilizado no sistema cromatográfico suporta este volume. Recomenda-se que o volume de injeção seja igual ou superior ao volume do “loop”, pois quando este for menor, acarretará na dispersão da amostra na fase móvel dentro do “loop”, ocasionando um efeito de alargamento dos picos.

O comprimento de onda adotado inicialmente foi o de 230 nm, que é o mais comumente usado em análises desta classe de compostos nas mais diversas matrizes com HPLC (DRUMMER, 1998).

Todas as análises foram feitas inicialmente com o forno em temperatura ambiente de 25°C. Posteriormente, estas condições cromatográficas pré-estabelecidas foram otimizadas, a fim de aumentar a sensibilidade analítica do método.

5.4.1 Escolha do comprimento de onda de máxima absorção

Para a escolha do comprimento de onda de máxima absorção adotou-se uma faixa, baseando-se nos pontos máximos de absorção de cada composto.

Assim como apresentado na Figura 10, os pontos máximos para os fármacos são respectivamente: Bromazepam 230 nm, Clonazepam 210 nm, Diazepam 235 nm e B-estradiol 210 nm. Deste modo, a faixa adotada para otimização do comprimento de onda de máxima absorção foi de 210 a 254 nm, variando de 5 em 5 nm, exceto para o último valor de 254 nm, que foi escolhido baseado em resultados previamente publicados na literatura (DRUMER, 1998). Neste método, a escolha do comprimento de onda de absorção máxima foi necessário devido o sistema utilizar um detector ultravioleta que permite o monitoramento de apenas um comprimento de onda, fazendo-se necessário a otimização.

A avaliação do melhor resultado foi baseada nas áreas de pico obtidas pelos analitos em função do comprimento de onda. Analisando os resultados apresentados na Figura 12, foi escolhido o comprimento de onda de 225 nm, pois este apresentou boa absorção para todos os compostos.

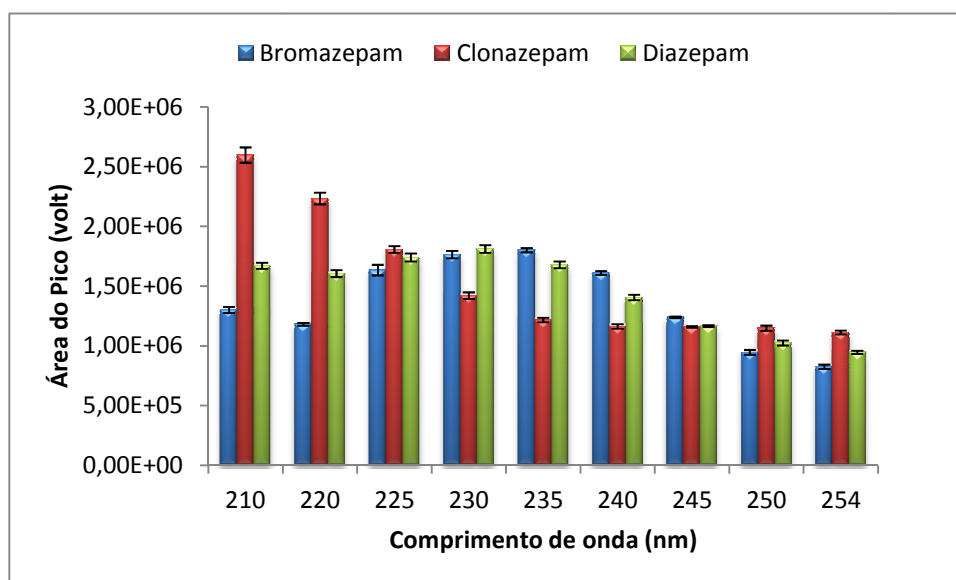


Figura 12 – Avaliação da absorção dos analitos em diferentes comprimentos de onda.

5.4.2 Determinação da temperatura da coluna

O controle da temperatura na cromatografia líquida tem um importante papel já que pequenas variações podem ocasionar alterações significativas no tempo de retenção dos analitos, na assimetria dos picos e, conseqüentemente, na eficiência do método.

Diante disso, para otimização da temperatura foi analisada uma faixa de temperatura que variou de 20 a 40 °C. Temperaturas maiores não foram avaliadas, devido à coluna utilizada no desenvolvimento do método suportar a temperatura máxima de 60 °C. Assim, evitou-se degradar a sua fase estacionária.

Observa-se através dos dados obtidos na Figura 13, que as variações nas áreas foram significativamente pequenas, contudo, a temperatura de trabalho escolhida foi a de 30 °C, que apresentou, mesmo que pequena, uma elevação na área dos analitos.

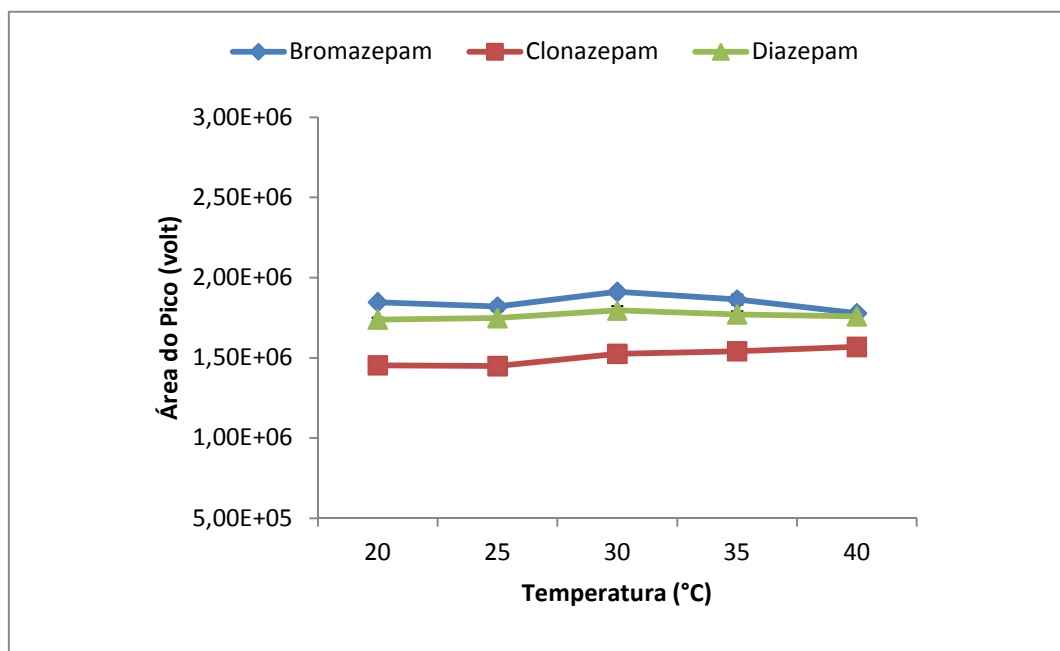


Figura 13 - Avaliação da sensibilidade dos analitos empregando diferentes temperaturas na coluna.

5.5 Escolha do padrão interno

O uso de um padrão interno é adotado para minimizar erros provenientes de variações que podem ocorrer durante as análises cromatográficas. O padrão interno deve atender alguns requisitos que são:

- o composto deve eluir da coluna adequadamente separado de todos os compostos da amostra e o mais perto possível dos compostos de interesse;
- deve ser estável nas condições de análise;
- a quantidade injetada deve ser próxima das substâncias de interesse;
- deve ser suficientemente estável para permitir estocagem;
- ser estruturalmente semelhante ao analito, ou possuir os mesmos grupos químicos.

Com base nestas informações e com a disponibilidade de padrões no laboratório, os compostos selecionados para o teste foram: Tiramina, Amoxilina, e β -estradiol.

Através das soluções de cada composto preparado individualmente, foi feita a injeção dos padrões e posterior avaliação do tempo de retenção obtido nas condições do método pré-otimizado. Os cromatogramas resultantes das análises podem ser observados na Figura 14. Desta forma, percebemos que a tiramina apresentada na Figura 14.a, eluiu com um tempo de retenção relativamente menor que os demais analitos (bromazepam $t_r = 4,198$ min; clonazepam $t_r = 4,952$ min e diazepam $t_r = 8,076$ min), apresentando o t_r de 2,683 min., aparecendo no início da corrida cromatográfica em uma região onde geralmente há eluição de interferentes da matriz, não apresentou uma boa simetria do pico, e ainda eluiu com ruídos que podem ser um indicativo de impurezas presentes no padrão.

O amoxilina apresentada na Figura 14.c, obteve um tempo similar ao da tiramina, com $t_r = 2,753$ min e sua simetria do pico também não foi satisfatória. Desta forma, o β -estradiol foi o padrão que obteve o melhor resultado, apresentando um $t_r = 5,619$ min. eluindo após os analitos bromazepam e clonazepam, o que é compatível com o método, e ainda apresentou uma boa simetria do pico conforme pode ser observado na Figura 14.b.

Para a confirmação do β -estradiol como padrão interno foi preparada uma solução contendo os fármacos de interesse mais o padrão interno, todos com concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

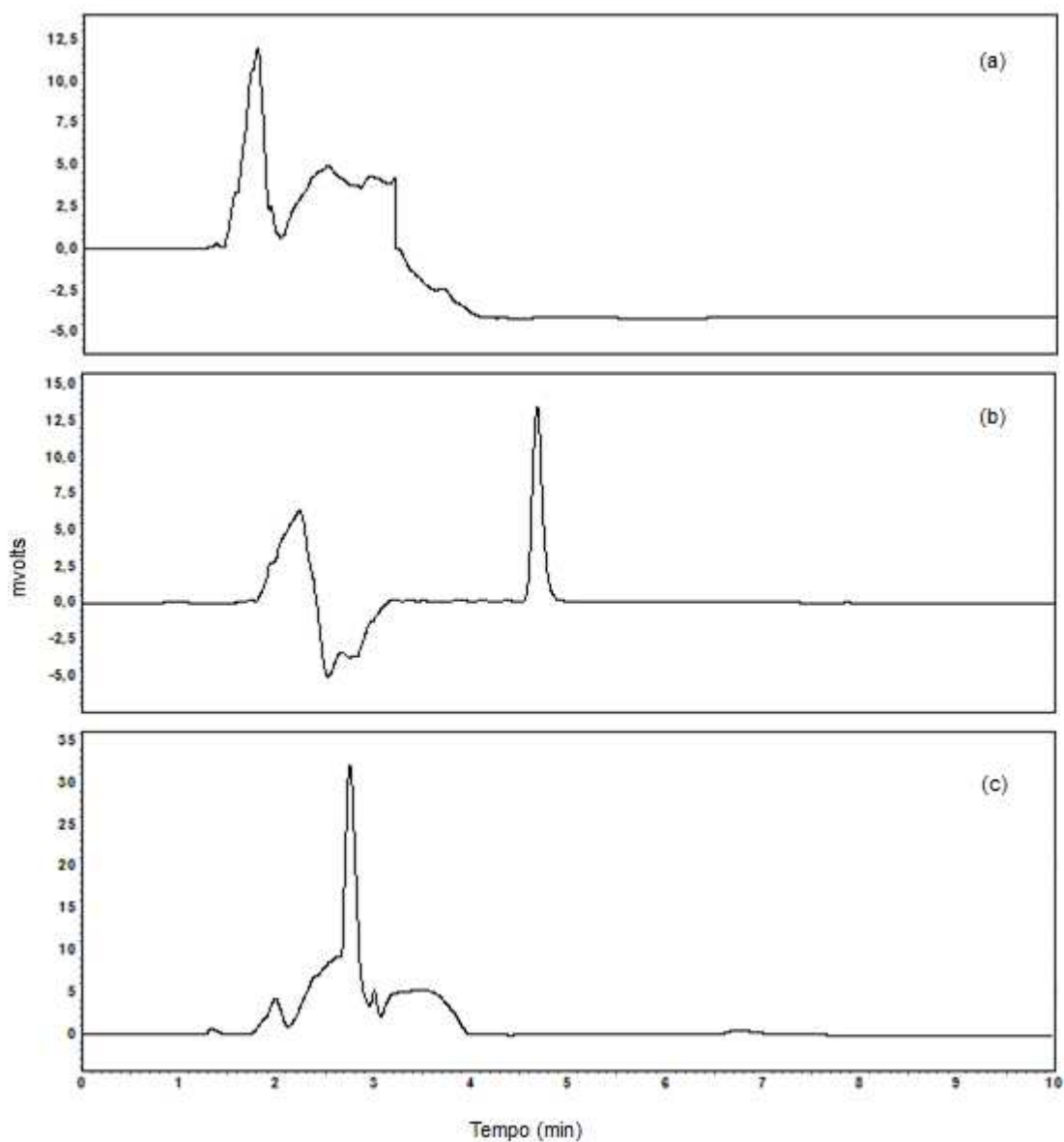


Figura 14 – Cromatogramas obtidos das análises para seleção do padrão interno nas condições cromatográficas otimizadas: fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v), vazão 1,0 mL min⁻¹., comprimento de onda 225nm e temperatura do forno 30°C. (a) tiramina, (b) β-estradiol e (c) amoxicilina, todos na concentração de 5 µg mL⁻¹

O resultado obtido da análise pode ser observado pelo cromatograma apresentado na Figura 15, onde a eficiência do β-estradiol como padrão interno foi confirmada, adequando-se perfeitamente ao método proposto.

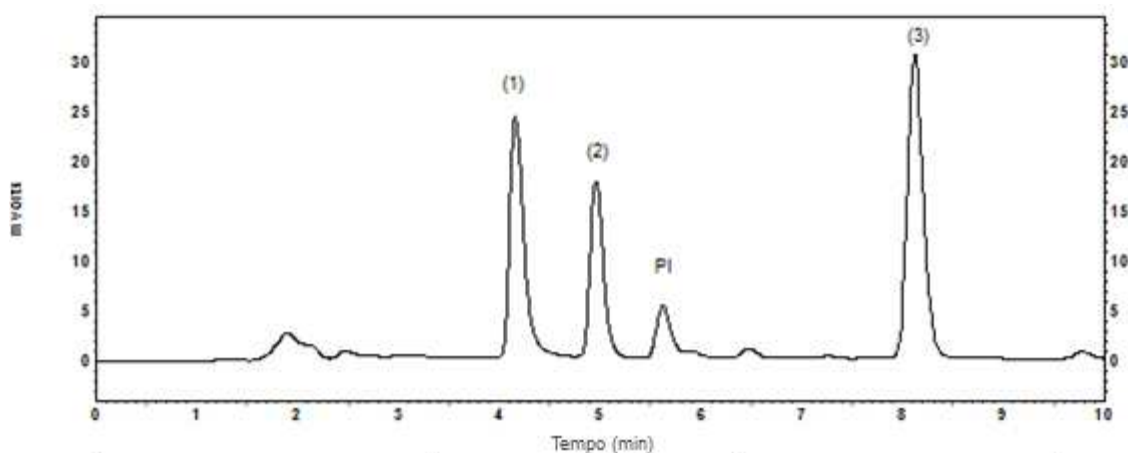


Figura 15 - Cromatograma da separação bromazepam (1), clonazepam (2), β -estradiol PI (3) diazepam (4) na concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Coluna fase reversa C18 phenomenex luna, fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v), vazão $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, comprimento de onda 225 nm e temperatura do forno 30°C .

5.6 Outros parâmetros avaliados e otimizados das condições cromatográficas

A fim de avaliar a influência da vazão no tempo de retenção dos analitos e conseqüentemente na corrida cromatográfica, avaliou-se as vazões $0,8 \text{ mL min}^{-1}$, $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e $1,2 \text{ mL min}^{-1}$, os resultados podem ser observados nos cromatogramas apresentados na Figura 16. A partir da análise dos cromatogramas nota-se que, com o aumento da vazão houve uma diminuição no tempo de retenção dos analitos que variou entre 1 e 2 minutos. Este resultado era esperado de acordo com o descrito na literatura (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006) e, desta forma, a vazão de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$, foi selecionada como a vazão de trabalho do método, conferindo a corrida um tempo total de 7 minutos.

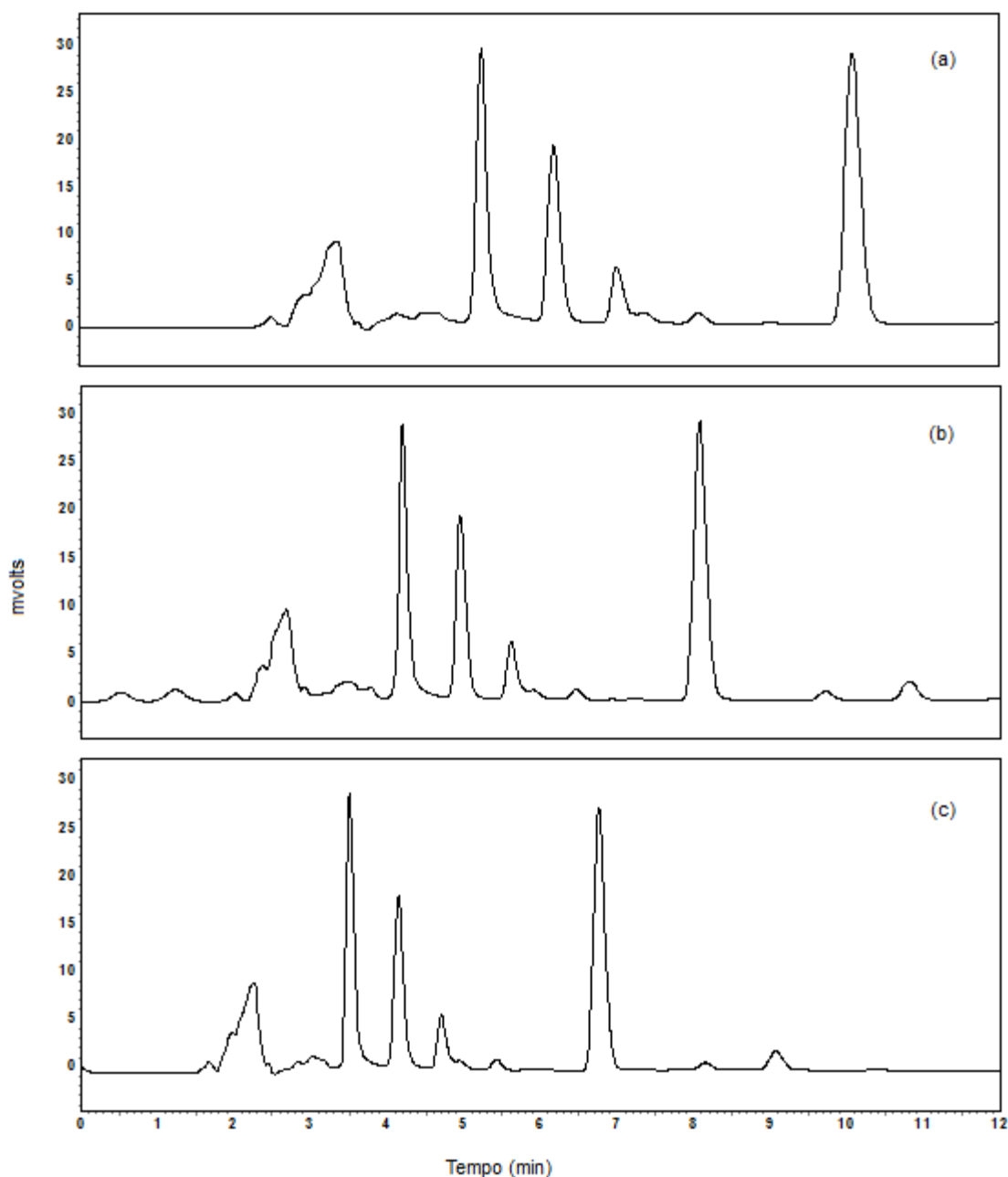


Figura 16 – Cromatogramas obtidos das análises para seleção da melhor vazão: fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v), comprimento de onda 225 nm e temperatura do forno 30°C. (a) vazão 0,8 mL min⁻¹, (b) 1,0 mL min⁻¹ e (c) 1,2 mL min⁻¹, todos na concentração de 1 µg mL⁻¹.

O último parâmetro avaliado e otimizado no desenvolvimento deste método foi o efeito do tipo de solvente no preparo das soluções de trabalho. Sabe-se que a força do solvente da solução age diretamente na simetria dos picos cromatográficos. Quanto maior a força do solvente em relação à fase

móvel, maior será o efeito de alargamento dos picos (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006). Desta forma, foram testados três tipos de solventes no preparo das soluções de trabalho, que foram: metanol, fase móvel e acetonitrila, como se pode observar na Figura 17.

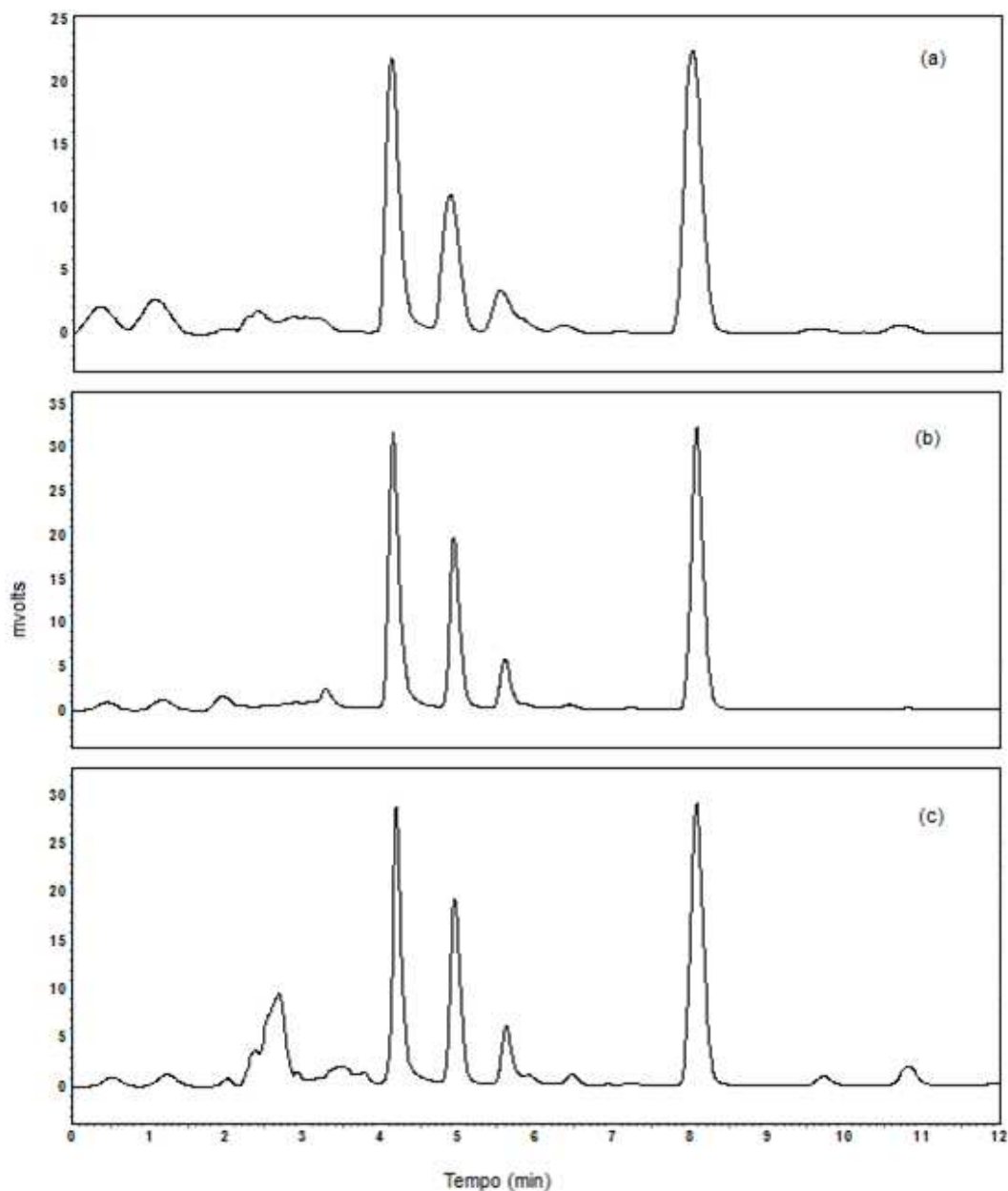


Figura 17 - Cromatogramas obtidos das análises para seleção do melhor solvente de dissolução do padrão. Condições cromatográficas: fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v), comprimento de onda 225nm e temperatura do forno 30°C, vazão 1,2 mL min⁻¹, todos na concentração de 1 µg mL⁻¹. (a) acetonitrila 100%, (b) Fase móvel e (c) metanol.

Através da análise realizada a partir dos cromatogramas apresentados na Figura 17, pode-se perceber visualmente o efeito da força do solvente na simetria do pico, comparando o cromatograma (a) onde utilizou-se acetonitrila 100%, com o cromatograma (b) onde utilizou-se a fase móvel empregada no método, nota-se perfeitamente a diferença na simetria dos picos.

A solução diluída em 100% de acetonitrila possui uma força cromatográfica maior em relação à fase móvel que contém apenas 60% de acetonitrila e 40% de água, assim ocasionado no efeito de alargamento de bandas. O metanol, conforme se observa na Figura 17.c, também forneceu um bom resultado na assimetria dos picos, entretanto este não foi escolhido por apresentar um pico característico do solvente no intervalo de 2-3 minutos. Desta forma, a partir desta análise todas as soluções diluídas de trabalho foram preparadas em fase móvel.

As melhores condições cromatográficas obtidas para a separação e quantificação dos fármacos no sistema HPLC-UV estão demonstradas na Tabela 9.

Tabela 9 – Condições cromatográficas otimizadas para o HPLC-UV

Coluna Analítica	Phenomenex Luna C18, com partículas de 5 µm (250 mm x 4.6 mm DI)
Fase Móvel	Acetonitrila:Água (60:40 v/v)
Vazão da Fase Móvel	1,2 mL min ⁻¹
Modo de Eluição	Isocrático
Volume de Injeção	50 µL
Temperatura da Coluna	30 °C
Comprimento de onda para quantificação	225 nm

Usando a condições otimizadas da Tabela 9 foi obtido o cromatograma com o perfil de separação que pode ser observado na Figura 18, a partir de uma solução contendo 5 µg mL⁻¹ da mistura dos compostos.

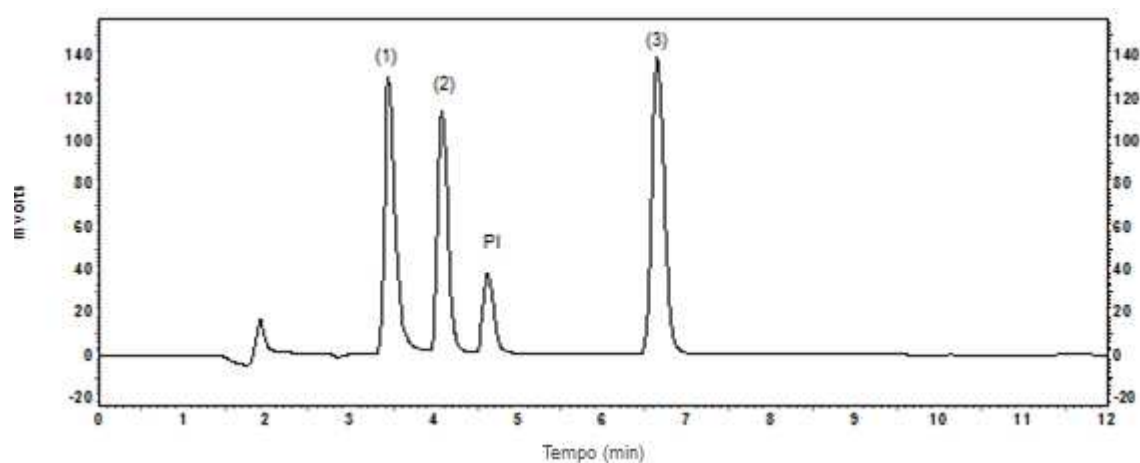


Figura 18 – Cromatograma da separação dos fármacos bromazepam (1), clonazepam (2), β -estradiol (PI) e diazepam (3) com concentração de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Condições cromatográficas otimizadas: coluna fase reversa C18 phenomenex luna, fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v), vazão $1,2 \text{ mL min}^{-1}$, comprimento de onda 225 nm e temperatura do forno 30°C .

5.7 Avaliação da separação cromatográfica do método otimizado

Os parâmetros t_r , R_s , k e α foram calculados através da análise do cromatograma apresentado na Figura 18. Os dados obtidos são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 – Parâmetros cromatográficos obtidos para a separação dos analitos nas condições cromatográficas otimizadas

Fármaco	t_r (min.)	k	R_s	α
Bromazepam	3,51	0,56	1,58	1,5
Clonazepam	4,14	0,84	1,6	1,3
β -estradiol	4,70	1,09		
Diazepam	6,76	2,0	4,58	1,84

(1 minuto = 100 segundos no HPLC)

De acordo com os dados apresentados na Tabela 10, pode ser observado que os valores obtidos para o fator de retenção (k), foram aceitáveis, uma vez que todos estão dentro do intervalo 0,5 e 20 para múltiplos componentes conforme descrito na literatura (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006).

Já para os valores de α obteve-se valores maiores que 1 para todos os pares de compostos, seguindo o recomendado para separação de dois compostos adjacentes.

Com os valores de resoluções obtidas ($> 1,5$), confirmamos a separação completa de todos os compostos. Desta forma, confirmamos que o método de separação desenvolvido apresenta boa resolução, retenção e seletividade para determinação dos fármacos em estudo.

5.8 Avaliação e otimização da técnica de extração DLLME

A avaliação foi feita para determinar e otimizar os parâmetros envolvidos na extração (tipo e volume de solvente extrator, tipo e volume de solvente dispersor, velocidade de centrifugação e tempo, pH, força iônica e tempo de extração) que são determinantes na extração dos fármacos em estudo.

5.8.1 Seleção do tipo de solvente extrator

Para seleção do tipo de solvente extrator, foram realizados testes com clorofórmio, tetracloreto de carbono, tetracloroetileno e diclorometano, combinados com todos os solventes dispersores (acetonitrila, acetona, metanol e etanol). Em todos os casos pode ser observada a formação de duas fases, sendo que o diclorometano foi o que apresentou menor formação de fase sedimentada, com volumes variando de 20 a 160 μL . O clorofórmio, o tetracloreto de carbono e o tetracloroetileno apresentaram a formação de fase sedimentada com volumes variando de 150 a 230 μL , o que pode ser explicado pela maior densidade destes solventes com relação a água, analisando a Tabela 10. Entretanto, neste caso, a diferença de volume da fase sedimentada obtida com esses solventes não teve tanta importância, uma vez que estas serão removidas com o auxílio de uma seringa, secas com gás

nitrogênio e ressuspendidas em 200 µL de fase móvel para todas as análises. A escolha por esta metodologia foi devido a estes solventes orgânicos não possuírem um bom comportamento cromatográfico, evitando assim possíveis interferências durante a corrida. Este comportamento pode ser explicado pelo fato de todos os solventes extratores em estudo apresentarem absorção no ultravioleta. A Tabela 11 apresenta os solventes orgânicos selecionados e seus respectivos comprimentos de onda.

Tabela 11 – Características físico-químicas dos solventes extratores

Solvente	Densidade (g/cm³)	Solubilidade em água (g L⁻¹)	Absorção no UV (nm)
Tetracloreto de carbono	1,59	0,8	263
Tetracloroetileno	1,62	0,16	273
Diclorometano	1,33	20	235
Clorofórmio	1,47	8	245

A acetonitrila foi escolhida como solvente dispersor para avaliar a eficiência da extração dos solventes extratores. A Figura 19 apresenta o efeito dos diferentes tipos de solventes extratores na recuperação dos fármacos.

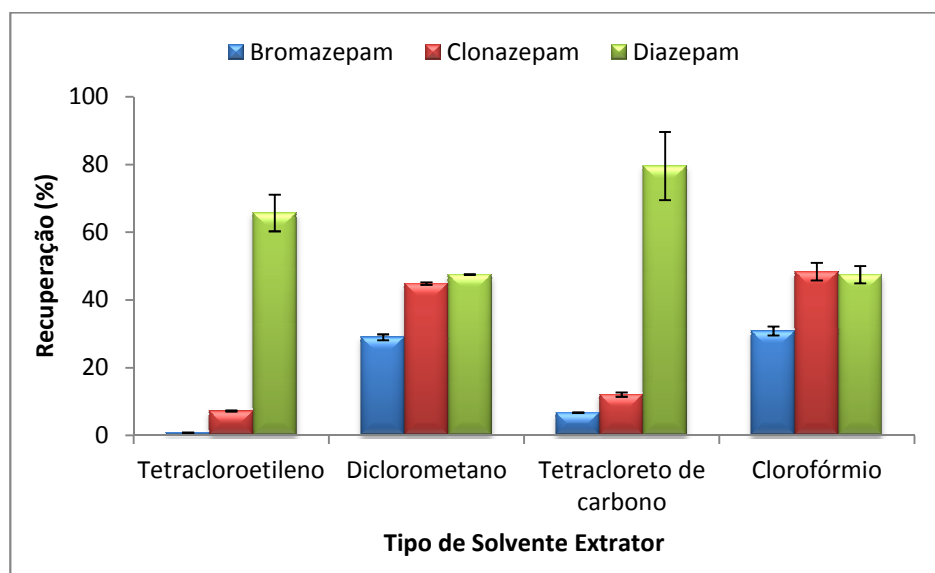


Figura 19 – Efeito dos diferentes tipos de solventes extratores na recuperação dos fármacos. Condições de extração: volume de amostra 10 mL, volume de solvente extrator 200 μL , solvente dispersor acetonitrila com volume 800 μL . Concentração dos fármacos 100 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Conforme se observa na Figura 19, dentre os solventes extratores utilizados para a análise, os que obtiveram as melhores recuperações foram: diclorometano e clorofórmio, com a eficiência variando de 30% a 50%. Devido aos analitos possuírem uma maior afinidade pelo clorofórmio e este possuir uma menor solubilidade em água com relação ao diclorometano, o clorofórmio foi escolhido com solvente extrator para as demais análises.

5.8.2 Seleção do tipo de solvente dispersor

A principal característica do solvente dispersor é sua solubilidade na amostra e na fase extratora (orgânica), pois desta forma, quanto maior forem estas solubilidades maiores serão os efeitos da dispersão. Consequentemente, favorecerá ao mecanismo que governa esta extração, que é a partição do analito da fase aquosa para a fase orgânica.

Com o clorofórmio selecionado como solvente extrator, um sistema de duas fases foi formado com os quatros solventes dispersores testados e as recuperações obtidas foram boas tanto com acetona como com o metanol, conforme apresentado na Figura 20. Entretanto, devido o metanol ser menos volátil que a acetona e também por ter apresentado uma maior recuperação para o analito diazepam, este foi escolhido como solvente dispersor.

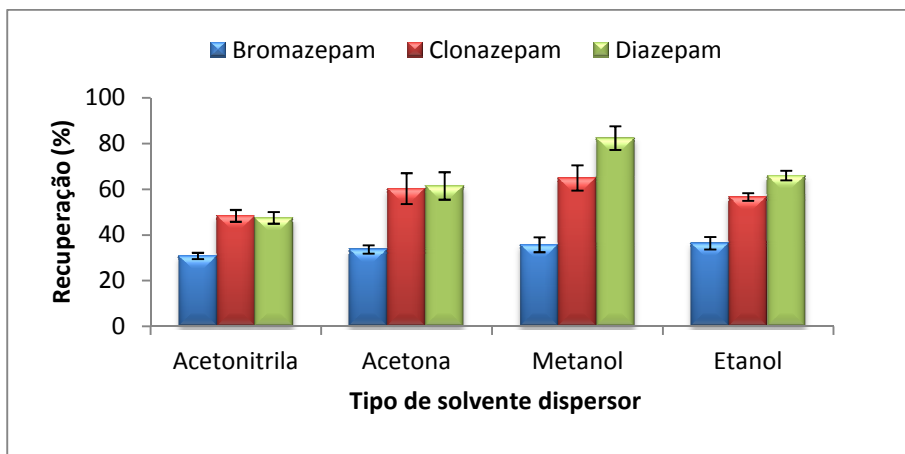


Figura 20 – Efeito do tipo de solvente dispersor na recuperação dos fármacos. Condições de extração: volume de amostra 10 mL, volume de solvente extrator 200 μL , volume de solvente dispersor 800 μL . Concentração dos fármacos 100 $\mu\text{g L}^{-1}$.

5.8.3 Escolha do volume de solvente extrator

Sabe-se que a determinação do volume de solvente extrator é um parâmetro muito importante a ser otimizado na extração DLLME. Este volume determina o fator de pré-concentração, ou seja, aumentando o volume de solvente extrator, aumenta-se o volume de fase sedimentada resultando em um menor fator de pré-concentração. Portanto, o volume “ótimo” deve garantir tanto um alto fator de pré-concentração quanto permitir a obtenção de um volume de fase sedimentada suficiente para as análises subsequentes.

Como já mencionado, neste trabalho o volume final obtido foi evaporado e ressuspenso em 200 μL de fase móvel. Assim, a otimização visará principalmente a eficiência da extração em diferentes volumes de solvente extrator.

Para a seleção do volume do solvente extrator, soluções contendo diferentes volumes de clorofórmio foram submetidas ao procedimento. Os volumes selecionados para os testes foram: 100 μL , 150 μL , 200 μL , 250 μL , 300 μL . Iniciou-se pelo volume de 100 μL , pois volumes menores que este não mostraram a formação de fase sedimentada. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 21, que mostra que em volumes mais elevados de solvente extrator, a razão entre o volume de solvente dispersivo e o volume de solvente extrator diminui, consequentemente haverá uma diminuição no número de micro gotas formadas, desta forma reduzindo a eficiência da extração. Uma recuperação melhor foi obtida nos volumes de 150 e 200 μL . Entretanto, em 200 μL ocorreu uma maior recuperação do fármaco diazepam em relação ao volume de 150 μL . Assim, o volume de 200 μL foi escolhido para ser utilizado nas análises posteriores.

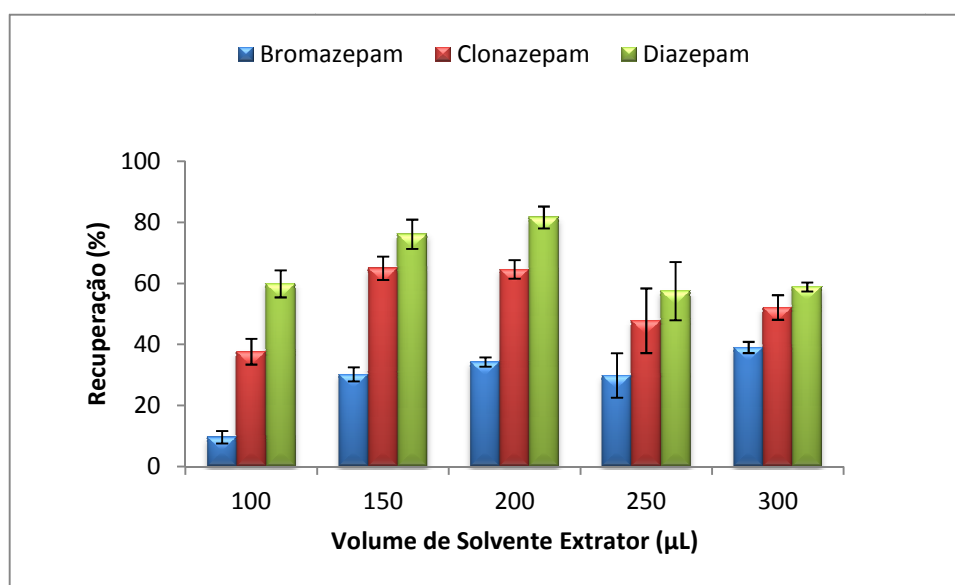


Figura 21 - Efeito do volume de solvente extrator na recuperação dos fármacos. Condições de extração: volume de amostra 10 mL, volume de solvente dispersor 800 μL . Concentração dos fármacos 100 $\mu\text{g L}^{-1}$.

5.8.4 Escolha do volume de solvente dispersor

O volume do solvente dispersor afeta diretamente na formação da solução turva com micro-gotas água/solvente e dispersor/solvente extrator, no grau de dispersão do solvente na fase aquosa e, conseqüentemente, na eficiência da extração. Variações no volume de solvente dispersor causam variações no volume da fase sedimentada, tornando necessário, em alguns casos, a modificação simultânea do volume de solvente extrator e dispersor, mantendo constante o volume da fase sedimentada. No caso deste trabalho, isto não foi necessário uma vez que, independente do volume de fase sedimentada produzida no processo, todas as amostras foram secas e ressuspensas em um mesmo volume (200 μL) de fase móvel.

Na Figura 22 podemos observar os resultados obtidos pelas análises. Quando o volume de solvente dispersor aumenta, a solubilidade dos fármacos na água aumenta, diminuindo, então, a partição dos fármacos no clorofórmio, resultando em um decréscimo na eficiência. Baseado nestes dados o volume de 700 μL foi escolhido para os próximos experimentos.

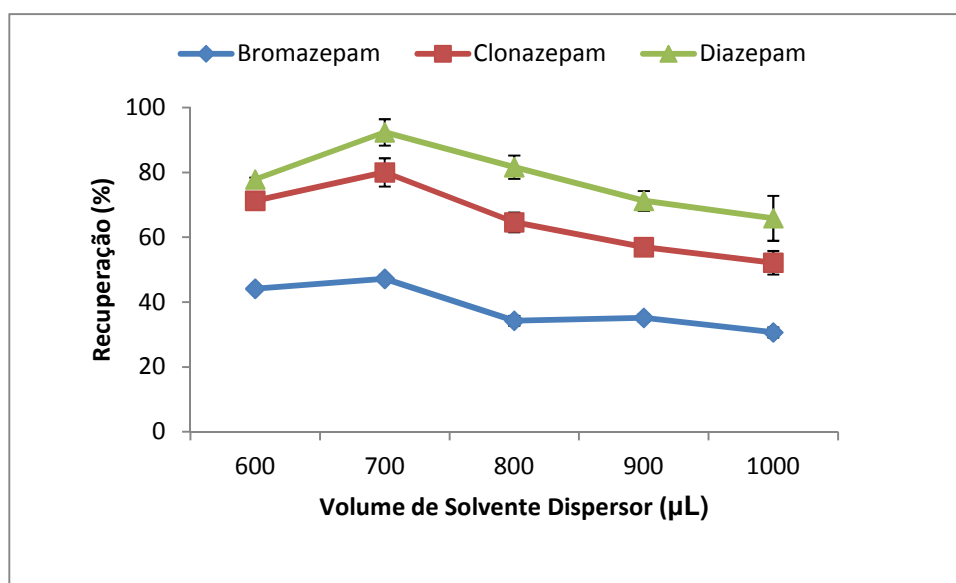


Figura 22 – Efeito do volume de solvente dispersor na recuperação dos fármacos. Condições de extração: volume de amostra 10mL, solvente extrator clorofórmio (200 μL), solvente dispersor metanol. Concentração dos fármacos 100 $\mu\text{g L}^{-1}$.

5.8.5 Efeito do tempo de extração

O tempo de extração é um dos fatores mais importantes em processos de extração. Na DLLME o tempo de extração é definido pelo intervalo entre a injeção da mistura do solvente extrator e dispersor antes da etapa de centrifugação (REZAEE *et al.*, 2006). Entretanto, o equilíbrio entre as fases é atingido rapidamente, devido à grande área superficial existente entre o solvente extrator e a amostra aquosa, que torna a extração independente do tempo, sendo esta a principal vantagem deste método (MARTINS, *et al.*, 2012).

Estes dados podem ser confirmados através da análise da Figura 23, que não mostra nenhuma variação significativa na recuperação dos fármacos com o aumento do tempo de extração.

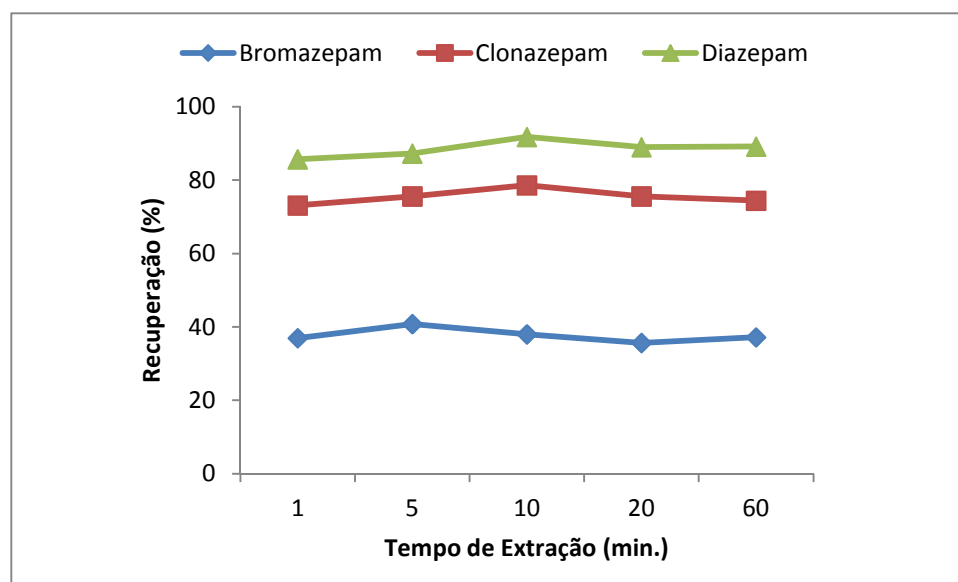


Figura 23 – Efeito do tempo de extração na recuperação dos fármacos por DLLME. Condições de extração: volume de amostra 10 mL, solvente dispersor metanol (700 μL), solvente extrator clorofórmio (200 μL). Concentração dos fármacos 100 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Assim, como a técnica de extração mostrou-se independente do tempo, as posteriores análises foram realizadas com o tempo de 1 minuto.

5.8.6 Avaliação da velocidade e tempo de centrifugação

A avaliação do tempo e velocidade de centrifugação foi estudada neste trabalho, buscando melhorar a eficiência da extração. As Figuras 24 e 25 apresentam os resultados obtidos com as análises.

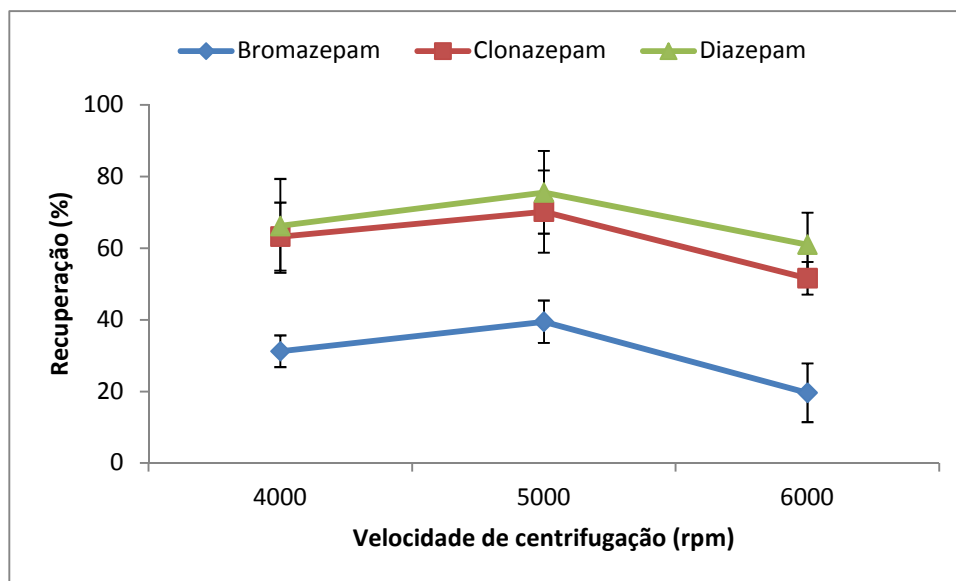


Figura 24 – Avaliação da velocidade de centrifugação na eficiência da extração. Condições de extração: volume de amostra 10 mL, solvente dispersor metanol (700 μL), solvente extrator clorofórmio (200 μL). Concentração dos fármacos 100 $\mu\text{g L}^{-1}$.

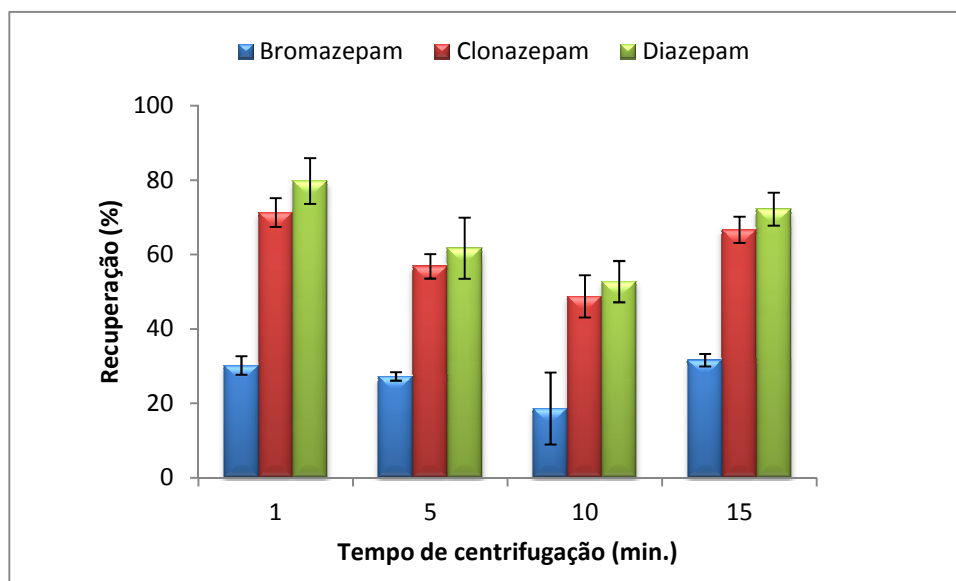


Figura 25 - Avaliação do tempo de centrifugação na eficiência da extração. Condições de extração: volume da amostra 10 mL, solvente dispersor metanol (700 μL), solvente extrator clorofórmio (200 μL), velocidade de centrifugação 5000 rpm. Concentração dos fármacos 100 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Analisando Figura 24, pode-se observar que não houve alterações significativas na recuperação dos analitos com a variação da velocidade de centrifugação, desta forma, a velocidade de 5000 rpm foi selecionada, por apresentar um pequeno acréscimo na eficiência e também por apresentar uma boa separação das fases orgânica e aquosa.

Com relação ao tempo de centrifugação, pode-se visualizar na Figura 25 que houve um decréscimo na recuperação nos tempos de 5 e 10 minutos e uma pequena elevação no tempo de 15 minutos. Estas variações foram ocasionadas, possivelmente, pela instabilidade da centrifuga com o decorrer do tempo. Assim, o tempo de 1 minuto foi selecionado por apresentar a melhor recuperação para os compostos e também por conferir ao método uma maior frequência analítica.

5.8.7 Estudo do efeito da força iônica

O estudo do efeito da força iônica é considerado um fator importante para o aumento na eficiência da extração em DLLME. O aumento na concentração de sal na amostra, aumenta

consideravelmente o volume de fase sedimentada, devido à diminuição da solubilidade do solvente orgânico na fase aquosa (MARTINS, *et al.*, 2012), ocasionado pela preferência das moléculas de água em solvatar os íons do sal adicionado. A Figura 26 evidencia este efeito.

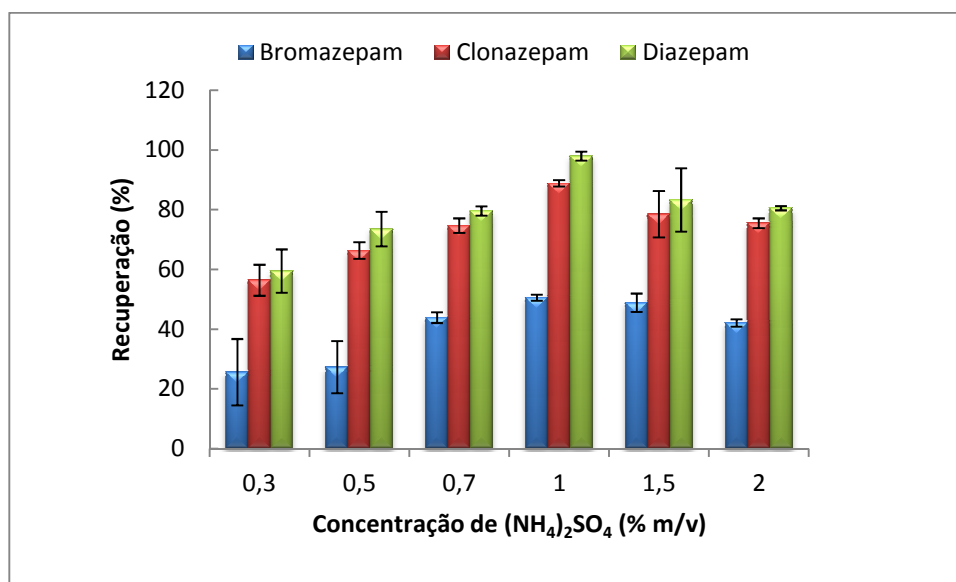


Figura 26 - Avaliação do efeito da adição do sal $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na eficiência da extração. Condições de extração: volume da amostra 10 mL, solvente dispersor metanol (700 μL), solvente extrator clorofórmio (200 μL), velocidade de centrifugação 5000 rpm, tempo de centrifugação 1 minuto. Concentração dos fármacos 100 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Como podemos observar houve um aumento significativo na recuperação dos analitos com a adição do sal $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, o qual foi mais pronunciado na concentração de 1%. Entretanto, concentrações muito elevadas de sal na amostra, podem ocasionar no efeito inverso, diminuindo a eficiência da extração. Este efeito também foi observado em outros trabalhos publicados recentemente (MELWANKI *et al.*, 2009; BIPARVA, EHSANI e HADJMOHAMMADI, 2012; REZAEI, *et al.*, 2009). Com base nos dados obtidos a concentração de 1% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foi escolhida para a utilização nas demais análises.

5.8.8 Estudo do efeito do pH da amostra

O estudo do efeito do pH na amostra é outro parâmetro que deve ser levado em consideração em DLLME, sendo otimizado em função da acidez ou basicidade dos compostos. O ajuste de pH permite que os analitos permaneçam na forma neutra, facilitando a partição dos analitos nas microgotas do solvente extrator, aumentando a eficiência da extração (MARTINS, *et al.*, 2012).

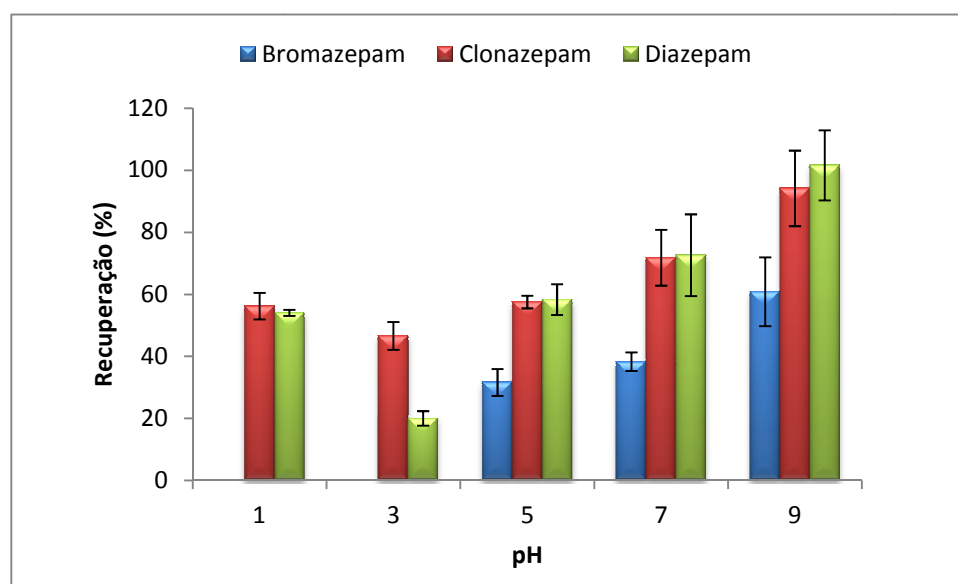


Figura 27 - Avaliação do efeito da variação do pH da amostra na eficiência da extração. Condições de extração: volume da amostra 10 mL com adição de 1% (p/v) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, solvente dispersor metanol (700 μL), solvente extrator clorofórmio (200 μL), velocidade de centrifugação 5000 rpm, tempo de centrifugação 1 minuto. Concentração dos fármacos 100 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Conforme apresentado na Figura 27, houve um acréscimo na recuperação dos analitos em pH mais alcalino. No entanto, esperava-se maior recuperação em pH mais ácido, considerando os valores de pKas apresentados na Tabela 4. Nesse caso, a introdução do metanol como solvente dispersor (meio não aquoso) pode ter causado esse deslocamento que carece de estudos mais aprofundados, visto que ainda não há referência a esse efeito na literatura.

Entretanto, como obtivemos um significativo aumento na eficiência da extração o valor de pH 9,0 foi selecionado para os ensaios posteriores.

5.8.9 Condições otimizadas da DLLME

Após o estudo dos vários parâmetros que influenciam na extração dos benzodiazepínicos empregando o método DLLME, estabeleceu-se o seguinte procedimento: A injeção rápida com auxílio de uma seringa, de uma mistura apropriada do solvente extrator clorofórmio (200 μL) e do solvente dispersor metanol (700 μL), numa amostra de água (10 mL) com 1% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dissolvido e alcalinizada com NaOH 5% (v/v). No momento da mistura, uma solução turva é formada onde as microgotas do solvente extrator são dispersas na fase aquosa. Em seguida, a amostra é centrifugada por 1 minuto a 5000 rpm. Um volume de aproximadamente 140 μL é aliqotado do fundo do tubo cônico, secado com nitrogênio, ressuspendido em 200 μL de fase móvel e levado para análise cromatográfica. A Figura 28 ilustra os parâmetros empregados no método DLLME para extração dos analitos e posterior injeção dos fármacos no sistema cromatográfico

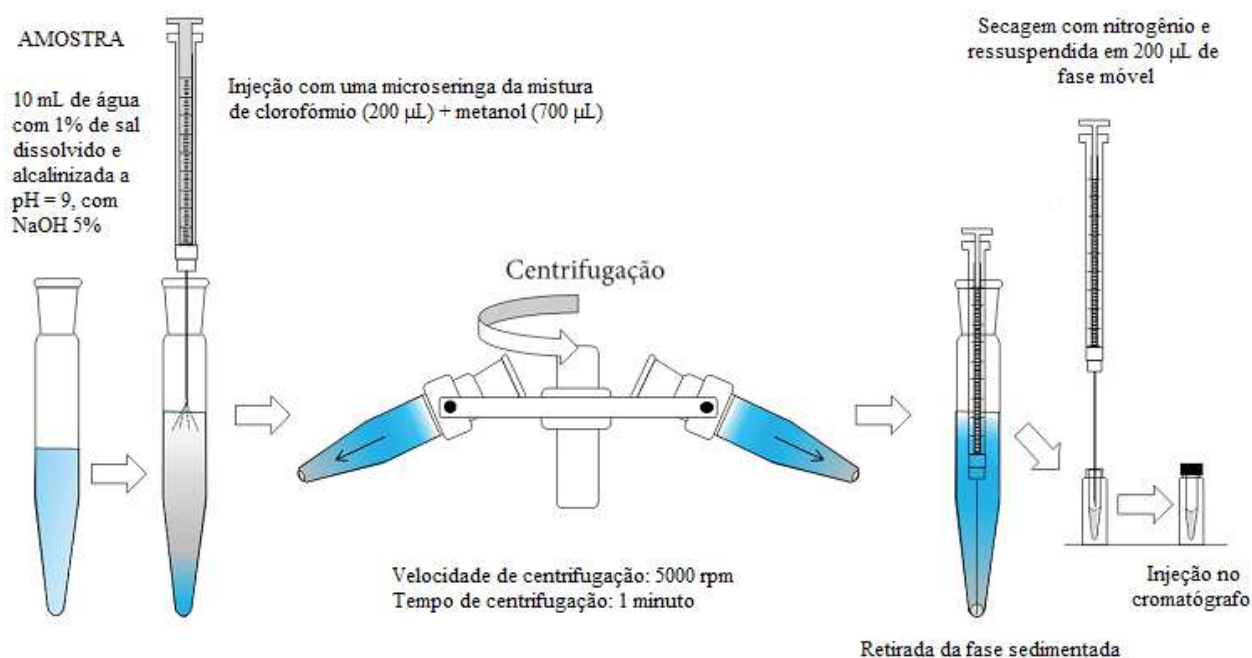


Figura 28 – Esquema das etapas envolvidas na extração por DLLME com os parâmetros otimizados adaptados de (MARTINS, *et al.* 2012).

5.9 Validação do método DLLME combinada com HPLC-UV

5.9.1 Seletividade

No desenvolvimento de método para análise de compostos por cromatografia líquida nas mais diversas matrizes, pode-se confirmar que o método é seletivo, quando não há sobreposição de picos ou co-eluição de interferentes da matriz com os compostos de interesse. Quando injetados os extratos fortificados com os analitos e comparados com um extrato branco, pôde-se observar que não houve a presença de interferentes no mesmo tempo de retenção dos compostos selecionados, conforme pode ser observado na Figura 29, garantindo a seletividade do método proposto.

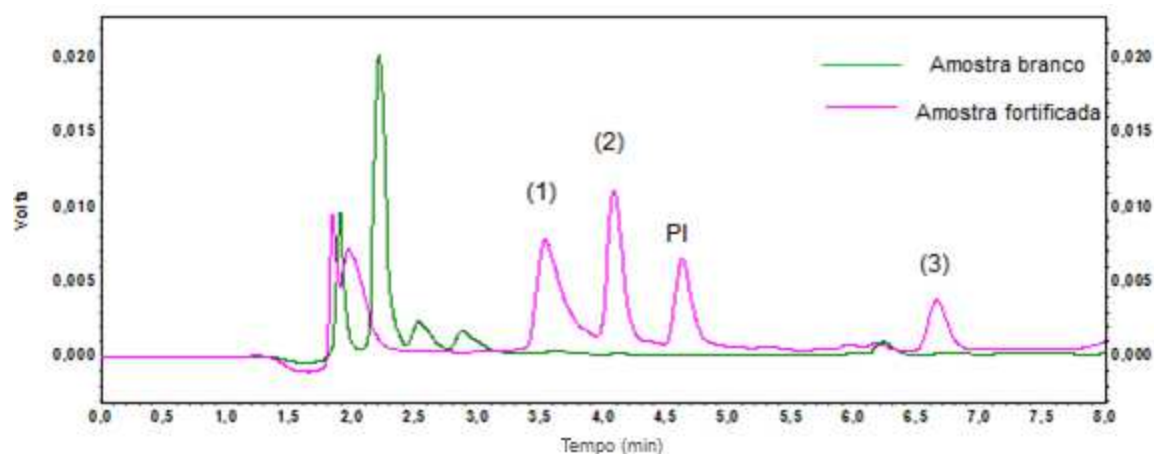


Figura 29 – Cromatograma de confirmação de seletividade do método. Condições cromatográficas: fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v), vazão 1,2 mL min⁻¹, comprimento de onda 225 nm e temperatura do forno 30°C. Analitos: (1) bromazepam 24 µg L⁻¹, (2) clonazepam 12 µg L⁻¹, (3) diazepam 3 µg L⁻¹ e (PI) β-estradiol 1 mg L⁻¹.

5.9.2 Linearidade ou faixa linear de trabalho

A linearidade do método foi obtida através da fortificação com os fármacos estudados, em amostras de água isentas dos analitos, nas concentrações de 8, 24, 48, 80, 96 $\mu\text{g L}^{-1}$ para bromazepam, 4, 12, 24, 40, 48 $\mu\text{g L}^{-1}$ para clonazepam e 1, 3, 6, 10, 12 $\mu\text{g L}^{-1}$ para diazepam com a utilização do método de padronização interna, no qual a concentração de padrão interno foi de 1 mg L^{-1} . As respectivas curvas estão ilustradas nas Figuras 30, 31 e 32.

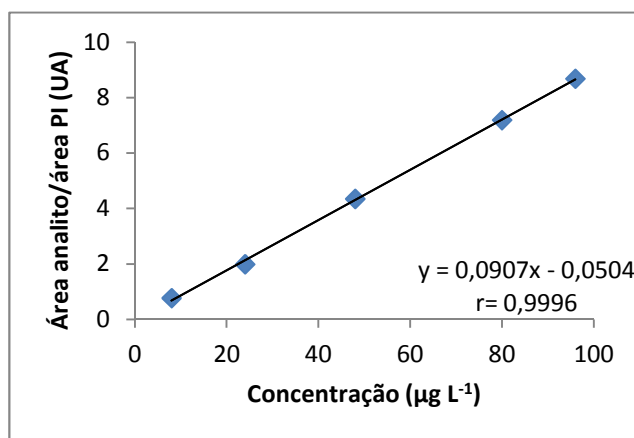


Figura 30 – Curva analítica do bromazepam.

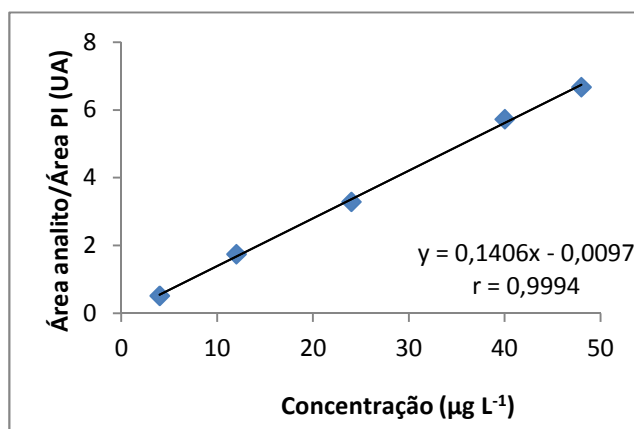


Figura 31 – Curva analítica do clonazepam.

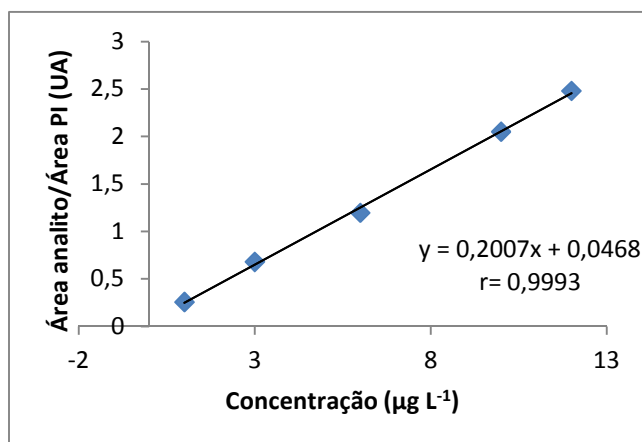


Figura 32 – Curva analítica diazepam.

A linearidade foi expressa pelos valores dos coeficientes de correlação (r) e pela análise dos resíduos. Os coeficientes de correlação linear foram maiores que 0,99, valores estes aceitáveis pelo guia de validação ANVISA (ANVISA, 2003). Os dados obtidos pela construção da curva analítica podem ser observados na Tabela 12.

Tabela 12 – Parâmetros das curvas analíticas obtidos por padronização interna para os analitos utilizando DLLME-HPLC-UV

Analitos	Faixa Linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Equação de reta	r
Bromazepam	8 - 96	$y = 0,0907x - 0,0504$	0,9996
Clonazepam	4 - 48	$y = 0,1406x - 0,0097$	0,9994
Diazepam	1 - 12	$y = 0,2007x + 0,0468$	0,9993

Através da análise de resíduos (Figura 33), verificou-se que estes estão distribuídos aleatoriamente, sem nenhuma tendência, com erros relativos inferiores a 20% dentro da faixa de concentração avaliada, confirmando a linearidade do método, conforme descrito pelo INMETRO (INMETRO, 2011).

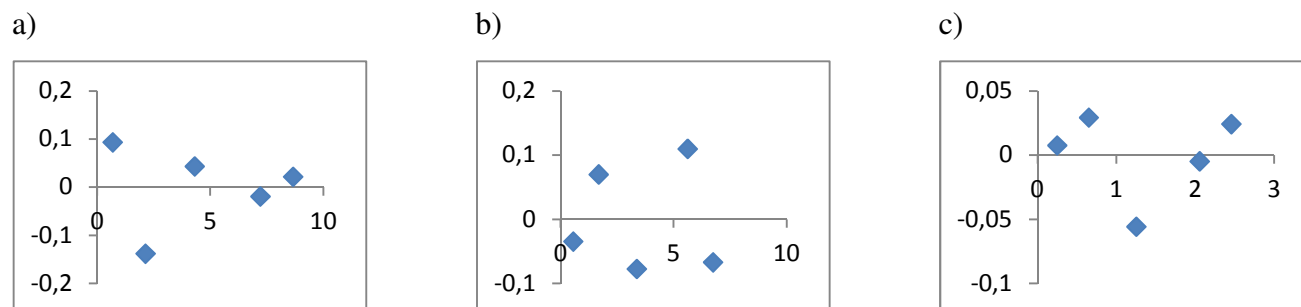


Figura 33 – Gráficos resíduos (a) bromazepam; (b) clonazepam e (c) diazepam.

5.9.3 Limite de detecção e limite de quantificação

No desenvolvimento de um método analítico para determinação de compostos em nível de traço, variáveis como, técnica de extração e tipo de detecção, são otimizadas ou determinadas visando à obtenção de valores de LQ cada vez menores. Com a utilização de um detector UV/Vis a detectabilidade do sistema não é muito favorável, entretanto, este fato justifica a escolha da DLLME como técnica de extração e pré-concentração para a determinação de baixas concentrações, devido a técnica possuir altos fatores de enriquecimento. Na Tabela 13 estão apresentados os valores de LD e LQ obtidos pelo método.

Tabela 13 – Limites de detecção e quantificação obtidos pelo método DLLME-HPLC-UV/Vis

Analitos	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Bromazepam	2,4	8
Clonazepam	1,2	4
Diazepam	0,2	1

Os valores obtidos de LD e LQ mostram que o composto diazepam é o que apresenta a maior detectabilidade para a técnica, pois apresentou os menores valores para LD e LQ. Em contra partida, o bromazepam foi o composto que apresentou menor detectabilidade, apresentando os maiores valores de LD e LQ.

5.9.4 Exatidão e Precisão

A exatidão do método desenvolvido foi determinada por meio de ensaios de recuperação, realizados em 3 níveis diferentes de concentração (CQB, CQM, CQA), em triplicata (ANVISA, 2003). A precisão foi avaliada em termos de repetitividade e precisão intermediária, em 3 níveis de concentração e em triplicata, sendo esta última avaliada por ensaios em 2 dias diferentes com intervalo de 1 semana. Na Tabela 14 são apresentados os valores obtidos para avaliação da exatidão e precisão do método desenvolvido.

Tabela 14 – Recuperação, repetitividade e precisão intermediária obtida para o método desenvolvido

Analitos	Exatidão (%)			Repetitividade (CV %)			Precisão intermediária (CV %)		
	CQB	CQM	CQA	CQB	CQM	CQA	CQB	CQM	CQA
Bromazepam	54,9	49,1	49,0	1,3	1,2	0,1	6,5	1,2	1,1
Clonazepam	110,7	93,4	86,6	3,2	0,4	1,5	11,3	12,7	6,0
Diazepam	104,3	95,6	91,9	4,5	2,7	1,3	0,9	5,1	0,7

Analisando a Tabela 14 pode-se observar recuperações próximas de 100%, tanto para o composto clonazepam, quanto para o diazepam, conforme indicado pela ANVISA. Para o composto bromazepam foram obtidos valores de recuperação próximos a 50%, que apesar de baixos são aceitos, já que garantiram precisão (baixos coeficientes de variação) (ANVISA, 2003).

A precisão do método foi confirmada, pois este apresentou CV menores que 15% para todos os compostos, tanto nos testes de repetitividade, quanto para a precisão intermediária.

5.9.5 Robustez

As variações de proporção e de vazão de fase móvel, não acarretaram diferenças significativas nos resultados, comprovando a robustez do método.

5.10 Análise das amostras coletadas na represa Billing no município de Diadema-SP

O método desenvolvido foi aplicado em amostras reais coletadas na represa Billings. A Universidade Federal de São Paulo tem um programa de coletas regulares de amostras para análise dentro de um projeto coordenado pelo professor Dr. Werner Siegfried Hanisch. Aproveitando esta oportunidade, solicitamos a coleta de amostra para o teste do método desenvolvido neste trabalho.

As amostras foram coletadas no dia 05/01/2014 com um amostrador do tipo simples com garrafa de Van Dorn, em 3 diferentes níveis de profundidade, classificadas como:

- Amostra 01 (superfície);
- Amostra 02 (média profundidade) com 5 metros;
- Amostra 03 (alta profundidade) com 10 metros.

As coordenadas geográficas do ponto de coleta são: 23°43'35,45''S e 46°38'21,56''O.

A Figura 34 mostra os cromatogramas obtidos através das análises.

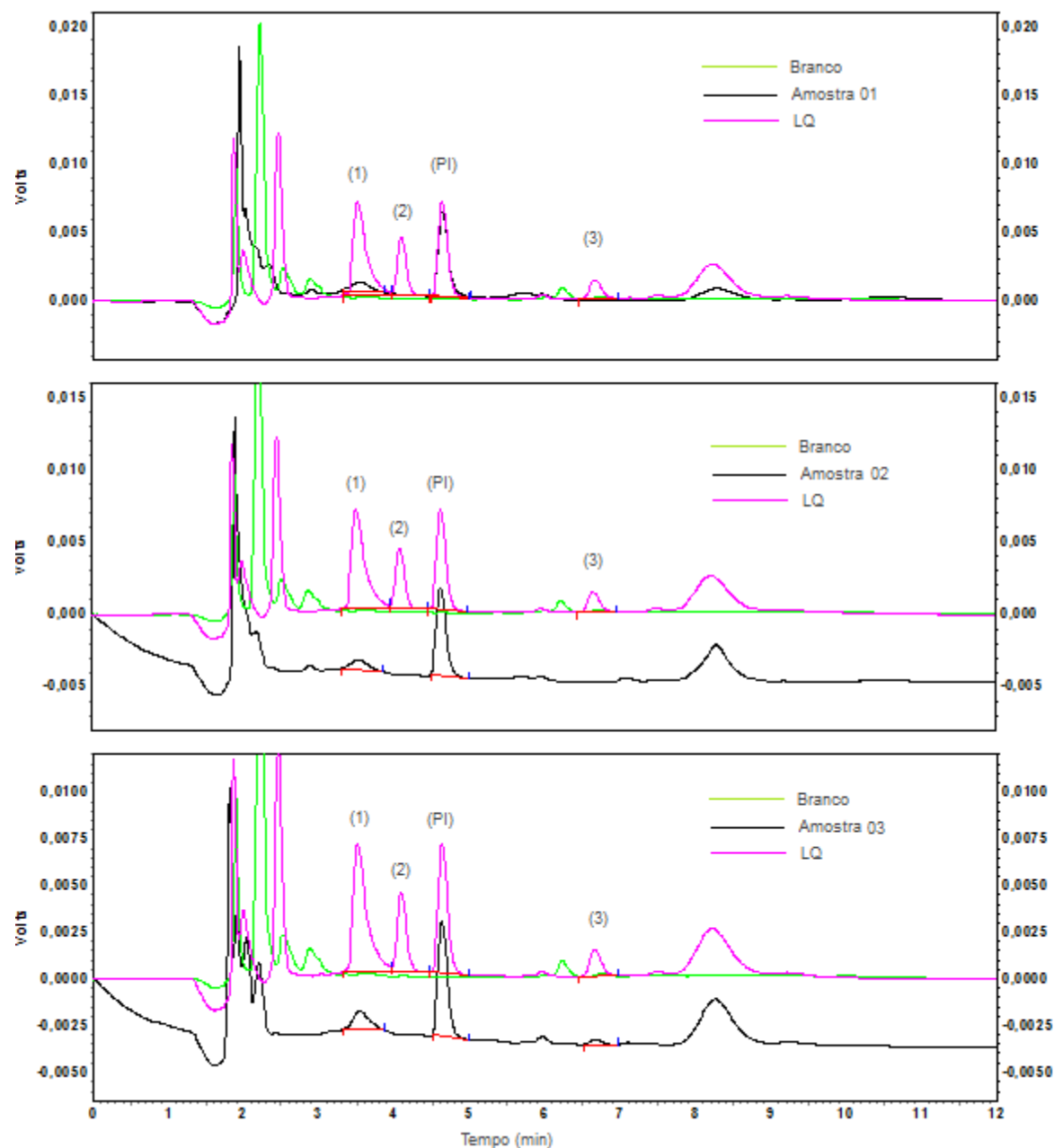


Figura 34 – Cromatogramas obtidos da análise das amostras coletadas na represa Billings. Condições cromatográficas: fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v), vazão 1,2 mL min⁻¹, comprimento de onda 225 nm e temperatura do forno 30°C. Analitos: (1) bromazepam, (2) clonazepam, (3) diazepam e (PI) β -estradiol.

Observando os cromatogramas apresentados na Figura 24, identificamos picos no mesmo tempo de retenção do composto bromazepam em todas as amostras coletadas e apenas na amostra 03 foram identificados também picos no mesmo tempo de retenção do diazepam. Entretanto, não foi possível sua quantificação, pois todos se encontraram numa faixa de concentração abaixo do LQ, mas superior ao LD. Assim estimamos que a concentração em que se encontram os fármacos está entre: 2,4 e 8,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para bromazepam e entre 0,2 e 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para diazepam.

6. CONCLUSÕES

O método cromatográfico desenvolvido em HPLC-UV permitiu a identificação de todos os compostos em estudo em um curto tempo de análise, apresentando uma boa resolução (valores superiores a 1,5), retenção e seletividade analítica para a quantificação dos benzodiazepínicos em água.

A técnica DLLME mostrou-se eficiente para extração de todos os fármacos em estudo com valores de recuperação que variaram de 50 a 110% após otimização. A técnica apresentou também um curto tempo de preparo, menor que 2 minutos para um conjunto de amostras.

A combinação das técnicas HPLC-UV e DLLME mostrou-se eficiente apresentando baixos valores de LQ e rápida para a determinação dos fármacos em estudo.

Na validação do método analítico foram obtidos resultados satisfatórios. As curvas analíticas apresentaram valores de r superiores a 0,999. Os limites de detecção e quantificação encontrados estavam na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$. Para exatidão e precisão foram obtidos valores dentro do estabelecido pela ANVISA, confirmando a exatidão e precisão do método desenvolvido.

Na aplicação do método em amostras de águas coletadas na represa Billings foram identificados picos nos tempos de retenção dos compostos bromazepam (amostras 01, 02 e 03) e diazepam (amostra 03). Entretanto não foi possível sua quantificação, pois todos se encontraram numa faixa de concentração abaixo ao LQ, mas superior ao LD.

Com os resultados obtidos, podemos entender que o Brasil necessita de uma atenção maior para estes novos poluentes classificados como PPCPs e os dados aqui apresentados podem servir de base norteadora para a elaboração de uma legislação que contemple a presença de novos poluentes no meio aquático, muito embora estudos adicionais (como a confirmação por espectrometria de massas e avaliação de riscos referentes à ingestão crônica por seres humanos) sejam necessários.

Referências

AL-ODAINI, P. M.; ZAKARIA, M. P.; YAZIZ, M. I.; SURIF, S. **Multi-residue analytical method for human pharmaceuticals and synthetic hormones in river water and sewage effluents by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry.** Journal of Chromatography A, 1217, 6791-6806, 2010.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. RE nº 899, de 29/05/2003. D.O.União, 02/06/2003. Disponível em < <http://portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 20/07/2013.

BENNETT, R.; TIETGE, J.; CRIPE, G. KOSTICH, M.; LATTIER, D.; AGUIRRE, J.; EIGNOR, D.; HUFF, L.; TOUART, L.; HOLMES, J.; SMITH, G. J. **Aquatic Life Criteria for contaminants of emerging concern.** OW/ORD Emerging Contaminants Workgroup, 1-4, 2008.

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

BIPARVA, F.; EHSANI, M.; HADJMOHAMMADI, M. R. **Dispersive liquid-liquid microextraction using extraction solvents lighter than water combined with high performance liquid chromatography for determination of synthetic antioxidants in fruit juice samples.** Journal of Food Composition and Analysis, 27, 87-94, 2012.

BISCEGLIA, K. J.; YU, J. T.; COELHAN, M.; BOUWER, E. J.; ROBERTS, A. L. **Trace determination of pharmaceuticals and other wastewater-derived micropollutants by solid phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry.** Journal of Chromatography A, 1217, 558-564, 2010.

BOONCHIANGMA, S.; NGEONTAE, W.; SRIJARANAI, S. **Determination of six pyrethroid insecticides in fruit juice samples using dispersive liquid-liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography.** Talanta, 88, 209-215, 2012.

BORGES, K. B.; FREIRE, E. F.; MARTINS, I.; SIQUEIRA, M. E. P. B.. **Simultaneous determination of multibenzodiazepines by HPLC/UV: Investigation of liquid-liquid and solid-phase extractions in human plasma.** Talanta, 78, 133-141, 2009.

BROOKS, B. W.; CHAMBLISS, C. K.; STANLEY, J. K.; RAMIREZ, A.; BANKS, K. E.; JOHNSON, R. D.; LEWIS, R. J. **Determination of select antidepressants in fish from an effluent-dominated stream.** Environmental Toxicology and Chemistry, 24, 464-469, 2005.

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

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia.** Ed. Unicamp, Campinas, 456p, 2006.

CONLEY, J. M.; SYMES, S. J.; KINDELBERGER, S. A.; RICHARDS, S. M. **Rapid liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination for a broad mixture of pharmaceuticals in surface water.** Journal of Chromatography A, 1185, 206-215, 2008.

DARIAS, J. L.; PINO, V. ANDERSON, J. L.; GRAHAN, C. M.; AFONSO, A. M. **Determination of water pollutants by direct-immersion solid-phase microextraction using polymeric ionic liquid coatings.** Journal of Chromatography A, 1217, 1236-1243, 2010.

DAUGHTON, C. G. **Emerging pollutants, and Communicating the Science of Environmental Chemistry and Mass Spectrometry: Pharmaceuticals in the Environment.** J. Am. Soc. Mass Spectrom, 12, 1067-1076, 2001.

DAUGHTON, C. G. **Non-regulated water contaminants: emerging research.** Environmental Impact Assessment Review, 24, 711-732, 2004.

DAUGHTON, C. G. **Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Scientific and Regulatory Issues.** National Exposure Research Laboratory Environmental Sciences, 1-27, 2011.

DEBLONDE, T.; COSSU-LEGUILLE, C.; HARTEMANN, P. **Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature.** International Journal of Hygiene and Environmental Health, 442-448, 2011.

DEGANI, A. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. **Cromatografia um breve ensaio.** Química Nova na Escola, 7, 1998.

DRUMMER, O. H., **Methods for the measurement of benzodiazepines in biological samples.** Journal Chromatography B, 713, 201-225, 1998.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). Disponível em <<http://www.epa.gov>> Acessado em 27/08/2012

EPA. **Water: Safe Drinking Water Act.** Disponível em: <<http://water.epa.gov/lawsregs/rulesregs/sdwa>>. Acesso em 27/08/2012.

EXAME. **Nordeste é o 2º maior consumidor de medicamentos no País.** São Paulo, 2012. Disponível em: <<http://exame.abril.com.br/brasil/noticias>>. Acesso em: 27 fevereiro 2013.

FARRÉ, la M.; PÉREZ, S.; KANTIANI, L.; BARCELÓ, D. **Fate and Toxicity of Emerging Pollutants, their metabolites and Transformation Products in aquatic environment.** Trends in Analytical Chemistry, 27, 11, 992-1007, 2008.

FILHO, R. W. R; SANTOS, L. R; VIEIRA, M. E. **Poluentes Emergentes como desreguladores Endócrinos.** Journal Brazilian Society Environmental, 2, 3, 283-288, 2007.

FONTENELE, E. G. P.; MARTINS, M. R. A.; QUIDUTE, A. R. P.; MONTENEGRO JR, R. M. **Contaminantes ambientais e os interferentes endócrinos.** Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia, 54, 6-16, 2010.

FOSCARINI, T. P. **Benzodiazepínicos: Uma revisão sobre o uso, abuso e dependência.** Trabalho de Conclusão de Curso, Faculdade de farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

FRAM, S. M.; BELITZ, K. **Occurrence and concentrations of pharmaceutical compounds in groundwater used for public drinking-water supply in California.** Science of the Total Environment, 409, 3409-3417, 2011.

GUITART, C.; READMAN, J. W. **Critical evaluation of the determination of pharmaceuticals, personal care products, phenolic endocrine disrupters and faecal steroids by GC/MS and PTV-GC/MS in environmental waters.** Analytica Chimica Acta, 658, 32-40, 2010.

HERRERA-HERRERA, A. V.; BORGEZ, J. H.; MIQUEL, T. M. B.; DELGADO, A. R. D. **Dispersive liquid-liquid microextraction combined with ultra-high performance liquid chromatography for the simultaneous determinations of 25 sulfonamide e quinolone antibiotics in water samples.** Journal of Pharmaceuticals e Biomedical Analysis. 75, 130-137, 2013.

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. Guia de orientação sobre validação de métodos analíticos. DOQ-CGCRE-008, Revisão 04, 2011. Disponível em <http://www.inmetro.gov.br/sidoq/arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf>. Acesso em: 20/07/2013.

JINNO LABORATORY. **Drug data base.** Disponível em: <chrom.tutms.tut.ac.jp/JINNO/DRUGDATA/00database.html>. Acesso em 31/07/2012.

KOPIN, D.; FURLONG, E.; MEYER, M.; THURMAN, E. M.; ZAUGG, S. **Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: A national reconnaissance.** Environmental Science Technology, Vol. 36, 1202-1211, 2002.

KOUTSOUBA. V.; HEBERER, T.; FUHRMANN, B.; BAUMLER, K. S.; TSIPI, D.; HISKIA, A. **Determination of polar pharmaceuticals in sewage water of Greece by gas chromatography–mass spectrometry.** Chemosphere, 51, 69-75, 2003.

LANÇAS, F. M. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise.** São Carlos, Ed. Rima, 46p, 2004.

LE SOLLEU, H.; MAINARD, D.; VINÇON, G.; BANNWARTH, B. **The determination of bromazepam in plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography.** Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis, 11, 771-775, 1993.

LIN, W.C.; CHEN, H. C.; DING, W. H. **Determination of pharmaceutical residues in waters by solid-phase extraction and large-volume on-line derivatization with gas chromatography–mass spectrometry.** Journal of Chromatography A, 1065, 279-285, 2005.

LIU, L.; CHENG, J.; MATSADIQ, G.; ZHOU, H.; LI, J. **Application of DLLME to the Determination of Pyrethroids in Aqueous Samples.** Chromatographia, 72, 1017-1020, 2010.

LOCATELLI, M. A. F.; SODRÉ, F. F.; JARDIM, W. F. **Determination of antibiotics in Brazilian surface waters using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry.** Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 60, 385-393, 2011.

MADUREIRA, T. V.; BARREIRO, J. C.; ROCHA, M. J.; CASS, Q. B.; TIRITAN, M. E. **Pharmaceutical trace analysis in aqueous environmental matrices by liquid chromatography-ion trap tandem mass spectrometry.** Journal of Chromatography A. 1216, 7033-7042, 2009.

MAGALHÃES, L. L. DA SILVA. **Desenvolvimento e validação de método para a determinação multirresíduos de agrotóxicos por cromatografia líquida de alta eficiência em uva in natura.** Tese de Doutorado. Campinas, 2011.

MAGNÉR, J.; FILIPOVIC, M.; ALSBERG, T. **Application of a novel solid-phase-extraction sampler and ultra-performance liquid chromatography quadrupole-time-of-flight mass spectrometry for determination of pharmaceutical residues in surface sea water.** Chemosphere, 80, 1255-1260, 2010.

MARTINS, M. L.; PRIMEL, E. G.; CALDAS, S. S.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R.. **Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME): fundamentos e aplicações.** Scientia Chromatographica, 4, 35-51, 2012.

MAYCOCK, D. S.; WATTS, C. D. **Pharmaceuticals in Drinking Water.** WCA Environment Limited, 472-484, 2011.

MELO, S. A. S.; TROVÓ, A. G.; BAUTITZ, I. R.; NOGUEIRA, R. F. P. **Degradação de fármacos residuais por métodos oxidativos avançados.** Química Nova, 32, 1, 188-197, 2009.

MELWANKI, M. B.; CHEN, W. S.; BAI, H. Y.; LIN, T. Y.; FUH, M. R. **Determination of 7-aminoflunitrazepam in urine by dispersive liquid-liquid microextraction with liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry.** Talanta, 78, 618-622, 2009.

MERCOLINI, L.; MANDRIOLI, R.; IANNELLO, C.; MATRISCIANO, F.; NICOLETTI, F. RAGGI, M. A. **Simultaneous analysis of diazepam and its metabolites in rat plasma and brain tissue by HPLC-UV and SPE.** Talanta. 80, 279-285, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Vigilância e Controle da qualidade da água para consumo humano.** Brasília, 2006.

MOMPELAT, S.; LE BOT, B.; THOMAS, O. **Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water.** Environmental International, 35, 803-814, 2008.

MONTAGNER, C. C. R. **Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos nas águas superficiais da bacia do rio Atibaia.** Dissertação de Mestrado. Campinas, 2007.

PASCHOAL, J. A. R.; RATH, S.; AIROLDI, F. P. da S.; REYES, F.G. R. **Validação de métodos cromatográficos para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos.** Química Nova, 31, 5, 1194-1197, 2008.

PATROLECCO, L.; ADEMOLLO, N.; GRENNI, P. TOLOMEI, A.; CARACCIOLO, A. B.; CAPRI, S. **Simultaneous determination of human pharmaceuticals in water samples by solid phase extraction and HPLC with UV-fluorescence detection.** Microchemical Journal, 107, 165-171, 2013.

PETROVIC, M.; HERNANDO, M. D.; CRUZ, M. S. D.; BARCELÓ, D. **Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceuticals residues in environmental samples: a review.** Journal of chromatography A, 1067, 1-14, 2005.

RANJBARI, E.; GOLBABANEZHAD-AZIZI, A.; HADJMOHAMMADI, M. **Preconcentration of trace amounts of methadone in human urine, plasma, saliva and sweat samples using dispersive liquid-liquid microextraction followed by high performance liquid chromatography.** Talanta. Vol. 94, 116-122, 2012.

REZAEE, M.; ASSADI, Y.; HOSSEINE, M. R. M.; AGHAEI, E.; AHMADI, F.; BERIJANI, S. **Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction.** Journal of chromatography A, 1116, 1-9, 2006.

REZAEE, M.; YAMINI, Y.; SHARIATIBI, S.; ESRAFILI, A.; SHAMSIPUR, M. **Dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography-UV detection as a very simple, rapid and sensitive method for the determination of bisphenol A in water samples.** Journal of Chromatography A, 1216, 1511-1514, 2009.

REZAEE, M.; YAMINI, Y.; FARAJI, M. **Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method.** Journal of Chromatography A, 1217, 2342-2357, 2010.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. **Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos.** Química Nova, 27, 5, 772-778, 2004.

RODIL, R.; QUINTANA, J. B.; MAHIA, P. L.; LORENZO, S. M.; RODRÍGUEZ, D. P. **Multi-residue analytical method for the determination of emerging pollutants in water by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry.** Journal of Chromatography A, 1216, 2958-2969, 2009.

SILVA, Carla G. Azevedo da.; COLLINS, Carol H. **Aplicações da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para o estudo de Poluentes Orgânicos Emergentes.** Química Nova, 34, 4, 665-676, 2011.

SPIRO, Thomas G.; STIGLIANI, William M. **Química Ambiental.** São Paulo: 2ª edição, 2010. 178-179.

TUOTO, E. A. **A descoberta dos benzodiazepínicos.** Brasil, 2009. Disponível em: <<http://historyofmedicine.blogspot.com/2009/04/descoberta-dosbenzodiazepinicos>>. Acesso em: 10 maio 2013.

VARGA, M.; DOBOR, J. HELENKAR, A.; JURECSKA, L.; YAO, J.; ZÁRAY, G. **Investigation of acidic pharmaceuticals in river water and sediment by microwave-assisted extraction and gas chromatography–mass spectrometry.** Microchemical Journal, 95, 353-358, 2010.

VEJA. **Água de 15 capitais tem sinal de contaminação.** São Paulo, 2012. Disponível em: <<http://veja.abril.com.br/brasil/noticia/saude/ameaca-invisivel>>. Acesso em: 30 julho 2012.

VERLICCHI, P.; AL AUKIDY, M.; ZAMBELLO, E. **Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: Removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment - A review.** Science of the Total Environment, 429, 134, 2012.

XAGORARAKI, I.; KUO, D. **Water Pollution: Emerging Contaminants Associated with drinking water.** 539-548, 2008.

XIONG, C.; RUAN, J.; CAI, Y.; TANG, Y. **Extraction and determination of some psychotropic drugs in urine samples using dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography.** Journal of Pharmaceutical and Biochemical Analysis. 49, 572-578, 2009.

YU, Y.; WU, L. **Analysis of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals and personal care products in sewage sludge by gas chromatography–mass spectrometry.** Talanta, Vol. 89, 258-263, 2012.

DURIGAN, M; VAZ, S; ZAMORA, P. **Degradação de poluentes emergentes por processos fenton e foto-fenton.** Química Nova, 35, 7, 1381-1387, 2012.