

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE

**OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA A DETERMINAÇÃO
DE BENZODIAZEPÍNICOS EM AMOSTRAS AMBIENTAIS: AVALIAÇÃO DO
COEFICIENTE DE DISTRIBUIÇÃO SEDIMENTO/ÁGUA**

Tese de Doutorado

Chalder Nogueira Nunes

GUARAPUAVA – PR

2018

CHALDER NOGUEIRA NUNES

OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA A DETERMINAÇÃO DE
BENZODIAZEPÍNICOS EM AMOSTRAS AMBIENTAIS: AVALIAÇÃO DO
COEFICIENTE DE DISTRIBUIÇÃO SEDIMENTO/ÁGUA

Tese de Doutorado apresentada à UNICENTRO, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química, Curso de Doutorado em Química – Associação Ampla UEL/UEPG/UNICENTRO, para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Sueli Pércio Quináia

Co-orientadora: Profa. Dra. Vanessa Egéa dos Anjos (UEPG)

Co-orientadora estrangeira: Hélène Perreault (UofM)

Março / 2018

GUARAPUAVA – PR

Catálogo na Fonte
Biblioteca da UNICENTRO

NUNES, Chalder Nogueira

N972o Otimização de metodologias analíticas para a determinação de benzodiazepínicos em amostras ambientais: avaliação do coeficiente de distribuição sedimento/água / Chalder Nogueira Nunes. – Guarapuava, PR : [s.n], 2018.
136f.

Orientadora: Profa. Dra. Sueli Pércio Quináia

Coorientadora: Profa. Dra. Vanessa Egéa dos Anjos

Coorientadora estrangeira: Hélène Perreault

Tese (doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Química. Associação Ampla Universidade Estadual de Londrina. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Universidade Estadual do Centro-Oeste, PR.

1. Tese – química. 2. Contaminantes emergentes. 3. Voltametria. 4. MALDI-TOF. I. Quináia, Sueli Pércio. II. Anjos, Vanessa Egéa dos. III. Perreault, Hélène. IV. UEL. V. UEPG. VI. UNICENTRO. VII. UofM. VIII. Título.

CDD 660

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Gilmar e Marisa, e à minha querida irmã, Scheisi, que sempre me apoiaram e acreditaram em mim.

AGRADECIMENTOS

Aos meus amigos e colegas que estiveram presentes durante estes dois anos, dando motivos e forças para continuar, e que tiveram, sobretudo, paciência e tolerância comigo, em especial ao meu amigo João Paulo Niemes;

À minha família, meus pais Gilmar e Marisa e minha irmã Scheisi;

Às minhas orientadoras Profa. Dra. Sueli Pércio Quináia e Profa. Dra. Vanessa Egéa dos Anjos pela paciência, amizade, confiança e ensinamentos transmitidos;

À professora Dra. Hélène Perreault e colegas do laboratório por me receberem como estudante de intercâmbio na University of Manitoba (UofM);

Aos professores e secretárias do Departamento de Química e do programa de Pós-Graduação;

Aos colegas e também amigos do LABGATI e CRONAT pelo auxílio e pelos momentos juntos;

Ao professor Dr. Ismael L. Costa Junior pela colaboração na etapa de amostragem de sedimentos e água;

Ao laboratório de solos da UNICENTRO pelas análises de caracterização dos sedimentos;

À Capes pela bolsa concedida para o doutorado e para o programa de doutorado sanduíche;

À UNICENTRO;

E a todos que colaboraram de alguma forma neste trabalho.

RESUMO

Contaminantes de preocupação emergente como fármacos são largamente consumidos e sua entrada no ambiente, mesmo que em baixas concentrações, é constante. Quando alcançam rios e lagos, sua permanência, comportamento e destino ainda não são completamente conhecidos. Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de metodologias analíticas para a determinação de benzodiazepínicos (BDZs), tais como o clonazepam, alprazolam e diazepam, em amostras ambientais e estudar o comportamento destes fármacos em sistemas enriquecidos. Métodos voltamétricos empregando o eletrodo de gota pendente de mercúrio para a determinação de diazepam e clonazepam e espectrométricos empregando ionização e dessorção a laser assistida por matriz com detecção por tempo de voo (*matrix assisted laser desorption ionization with time-of-flight detection* - MALDI-TOF) para a determinação dos três benzodiazepínicos foram desenvolvidos. Parâmetros voltamétricos como potencial de acumulação, velocidade de varredura, amplitude de pulso, tempo de pulso e tempo de equilíbrio, além do pH e tempo de purga foram otimizados. As figuras de mérito estudadas para o DIAZ e CLO por voltametria foram respectivamente: linearidade (0,5 a 20,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 0,49 a 96,12 $\mu\text{g L}^{-1}$), limite de detecção (0,081 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 0,194 $\mu\text{g L}^{-1}$), limite de quantificação (0,271 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 0,646 $\mu\text{g L}^{-1}$), exatidão por estudos de recuperação (72 ± 4 a 108 ± 7 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 87 ± 6 a 120 ± 13 $\mu\text{g L}^{-1}$), precisão (RSD < 10% e RSD < 15%). Para as análises por MALDI-TOF, condições experimentais como a matriz de ionização e solventes foram estudadas, bem como formas de preparo de amostra para água e sedimentos. Formas de extração dos BDZs em sedimentos também foram otimizadas para as determinações voltamétricas. Amostras de sedimentos e água foram coletadas no Brasil e no Canadá e analisadas por voltametria e MALDI-TOF. Porém os BDZs estudados não foram determinados em nenhuma das amostras coletadas. Os métodos voltamétricos desenvolvidos foram ainda utilizados para o estudo do coeficiente de distribuição (K_d) destes fármacos em várias das amostras enriquecidas com os analitos. Os K_d determinados variaram de 1,41 a 21,99 L Kg^{-1} sendo geralmente superiores para o DIAZ e mais baixos para o CLO. Os K_d apresentaram ainda grande variabilidade entre as amostras. Uma relação entre as características físico-químicas das amostras e os K_d obtidos foi observada e confirmada através da análise de componentes principais (PCA). Os valores de K_d mais elevados foram obtidos em sistemas que continham maiores teores de argila e matéria orgânica provavelmente devido à maior interação entre os fármacos e os sedimentos.

Palavras-Chave: Benzodiazepínicos, coeficiente de distribuição, contaminantes emergentes, MALDI-TOF, sedimentos, voltametria.

ABSTRACT

Contaminants of emerging concern as drugs are widely consumed and their entry into the environment, even at low concentrations, is constant. When they reach rivers and lakes, their permanence, behavior and fate are not yet fully known. Thus, the present work aimed to develop analytical methodologies for the determination of clonazepam, alprazolam and diazepam, psychoactive drugs of the benzodiazepine class (BDZs) in environmental samples and to study the behavior of these drugs in enriched systems. Voltammetric methods using the hanging mercury drop electrode for the determination of diazepam and clonazepam and spectrometric method using matrix assisted laser desorption ionization with time-of-flight detection (MALDI-TOF) for the determination of the three benzodiazepines were developed. Voltammetric parameters such as accumulation potential, scan rate, pulse amplitude, pulse time and equilibration time, in addition to pH and purge time were optimized for both drugs. The figures of merit studied for the DIAZ and CLO by voltammetry were respectively: linearity (0.5 to 20.1 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 0.49 to 96.12 $\mu\text{g L}^{-1}$), limit of detection (0.081 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 0.149 $\mu\text{g L}^{-1}$), quantification limit (0.271 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 0.646 $\mu\text{g L}^{-1}$), accuracy by recovery studies (72 ± 4 to 108 ± 7 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 87 ± 6 to 120 ± 13 $\mu\text{g L}^{-1}$), precision (RSD < 10% and RSD < 15%). For the MALDI-TOF analyzes, experimental conditions such as the ionization matrix and solvents were studied, as well as sample preparation procedures for water and sediments. Extraction forms of BDZs in sediments were also optimized for voltammetric determinations. Sediment and water samples were collected in Brazil and Canada and analyzed by voltammetry and MALDI-TOF. However, the BDZs studied were not determined in any of the samples collected. The voltammetric methods developed were also used to study the distribution coefficient (K_d) of these drugs in several samples enriched with the analytes. The K_d determined varied from 1.41 to 21.99 L Kg^{-1} being generally higher for DIAZ and lower for CLO. The K_d presented great variability among the samples. A relation between the physicochemical characteristics of the samples and the K_d obtained was observed and confirmed through Principal Component Analysis (PCA). The highest values of K_d were obtained in systems that contained higher levels of clay and organic matter probably due to the greater interaction between the drugs and the sediments.

Keywords: Benzodiazepines, distribution coefficient, emergent contaminants, MALDI-TOF, sediments, voltammetry.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	i
AGRADECIMENTOS.....	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xiii
1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivos Gerais	19
2.2 Objetivos Específicos	19
3 REFERENCIAL TEÓRICO	20
3.1 Contaminantes emergentes: Fármacos no ambiente.....	20
3.2 Técnicas utilizadas para a determinação de fármacos em amostras ambientais.....	31
Aspectos teóricos da voltametria.....	36
MALDI-TOF: Aspectos teóricos e usos	40
4 PARTE EXPERIMENTAL.....	48
4.1 Amostragem de sedimentos e água naturais e preparo de amostra	48
Pontos de coleta.....	48
Procedimentos de extração e preparo de amostra para as análises voltamétricas	53
Procedimentos de extração e preparo de amostra para as análises espectrométricas.....	54
Caracterização das amostras de sedimentos	55
Caracterização das amostras de água	55
4.2 Reagentes e soluções	56
Análises voltamétricas.....	56
Análises espectrométricas	56
4.3 Instrumentação e condições experimentais	57
Análises voltamétricas.....	57
Análises espectrométricas	58
4.4 Validação dos métodos	59
Análises voltamétricas.....	59
4.5 Estudos do coeficiente de distribuição (K_d)	61
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1 Voltametria cíclica (VC)	63
5.2 Otimização e validação dos métodos voltamétricos.....	67
5.2.1 Diazepam.....	67
Otimização da metodologia.....	67
Validação da metodologia.....	73
5.2.2 Clonazepam.....	80
Otimização da metodologia.....	80
Validação da metodologia.....	85
5.3 Extração e determinação de BDZs em sedimentos	89
5.4 Caracterização das amostras de água e sedimentos	101
5.5 Análise das amostras coletadas para a detecção de BDZs.....	103

5.6	Determinação do coeficiente de distribuição (K_d) empregando voltametria.....	105
5.7	Análises espectrométricas.....	110
6	CONCLUSÕES.....	125
7	REFERÊNCIAS.....	128

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Fórmula estrutural básica dos BDZs e alguns BDZs comumente utilizados..... 24
- Figura 2. Sinais de excitação empregados em voltametria (a) linear, (b) de pulso diferencial para equipamentos analógicos, (c) de pulso diferencial para equipamentos digitais. Adaptado de (SKOOG et al., 2006)..... 37
- Figura 3. Sinal de excitação da onda quadrada. (a) Rampa de voltagem em forma de escada, (b) onda quadrada, (c) sinal de excitação. Adaptado de (ALEIXO, 2003)..... 37
- Figura 4. Resposta de corrente para uma reação reversível, obtida por voltametria de onda quadrada. Adaptado de (ALEIXO, 2003). 38
- Figura 5. Sinal de excitação da voltametria cíclica (a) e voltamograma cíclicos obtido para uma espécie reversível. Voltamogramas obtidos com eletrodo de platina vs eletrodo saturado de calomelano..... 39
- Figura 6. Diferentes formas de preparar uma determinada amostra para ser analisada por MALDI -TOF..... 41
- Figura 7. Microfotografia obtida para o (a) CHCA, (b) DHB e (c) uma mistura entre as duas matrizes (LAUGESSEN; ROEPSTORFF, 2003)..... 43
- Figura 8. Etapa de ionização da matriz e da amostra por meio da incidência de um feixe de laser (JUNIOR, 2015). 44
- Figura 9. Esquematização do funcionamento de um equipamento de MALDI-TOF-MS. Figura adaptada de (<http://dna-barcoding.blogspot.com.br/2013/08/maldi-tof-ms.html>) 44
- Figura 10. Espectro de massa obtido com a matriz HCAC por MALDI-TOF. 46
- Figura 11. Mapa dos locais de amostragem de sedimentos e água no Canadá e Brasil. Figura adaptada de <http://meucantinhodesugestes.blogspot.com.br/2012/01/conhecimentos-em-geografia-atividades.html>, <http://www.desenhosparacolorir24.com/escola-e-aprendizado/geografia-e-mapas/Canada>, e www.diaadia.pr.gov.br/index.php..... 49
- Figura 12. Fotos dos pontos de coleta de amostras de água e sedimentos. Imagens de autoria própria e adaptadas de <http://www.clickfozdoiguacu.com.br/prainha-de-tres-lagoas-passa-por-revitalizacao-para-receber-visitantes/>, <http://www.tourisme-memphremagog.com/en/> e google maps. 51
- Figura 13. Estudos com VC para o CLO. (A) Eletrólito suporte: tampão fosfato pH 7,0. (B) Voltamogramas cíclicos obtidos para uma solução $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de CLO em meio de eletrólito de suporte, pH 7. (C) Dependência de I_p em função da v para o primeiro pico (-0,4 V). (D) Dependência de I_p em função da v para o segundo pico (-1,04 V). Parâmetros de análise: E_{ac} , -0,8 V; t_{ac} , 120 s; pH 7,0..... 64
- Figura 14. Tratamento dos dados obtidos na determinação do CLO por VC para a compreensão dos processos eletroquímicos. (A) Interação entre I_p e $v^{1/2}$ para o primeiro pico (-0,4 V). (B) Interação entre \log de I_p e \log de v para o primeiro pico (-0,4 V). (C) Interação entre I_p e $v^{1/2}$ para o segundo pico (-1,04 V). (D) Interação entre \log de I_p e \log de v para o segundo pico (-1,04 V)..... 65

Figura 15. Estudos com VC para o DIAZ. (A) Voltamogramas cíclicos de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de DIAZ. (B) Dependência de I_p em função da vv empregada. Parâmetros de análise: E_{ac} , -0,8 V; t_{ac} , 120 s; pH 7,0.....	66
Figura 16. Tratamento dos dados obtidos na determinação do DIAZ por VC para a compreensão dos processos eletroquímicos envolvido. (A) Iteração entre I_p e $vv^{1/2}$. (B) Interação entre log de I_p e log de vv.....	67
Figura 17. Voltamogramas obtidos na análise do eletrólito suporte tampão fosfato pH 7,0 com diferentes tempos de purga (VRC PD). (A) Voltamogramas completos para o eletrólito suporte. (B) Gráfico da intensidade de corrente de pico em função do tempo de purga empregado para a análise voltamétrica do eletrólito de suporte. Parâmetros utilizados: E_{ac} , -0,8 V; t_{ac} , 120 s; velocidade de varredura 25 mV s^{-1}	68
Figura 18. Sistema de gás com frasco de lavagem acoplado.	69
Figura 19. Estudo do pH utilizando VRC PD em meio de eletrólito suporte tampão fosfato (A) Voltamogramas obtidos na determinação de 9,95 $\mu\text{g L}^{-1}$ de DIAZ. (B) Relação entre a intensidade de corrente de pico (I_p) e o pH da solução. Parâmetros empregados: E_{ac} , -0,6 V; t_{ac} , 120 s; velocidade de varredura 25 mV s^{-1} ; amplitude de pulso, 80 mV; tempo de pulso, 40 ms.	70
Figura 20. Estudo do potencial de acumulação empregado VRC PD em meio de eletrólito suporte tampão fosfato, pH 6,0. (A) Voltamogramas obtidos na determinação de 9,95 $\mu\text{g L}^{-1}$ de DIAZ. (B) Relação entre a intensidade de corrente de pico (I_p) e o E_{ac} aplicado. Parâmetros empregados: amplitude de pulso, 80 mV; tempo de pulso, 40 ms; velocidade de varredura, 25 mV s^{-1} ; t_{ac} , 120 s.	71
Figura 21. Estudo da velocidade de varredura utilizando VRC PD em meio de eletrólito suporte tampão fosfato, pH 6,0. (A) Voltamogramas obtidos na determinação de 9,95 $\mu\text{g L}^{-1}$ de DIAZ. (B) Relação entre a intensidade de corrente de pico (I_p) e a velocidade de varredura aplicada. Parâmetros empregados: E_{ac} , -0,6 V; t_{ac} , 120 s; amplitude de pulso, 80 mV; tempo de pulso, 40 ms.....	71
Figura 22. Estudo de amplitude de pulso utilizando VRC PD em meio de eletrólito suporte tampão fosfato pH 6,0 (A) Voltamogramas obtidos na determinação de 9,95 $\mu\text{g L}^{-1}$ de DIAZ. (B) Relação entre a intensidade de corrente de pico (I_p) e a amplitude de pulso. Parâmetros empregados: E_{ac} , -0,6 V; t_{ac} , 120 s; velocidade de varredura 40 mV s^{-1} ; tempo de pulso, 40 ms.	72
Figura 23. Estudo do tempo de pulso utilizando VRC PD em meio de eletrólito suporte tampão fosfato pH 6,0 (A) Voltamogramas obtidos na determinação de 9,95 $\mu\text{g L}^{-1}$ de DIAZ. (B) Relação entre a intensidade de corrente de pico (I_p) e o tempo de pulso empregado. Parâmetros empregados: E_{ac} , -0,6 V; t_{ac} , 120 s; velocidade de varredura 40 mV s^{-1} ; amplitude de pulso, 100 mV.	73
Figura 24. Estudos de seletividade para 4,96 $\mu\text{g L}^{-1}$ de DIAZ utilizando VRC PD em meio de eletrólito suporte tampão fosfato pH 6,0. (A) Relação entre I_p e concentração dos fármacos interferentes. (B) Voltamogramas obtidos na determinação do diazepam com adições consecutivas de ALP. Parâmetros empregados: E_{ac} , -0,6 V; t_{ac} , 120 s; velocidade de varredura 40 mV s^{-1} ; amplitude de pulso, 100 mV; tempo de pulso, 40 ms.	74
Figura 25. Estudos de interferência de ácidos húmicos sobre o sinal voltamétrico do DIAZ.	77

- Figura 26. Estudos de seletividade para $4,96 \mu\text{g L}^{-1}$ de DIAZ utilizando VRC PD em meio de eletrólito suporte tampão fosfato pH 6,0. Avaliação de interferentes inorgânicos. (A) Voltamogramas obtidos na determinação do DIAZ com adições consecutivas de solução de zinco na cela voltamétrica. (B) Relação entre I_p e concentração dos íons metálicos interferentes. Parâmetros empregados: E_{ac} , -0,6 V; t_{ac} , 120 s; velocidade de varredura 40 mV s^{-1} ; amplitude de pulso, 100 mV; tempo de pulso, 40 ms. 78
- Figura 27. Estudo da linearidade utilizando VRC PD em meio de eletrólito suporte tampão fosfato pH 6,0 (A) Voltamogramas obtidos para a curva de calibração do DIAZ. (B) Curva de calibração do DIAZ. Parâmetros empregados: E_{ac} , -0,6 V; t_{ac} , 120 s; velocidade de varredura 40 mV s^{-1} ; amplitude de pulso, 100 mV; tempo de pulso, 40 ms. 79
- Figura 28. Estudo do pH utilizando VRC PD em meio de eletrólito suporte tampão fosfato. (A) Voltamogramas obtidos na determinação de $9,98 \mu\text{g L}^{-1}$ de CLO. (B) Relação entre a intensidade de corrente de pico (I_p) e o pH da solução. Parâmetros empregados: E_{ac} , -0,3 V; t_{ac} , 120 s; velocidade de varredura 25 mV s^{-1} ; amplitude de pulso, 80 mV; tempo de pulso, 40 ms. 81
- Figura 29. Estudo do potencial de acumulação utilizando VRC PD em meio de eletrólito suporte tampão fosfato pH 8,0. (A) Voltamogramas obtidos na determinação de $9,98 \mu\text{g L}^{-1}$ de CLO. (B) Relação entre a intensidade de corrente de pico (I_p) e o E_{ac} empregado. Parâmetros empregados: t_{ac} , 120 s; velocidade de varredura 25 mV s^{-1} ; amplitude de pulso, 80 mV; tempo de pulso, 40 ms..... 81
- Figura 30. Estudo do tempo de acumulação utilizando VRC PD em meio de eletrólito suporte tampão fosfato pH 8,0. (A) Voltamogramas obtidos na determinação de $9,98 \mu\text{g L}^{-1}$ de CLO. (B) Relação entre a intensidade de corrente de pico (I_p) e o t_{ac} empregado. Parâmetros empregados: E_{ac} , -0,3 V; velocidade de varredura 25 mV s^{-1} ; amplitude de pulso, 80 mV; tempo de pulso, 40 ms..... 82
- Figura 31. Estudo da amplitude de pulso utilizando VRC PD em meio de eletrólito suporte tampão fosfato pH 8,0. (A) Voltamogramas obtidos na determinação de $9,98 \mu\text{g L}^{-1}$ de CLO. (B) Relação entre a intensidade de corrente de pico (I_p) e a amplitude de pulso. Parâmetros empregados: E_{ac} , -0,3 V; velocidade de varredura 25 mV s^{-1} ; t_{ac} 120 s; tempo de pulso, 40 ms. 83
- Figura 32. Estudo do tempo de pulso utilizando VRC PD em meio de eletrólito suporte tampão fosfato pH 8,0. (A) Voltamogramas obtidos na determinação de $9,98 \mu\text{g L}^{-1}$ de CLO. (B) Relação entre a intensidade de corrente de pico (I_p) e o tempo de pulso. Parâmetros empregados: E_{ac} , -0,3 V; velocidade de varredura 25 mV s^{-1} ; t_{ac} 120 s; amplitude de pulso, 80 mV..... 83
- Figura 33. Estudo da velocidade de varredura utilizando VRC PD em meio de eletrólito suporte tampão fosfato pH 8,0. (A) Voltamogramas obtidos na determinação de $9,98 \mu\text{g L}^{-1}$ de CLO. (B) Relação entre a intensidade de corrente de pico (I_p) e a velocidade de varredura. Parâmetros empregados: E_{ac} , -0,3 V; t_{ac} 120 s; amplitude de pulso, 80 mV; tempo de pulso, 40 ms. 84
- Figura 34. Estudos de seletividade para $5,02 \mu\text{g L}^{-1}$ de CLO utilizando VRC PD em meio de eletrólito suporte tampão fosfato pH 8,0. (A) Relação entre I_p e concentração dos fármacos interferentes. (B) Relação entre I_p e concentração dos íons metálicos interferentes. (C) Voltamogramas obtidos na avaliação da interferência causada pelo Zn^{2+} . (D) Voltamogramas

obtidos na avaliação da interferência causada pelo Fe^{3+} . Parâmetros empregados: E_{ac} , -0,3 V; t_{ac} 120 s; amplitude de pulso, 80 mV; tempo de pulso, 40 ms; vv, 25 mV s^{-1} .	86
Figura 35. Estudos de interferência de ácidos húmicos sobre o sinal voltamétrico de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de DIAZ.	87
Figura 36. Estudo da linearidade utilizando VRC PD em meio de eletrólito suporte tampão fosfato pH 8,0 (A) Voltamogramas obtidos para a curva de calibração do CLO. (B) Curva de calibração do CLO. Parâmetros empregados: E_{ac} , -0,3 V; t_{ac} , 120 s; velocidade de varredura 25 mV s^{-1} ; amplitude de pulso, 80 mV; tempo de pulso, 20 ms.	87
Figura 37. Voltamogramas sem tratamento de linha base obtidos na avaliação do metanol como solvente extrator. (A) Determinação do CLO em extrato obtido com metanol 100%. (B) Determinação do CLO em extrato obtido com metanol/água (1:1). (C) Determinação do ALP em extrato obtido com metanol 100%. (D) Determinação do ALP em extrato obtido com metanol/água (1:1). (E) Determinação do DIAZ em extrato obtido com metanol 100%. (F) Determinação do DIAZ em extrato obtido com metanol/água (1:1). As condições experimentais otimizadas para cada BDZ foram empregadas neste estudo.	91
Figura 38. Gráfico de Pareto referente ao estudo de extração do ALP de sedimentos realizados com o planejamento fatorial 2^3 ($\alpha=0,05$). Onde o fator A é a massa de amostra, B é a forma de extração e C corresponde ao tempo de extração empregado.	93
Figura 39. Gráficos de interações dos fatores utilizados no planejamento fatorial 2^3 . (A) Relação entre massa da amostra, forma de extração e recuperação (%). (B) Relação entre massa da amostra, tempo de extração e recuperação (%). (C) Relação entre tempo de extração, forma de extração e recuperação (%)	94
Figura 40. Voltamogramas obtidos a partir das extrações dos BDZs de sedimentos enriquecidos com 1 $\mu\text{g g}^{-1}$ de cada BDZ empregando 3 extrações consecutivas com 3 mL do solvente extrator metanol/água (1:1) pH 12 em banho ultrassônico por 15 minutos. (A) Voltamogramas referentes a determinação de 5,07 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ALP em cela voltamétrica pH 7 e condições voltamétricas otimizadas. (B) Voltamogramas referentes a determinação de 5,01 $\mu\text{g L}^{-1}$ de DIAZ em cela voltamétrica pH 6 e condições voltamétricas otimizadas. (c) Voltamogramas referentes a determinação de 2,51 $\mu\text{g L}^{-1}$ de CLO em cela voltamétrica pH 8 e condições voltamétricas otimizadas.	98
Figura 41. Extratos de sedimento em diferentes condições de extração. (H) Metanol/água (1:1) pH 12. (I) Metanol/água (1:1) pH 3,8. (J) Metanol/água (1:1) + 0,11g de NaCl.	99
Figura 42. Voltamogramas obtidos na determinação voltamétrica de 2,51 $\mu\text{g L}^{-1}$ de CLO resultantes da extração de 0,5 g de sedimento com metanol/água (1:1) pH 12 com adição de NaCl. As condições de análise foram: volume da cela, 10 mL; volume de amostra, 0,5 mL; pH 8 e condições voltamétricas otimizadas.	100
Figura 43. Sedimentos coletados para os estudos de K_d .	103
Figura 44. Análise de componentes principais. (A) Gráfico de pesos para PC1 e PC2 (B) Gráfico de escores para as componentes principais 1 e 2.	108
Figura 45. Coordenadas dos Fatores 1 (A) e 2 (B) para as variáveis analisadas na PCA para o estudo do K_d dos BDZs.	109
Figura 46. Padrão isotópico dos BDZs (A) DIAZ, (B) ALP e (C) CLO.	111

Figura 47. Espectros obtidos nos estudos de escolha de matriz para a determinação do (A) DIAZ, (B) ALP e (C) CLO.	113
Figura 48. Espectros obtidos para a determinação de 1 mg L ⁻¹ de DIAZ, ALP e CLO em altas (A, C e E) e baixas (B, D e F) concentrações da matriz respectivamente.....	115
Figura 49. Espectro obtido no estudo de extração e pré-concentração de BDZs de água ultrapura utilizando coluna SPE. Estudo conduzido com solução contendo 0,5 µg L ⁻¹ dos BDZs.	116
Figura 50. Espectro obtido no estudo de extração e pré-concentração de BDZs de água superficial do Red River utilizando coluna SPE. Estudo conduzido com solução contendo 5 µg L ⁻¹ dos BDZs.....	117
Figura 51. Espectros obtidos nos estudos de extração e pré-concentração de BDZs de água superficial do Red River utilizando método QuEChERS. (A) Amostra sem os BDZs. (B) Amostra contendo 10 µg L ⁻¹ dos BDZs.	118
Figura 52. Cromatogramas obtidos para solução de 1 mg L ⁻¹ de BDZs preparada em água ultrapura. λ 250 nm e coluna Synergi 4 µm Polar – RP 80 A, 50 x 4.6 mm 4 µm. Fase móvel A (H ₂ O com 0,1% de HAC), B (metanol com 0,1% de HAC), condição de eluição por gradiente.	120
Figura 53 Cromatogramas obtidos com amostra real de sedimentos enriquecida com 50 ng dos BDZs. As condições de eluição descritas na Tabela 17 foram utilizadas.	121
Figura 54. Espectros obtidos na otimização do procedimento de cleanup em extrato de sedimentos do Red River enriquecidos com 0,5 µg g ⁻¹ de DIA e ALP. (A) Proporção A/B (6:4). (B) Proporção A/B (4:6). 100% B.	123
Figura 55. Espectros obtidos com as condições otimizadas de extração e cleanup para a detecção de 0,4 µg g ⁻¹ de DIAZ e ALP em sedimentos do Red River.....	124

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características físico-químicas e farmacocinéticas de BDZs.....	25
Tabela 2. Locais de amostragem de sedimentos e águas naturais.....	49
Tabela 3. Condições estudadas de cada parâmetro para a otimização dos métodos voltamétricos para o DIAZ e CLO.....	58
Tabela 4. Parâmetros de análise otimizados para a determinação do DIAZ.....	73
Tabela 5. Estudos de recuperação do DIAZ na presença de outros BDZs.....	75
Tabela 6. Estudos de adição e recuperação em água ultrapura e águas naturais para o DIAZ.....	79
Tabela 7. Estudos de precisão para o DIAZ.....	80
Tabela 8. Parâmetros analíticos otimizados para a determinação do CLO.....	84
Tabela 9. Estudos de adição e recuperação em água ultrapura e águas naturais para o CLO.....	88
Tabela 10. Estudos de precisão para o CLO.....	88
Tabela 11. Planejamento fatorial 2^3 para as condições de extração do ALP do sedimento.....	93
Tabela 12. Experimentos com diferentes solventes extratores para o ALP.....	96
Tabela 13. Resultados obtidos na extração dos BDZs dos sedimentos.....	100
Tabela 14. Características físico-químicas das amostras de água e sedimentos.....	101
Tabela 15. Coeficientes de distribuição sedimento/água dos BDZs em amostras naturais enriquecidas.....	105
Tabela 16. Escores das variáveis analisadas para PC1 e PC2.....	109
Tabela 17. Condições de fluxo da fase móvel para corrida cromatográfica.....	120

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
ALP	Alprazolam
BDZs	Benzodiazepínicos
C	Carbono orgânico total
C_a	Concentração em água
C_s	Concentração em sedimento
COD	Carbono orgânico dissolvido
CHCA	Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLO	Clonazepam
DIAZ	Diazepam
DHB	Ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB)
DME	Dropping mercury electrode
E_{pico}	Potencial de meia onda
E_{ac}	Potencial de acumulação
ETE	Estação de tratamento de esgoto
F_{reg}	F de regressão
F_{faj}	F de falta de ajuste
HMDE	Hanging mercury drop electrode (eletrodo de gota pendente de mercúrio)
I_p	Intensidade de corrente de pico
K_d	Coeficiente de distribuição
LD	Limite de detecção
LORAZ	Lorazepam
LQ	Limite de quantificação
MALDI-TOF-MS	Matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight – mass spectrometry
MO	Matéria orgânica
NIM	Nimesulida
OXAZ	Oxazepam
PD	Pulso diferencial
QuEChERS	Quick easy cheap effective rugged and safe
RSD	Desvio padrão relativo

SA	Ácido sinapínico
SD	Desvio padrão
SDHB	DHB mais ácido 2-hidroxi-5-methoxibenzoic
SPE	Solid phase extraction
SW	Onda quadrada
t_{ac}	Tempo de acumulação
THAP	2',4',6'-Trihidroxiacetophenone monohidratado
VC	Voltametria cíclica
vv	Velocidade de varredura
$vv^{1/2}$	Raiz quadrada da velocidade de varredura

1 INTRODUÇÃO

Com o crescimento populacional e, por conseguinte, a produção e a aquisição desenfreada de bens de consumo, a geração de resíduos orgânicos e inorgânicos, tanto domésticos quanto industriais, alcançou patamares jamais vistos. Neste sentido, a química analítica vem sendo empregada em uma das suas mais nobres aplicações, o monitoramento de áreas atingidas por contaminação humana, ou afetadas em decorrência de nossas atividades. Desastres ambientais como o ocorrido na cidade de Mariana – MG, em novembro de 2015, são responsáveis pela contaminação de grandes áreas. O rompimento de uma barragem de rejeito de mineração liberou aproximadamente 62 milhões de metros cúbicos de lama que continham resíduos metálicos. Além dos impactos ambientais imediatos, uma herança química foi deixada no local, nos rios e até mesmo no mar na região de Espírito Santo onde deságua o Rio Doce que foi atingido e carregou os rejeitos contendo metais tóxicos por quilômetros (COSTANTI; MENEZES, 2015; DOS SANTOS, 2017; SANTOS, 2017). O acompanhamento das espécies contaminantes presentes e de seus teores em solos, águas, sedimentos, animais, etc., provavelmente será realizado por muitos anos para monitorar a região. Tal monitoramento empregará diversas técnicas e metodologias analíticas. Além de espécies inorgânicas como os contaminantes do desastre previamente mencionado, compostos orgânicos, por sua vez, também são contaminantes em inúmeras situações.

A atividade agrícola mundial foi responsável pela contaminação de centenas de milhares de alqueires cultivados por defensivos agrícolas, já usados a décadas (ERDOĞDU; TITRETIR, 2007). Por consequência, águas subterrâneas e superficiais também foram atingidas bde contaminantes emergentes ou contaminantes de preocupação emergente (CE) em ambientes naturais (DE FIGUEIREDO-FILHO et al., 2017; MEFFE; DE BUSTAMANTE, 2014; PAGE et al., 2014). CE são assim conhecidos por terem sua presença ou importância no ambiente sido recentemente constatada, bem como não serem legislados. Além disso, os mesmos CE encontradas em solos e águas naturais são motivos de preocupação em águas de abastecimento público, alimentos e organismos aquáticos (EL-SHAHAWI et al., 2011; MONTAGNER et al., 2014). São classificados como CE contaminantes não conhecidos ou não reconhecidos. Muitos CE estão presentes no ambiente há vários anos, entretanto, sua presença ou seus efeitos não eram conhecidos. Além disso, estes contaminantes geralmente não são legislados e desta forma, não existem parâmetros de teores seguros destes contaminantes no ambiente (PANINI et al., 2011).

Dentre os CE, os produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PFHP) têm despertado interesse da comunidade científica devido ao seu grande uso diário, presença em ambientes

naturais e efeitos nocivos ainda não totalmente elucidados. Os fármacos podem ter aplicações humanas e veterinárias. A contaminação de ambientes por fármacos ocorre principalmente através da excreção do princípio ativo e de seus metabólitos, que podem também ser contaminantes. Após o consumo de medicamentos, sabe-se que apenas uma porcentagem do princípio ativo é metabolizado e cumpre sua função farmacológica enquanto a outra parte é excretada de forma intacta e totalmente ativa. (DÍAZ-CRUZ; LÓPEZ DE ALDA; BARCELÓ, 2003) No que se refere ao uso veterinário, os excrementos, contendo fármacos são, em sua quase totalidade, dispostos diretamente no ambiente sem quaisquer tratamentos. Desta forma, estes contaminantes podem ser carregados para os rios ou águas subterrâneas por meio da ação das chuvas. Para os fármacos de uso humano, sua rota de contaminação se divide em dois principais caminhos. Infelizmente, as redes de saneamento básicos alcançam a minoria da população mundial, e nem mesmo o esgoto coletado, é em sua totalidade tratado. Sendo assim, o aporte de esgoto bruto em rios e lagos ainda é realidade em pleno século XXI, levando não só uma carga orgânica e potencialmente patogênica para nossas águas, mas também CE como os fármacos. Além disso, a literatura nos mostra que a maioria das nossas estações de tratamento de esgoto (ETE) não são 100% eficientes na retenção e remoção de CE. Estas ETE têm por objetivo, principalmente a diminuição da carga orgânica total e biológica, retenção de sólidos, controle do pH e temperatura dos efluentes e, desta forma, os fármacos parcialmente removidos alcançam os rios com prejuízos ainda desconhecidos.

A presença de fármacos em afluentes e efluentes de ETE (antes e após o tratamento) e em rios que sofrem com o aporte de esgoto doméstico e industrial, tratado e bruto, foi constatada em diversos países. Para muitos fármacos, o seu comportamento e destino quando no meio aquático ainda são desconhecidos, bem como seus efeitos sobre o ecossistema. A distribuição de um fármaco no sistema aquático pode ser numericamente representada pela determinação do coeficiente de distribuição (K_d) entre os sedimentos e a água. Este coeficiente é encontrado determinando a razão entre a concentração do analito nos sedimentos e a sua concentração na água, respectivamente. Coeficientes de distribuição mais elevados, apontam para maior afinidade do analito com os sedimentos, enquanto K_d mais baixos são obtidos para substâncias com maior afinidade com a fase aquosa (LÖFFLER et al., 2005; ZHOU; BROODBANK, 2014). Zhou e Broodbank (2014) avaliaram a distribuição de 9 fármacos no sistema sedimento/águas. Os autores concluíram que os fármacos apresentaram grande variabilidade no K_d . Além disso, observaram uma diminuição do K_d com o aumento da concentração de sólidos suspensos (ZHOU; BROODBANK, 2014). Loffler e colaboradores (2005), por outro lado, utilizaram sistemas enriquecidos com 6 fármacos e 4 metabólitos para avaliar a persistência e o K_d em sistemas sedimento/água. Dentre os analitos, o diazepam e o

oxazepam foram estudados, dois benzodiazepínicos. Os autores observaram que os dois benzodiazepínicos apresentaram K_d próximos entre si, no entanto, ligeiramente maior para o diazepam, indicando que este fármaco possui maior interação com os sedimentos (LÖFFLER et al., 2005). Determinações realizadas de alguns compostos farmacêuticos, indicam que o comportamento destes contaminantes no ambiente aquático e, conseqüentemente seu K_d , tem relação direta com suas características, como hidrofobicidade e pKa, e com as características físico-químicas do ambiente (LÖFFLER et al., 2005; ZHOU; BROODBANK, 2014). Porém, estudos que relacionem a distribuição de fármacos entre a água e sedimentos, com as características destes compostos e do ambiente ainda são escassos. Sendo assim, o conhecimento a respeito de como características ambientais influenciam no destino de fármacos no ambiente ainda é limitado, principalmente quando se leva em conta a diversidade de compostos farmacêuticos existentes.

No que diz respeito à determinação de compostos farmacêuticos, os estudos realizados até o momento, em sua maioria, empregaram técnicas cromatográficas nas determinações. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC), além da cromatografia gasosa (CG), principalmente quando aliadas a um detector de massas (MS), possuem consideráveis vantagens na sua aplicação para compostos orgânicos. Alta seletividade, baixos limites de quantificação e confiabilidade na detecção dos analitos fazem destas técnicas as mais utilizadas no estudo destes CE. Entretanto, altos custos associados, como a instrumentação e suprimentos necessários, não permitem que a cromatografia esteja presente em todos os laboratórios, principalmente em países em desenvolvimento, onde os recursos para pesquisa são mais escassos. Desta forma, técnicas alternativas de análise vêm sendo propostas em uma tentativa de manter a pesquisa mesmo com baixos orçamentos.

Neste sentido, a voltametria empregando o eletrodo de gota de mercúrio no modo pendente (*Hanging Mercury Drop Electrode*, HMDE), já muito aplicada e consagrada na determinação de íons metálicos, vem sendo utilizada na determinação de compostos orgânicos. As técnicas de pré-concentração no eletrodo de trabalho (voltametria de redissolução) permitem quantificações na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ para compostos orgânicos e ng L^{-1} para alguns íons metálicos sem quaisquer outras formas de pré-concentração ou *cleanup* (procedimento para limpeza da amostra). Os baixos limites de quantificação alcançados pelo HMDE, tornam-no uma boa alternativa para estudos ambientais, que requerem técnicas capazes de determinações em níveis traço. Entretanto, embora a seletividade do HMDE para metais seja considerável, o mesmo não é verdade para compostos orgânicos. A aplicação de um potencial de acumulação, o qual confere uma certa seletividade ao eletrodo, possibilita que

majoritariamente a espécie de interesse seja pré-concentrada no eletrodo, porém outras espécies podem adsorver e apresentar resposta eletroquímica. Além disso, a confirmação da estrutura do analito, como ocorre nas técnicas espectrométricas, não é possível.

Embora um considerável custo seja necessário para a aquisição do equipamento, a técnica analítica de ionização e dessorção a laser assistida por matriz, do inglês *matrix-assisted laser desorption/ionization* (MALDI), seguida pela detecção em um analisador do tipo tempo de voo, do inglês *time of flight* (TOF) surge como alternativa às tradicionais técnicas cromatográficas. As análises por MALDI-TOF-MS dispensam a utilização de grandes volumes de solventes orgânicos e os espectros podem ser obtidos em poucos minutos, resultando em uma elevada frequência analítica e baixos custos de operação. Embora o tratamento de amostra seja a etapa crucial para a obtenção de espectros de qualidade, estes são geralmente procedimentos mais simples que os necessários para análises por CLAE, por exemplo. Além disso, MALDI é conhecida por propiciar uma ionização branda, preservando os analitos. Esta vantagem possibilita a identificação do íon molecular não fragmentado. Desta forma, MALDI-TOF-MS seria uma adequada opção para a confirmação das espécies previamente quantificadas empregando HMDE. Rapidez, simplicidade de preparo de amostra e baixo custo de análise são características da MALDI-TOF-MS.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Este trabalho teve por objetivo desenvolver metodologias analíticas voltamétricas e espectrométricas para avaliar a presença dos fármacos benzodiazepínicos (BDZs) alprazolam, diazepam e clonazepam em amostras naturais de água e sedimentos.

2.2 Objetivos Específicos

- Otimizar os parâmetros voltamétricos para a determinação do diazepam e do clonazepam por meio da avaliação da resposta de corrente do pico voltamétrico empregando voltametria de redissolução catódica por pulso diferencial (VRC PD);
- Validar os métodos voltamétricos avaliando figuras de mérito como linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, precisão, seletividade e sensibilidade;
- Encontrar as melhores condições de extração dos fármacos (alprazolam, diazepam e clonazepam) do sedimento empregando planejamento fatorial e testes univariados;
- Determinar a concentração de BDZ, em água (C_a) e em sedimento (C_s) em sistemas simulados e determinar o coeficiente de distribuição (K_d) por meio da equação ($K_d = C_s/C_a$);
- Caracterizar as amostras coletadas de água (pH, temperatura e oxigênio dissolvido) e sedimentos (pH, matéria orgânica, carbono orgânico total e granulometria).
- Relacionar os K_d determinados com as características físico-químicas da água, dos sedimentos e dos fármacos e compreender o comportamento e a distribuição para cada BDZ.
- Otimizar metodologia analítica por MALDI-TOF-MS através da avaliação de parâmetros experimentais, matrizes de ionização e preparo de amostra para análise qualitativa dos BDZs, como parte do doutorado realizado no exterior na modalidade doutorado sanduíche.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Contaminantes emergentes: Fármacos no ambiente

Com o aumento populacional, a demanda por bens de consumo, alimentos e outros consumíveis, tem aumentado exponencialmente, exigindo cada vez mais dos recursos naturais e acarretando conseqüentemente na geração de toneladas de resíduos orgânicos e inorgânicos. Por volta dos anos de 1990, compostos não polares, como os poluentes orgânicos persistentes (POPs), e íons metálicos eram foco nos estudos sobre contaminantes ambientais. Entretanto, estes contaminantes atualmente, em especial para países desenvolvidos, são menos relevantes, uma vez que a emissão destes compostos orgânicos e metais tóxicos teve uma diminuição expressiva, resultado de programas de diminuição de contaminação (PETROVIC; GONZALEZ; BARCELÓ, 2003). Por outro lado, o consumo e a emissão, dos chamados contaminantes emergentes (CE) aumentou, pois vários destes produtos são considerados essenciais atualmente. Produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PFHP), nanomateriais, plastificantes, microorganismos, drogas ilícitas, defensivos agrícolas, hormônios, surfactantes, retardantes de chama, bloqueadores solares, entre outros, estão compreendidos nesta classe de contaminantes. Muitos destes contaminantes são substâncias já conhecidas, porém sua presença ou importância no ambiente foi recentemente constatada. Além disso, no geral, tais espécies não são cobertas pela legislação, sendo permitida a liberação destes contaminantes no ambiente sem qualquer regulamentação. (DA SILVA; COLLINS, 2011; SANTANA, 2013). Uma característica destes contaminantes é que eles não precisam necessariamente ser persistentes no ambiente para causarem danos ao mesmo. Estas espécies são lançadas no ambiente diariamente em grandes quantidades e, desta forma, estão constantemente presentes e disponíveis aos organismos vivos. Entretanto, é sabido que alguns fármacos, por exemplo, apresentam natureza recalcitrante, com elevada estabilidade química, podendo permanecer por dias no ambiente aquático (KOSJEK et al., 2012; LÖFFLER et al., 2005). Desta forma, o aporte contínuo destes contaminantes, por vezes persistentes, intensifica os problemas ambientais.

O desenvolvimento dos fármacos trouxe maior qualidade de vida aos seres humanos. Atualmente, doenças podem ser prevenidas, controladas e tratadas através da utilização destes compostos orgânicos que desempenham funções bioquímicas em nossos organismos. Todos estes benefícios alcançados permitiram-nos aumentar a expectativa de vida em vários anos. Além dos seres humanos, outra grande destinação de fármacos refere-se aos animais domesticados (TORRES et al., 2012). Atualmente, no Brasil, o mercado de *pets* (animais de estimação) movimenta bilhões em artefatos e, é claro, em medicamentos. No cenário

internacional, a realidade não é diferente, e os números referentes ao Brasil podem ser projetados para outros países, visto que o nosso país ocupa a segunda posição no setor, ficando atrás apenas dos Estados Unidos (SEBRAE, 2017; ZUINI, 2015). Entretanto, a criação em larga escala de animais para abate e produção de alimentos representa maior parcela no consumo de fármacos destinados a animais. Antibióticos e anti-inflamatórios, são classes de fármacos frequentemente utilizados neste meio (ANVISA et al., 2005; MACHINSKI JUNIOR et al., 2005).

Embora a utilização de fármacos tenha nos proporcionado inquestionáveis melhorias, a presença destas substâncias em ambientes naturais representa riscos ao ecossistema e aos seres humanos. Diversas rotas de contaminação dos ambientes por estas drogas podem ser traçadas. No que se refere às drogas de uso animal, a excreção de fármacos e seus metabólitos através da urina e fezes representa o principal caminho de aporte de fármacos no ambiente. Para alguns fármacos, até 95% do princípio ativo pode ser excretado intacto sem qualquer metabolização (TORRES et al., 2012). Estes rejeitos depositados no solo, irão ser inevitavelmente lixiviados pela ação das chuvas e carreados até os corpos aquáticos superficiais ou então poderão percolar o solo até atingir águas subterrâneas. Em relação aos humanos, a forma intacta das drogas, bem como seus metabólitos podem ser excretados no solo e água, redes de coleta de esgoto sem tratamento ou rede de coleta e tratamento de esgoto. Assim como ocorre nos animais, os fármacos administrados em seres humanos são total ou parcialmente metabolizados e, desta forma, o princípio ativo com seus metabólitos são excretados através da urina e fezes. Além disso, em muitos casos os metabólitos excretados são substâncias farmacêuticas ativas que ainda desempenham funções em organismos vivos. Um exemplo é o oxazepam (OXAZ), principal metabólito do diazepam (DIAZ) em humanos, que apresenta propriedades farmacológicas semelhantes às do DIAZ (Loffler et al., 2005).

Quando os rejeitos domésticos são coletados e destinados a uma estação de tratamento de esgoto (ETE), espera-se que o efluente tratado esteja livre de contaminantes. Entretanto, é conhecido que a maioria das ETE é ineficiente na remoção de CE. Pesquisas demonstram que mesmo após o tratamento do esgoto coletado, fármacos são detectados no efluente e no lodo (biossólido) decantado nos tanques biodigestores das ETE (MARTÍN et al., 2012; MATONGO et al., 2015; VERLICCHI; AUKIDY; ZAMBELLO, 2012). O efluente tratado geralmente é despejado em algum rio ou lagoa, já o lodo (biossólido), por sua vez, pode ser descartado ou utilizado na agricultura como fertilizante natural devido à sua elevada carga orgânica, levando para o ambiente e para os alimentos os contaminantes nele presentes (LEMAINSKI; DA SILVA, 2006; MARTÍN et al., 2012). Martín e colaboradores (2012) avaliaram a presença e distribuição de dezesseis compostos farmacêuticos ativos em uma ETE.

Fármacos anti-inflamatórios, antibióticos, antiepiléticos, β -bloqueadores, estimulantes, estrogênios e reguladores de lipídios foram quantificados empregando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) equipada com detector de arranjo de diodos ultravioleta (UV) e fluorescência (FI). Concentrações na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ dos fármacos foram detectados no afluente (entrada do esgoto) e no efluente (após o tratamento) da ETE. Os anti-inflamatórios estudados foram detectados em concentrações mais elevadas que as demais drogas. Com exceção do diclofenaco, todas os compostos encontrados no efluente foram também determinados no biossólido, mostrando a persistência destes compostos em ambos os meios, aquoso e sólido. Em uma avaliação da remoção destes compostos analisados pela ETE, os autores concluíram que os principais mecanismos de remoção das drogas são a biodegradação e a própria sorção no lodo. Os anti-inflamatórios, ácido salicílico e ibuprofeno, foram os fármacos que sofreram melhores remoções pela ETE. Porém, estas drogas possuem características hidrofílicas e desta forma, era esperado que permanecessem na fase aquosa e não se ligassem ao lodo. Assim, a boa remoção pela ETE foi atribuída à biodegradação (MARTÍN et al., 2012). Além do esgoto doméstico, outra provável fonte de contaminação por fármacos são os rejeitos provenientes de indústrias farmacêuticas.

Quando fármacos atingem o ambiente aquático, estes compostos orgânicos passam a ser contaminantes com efeitos ainda não completamente elucidados para os organismos vivos. Fármacos como antibióticos provavelmente deram o início a preocupação em torno destes contaminantes ambientais em diversos compartimentos. Tal preocupação justifica-se porque foi descoberto que a constante presença de baixas concentrações destas drogas no ambiente e em redes de tratamento de esgoto, promove seleções genéticas, resultando no surgimento de bactérias resistentes à droga (DÍAZ-CRUZ; LÓPEZ DE ALDA; BARCELÓ, 2003; KÜMMERER, 2009a, 2009b). Abreu e colaboradores (2010) realizaram um estudo para avaliar a resistência a antibióticos de bactérias isoladas de efluentes hospitalares. Primeiramente, um levantamento realizado entre os anos de 2004 a 2007 mostrou que os fármacos mais consumidos no Hospital Universitário Regional de Maringá (HUM) eram antimicrobianos, seguidos por psicofármacos. Os dados também mostraram que o consumo destas drogas vem aumentando com os anos, lançando mais preocupações aos pesquisadores. Em seguida, amostras da rede de esgoto foram coletadas em dois pontos, um no HUM e o outro no Hemocentro da cidade de Maringá. Das amostras coletadas, foram isoladas e identificadas 39 espécies de bactérias Gram-negativas. Doze diferentes antimicrobianos foram utilizados para avaliar a susceptibilidade das bactérias isoladas. Os resultados obtidos apontaram que das 39 espécies de bactérias isoladas, 12 apresentaram resistência moderada ao menos a uma das drogas, 9 foram resistentes ao menos a um antibiótico e 3 foram resistentes

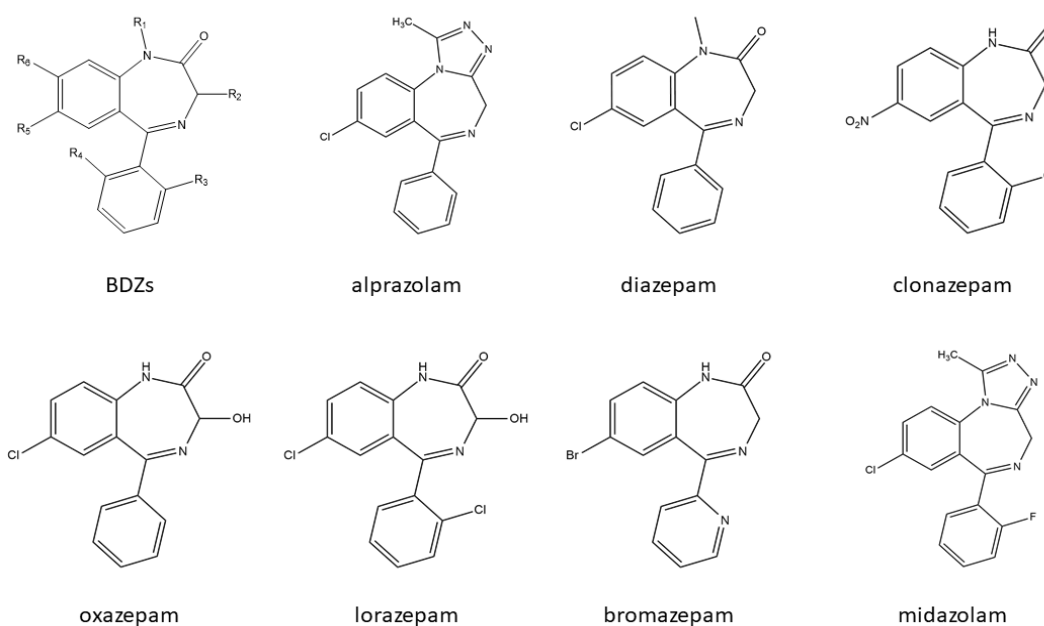
a mais de dez dos antibióticos testados. Os autores concluíram que o HUM é responsável por lançar bactérias multirresistentes a diferentes antimicrobianos com potencial patogênico na rede pública de tratamento de esgoto. Os autores propuseram ainda a implantação de um sistema eficiente de tratamento destes efluentes (ABREU et al., 2010). Além de antibióticos, outras classes de fármacos como anti-inflamatórios, reguladores de lipídeos, estrogênios, antiepiléticos, etc. vêm sendo detectados em estações de tratamento de esgoto e em ambientes naturais (DA SILVA et al., 2011; MARTÍN et al., 2012).

Da Silva e colaboradores (2011) conduziram um estudo de monitoramento de 43 drogas de diferentes classes farmacêuticas na bacia do Rio Ebro, Espanha. Fármacos analgésicos, anti-inflamatórios, drogas anti-úlceras, psicotrópicos, antiepiléticos, antibióticos, β -bloqueadores, diuréticos, reguladores de lipídeos, diminuidores de colesterol e anti-histamínicos foram estudados. Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massa com analisador híbrido quadrupolo linear de armadilha de íons foi utilizado nas determinações. Amostras de água, sedimentos e sólidos suspensos foram coletados em 23 sítios de amostragem cobrindo toda a área da bacia do Rio Ebro. Os pontos de coleta foram a jusante de 6 principais ETE da região. Os fármacos estudados foram encontrados em todas as amostras analisadas e os analgésicos/anti-inflamatórios foram encontrados com alta frequência e em altas concentrações em todas as amostras. Os autores concluíram que as ETE são as principais fontes de contaminação de rios por fármacos e que, as diferenças de concentrações destes CE no ambiente aquático, são resultados principalmente de fatores de diluição. No mesmo trabalho, da Silva e colaboradores, notaram que os fármacos ficaram majoritariamente na coluna d'água. Entretanto, alguns compostos apresentaram a tendência de se ligarem ao material sólido em suspensão, e assim, não foram detectados na água após filtração. Geralmente os compostos com características mais básicas ($pK_a > 7$) apresentaram maior afinidade com os sólidos suspensos. Sendo assim, a análise da água (com filtração) pode subestimar a contaminação por algumas substâncias. Dentre os fármacos determinados por da Silva e colaboradores, dois psicofármacos da classe dos benzodiazepínicos foram detectados nas amostras analisadas. O lorazepam (LORAZ) foi detectado em concentrações de 3,03 a 3,35 ng g⁻¹ em sedimentos e 11,6 a 46,1 ng L⁻¹ em águas, já o DIAZ foi determinado em uma concentração de 2,68 ng L⁻¹ em água (DA SILVA et al., 2011).

Fármacos benzodiazepínicos (BDZs) são drogas psicoativas amplamente utilizadas em todo o mundo para o controle de doenças do sistema nervoso central. Os principais efeitos produzidos por BDZs no organismo são: sedativos, ansiolíticos, hipnóticos, anticonvulsivantes e relaxantes musculares (JEONG et al., 2015; KALOGRIA; PISTOS;

PANDERI, 2013; WESTLAND; DORMAN, 2013). BDZs interagem com o receptor γ -aminobutírico (GABA), aumentando a condução de íons e proporcionando seus efeitos no organismo (BRODIN et al., 2014; GEBAUER et al., 2011; NOZAWA et al., 2015; WESTLAND; DORMAN, 2013). Estas drogas têm sido usadas desde 1960 em substituição aos barbitúricos por serem mais seguras (BERNIK; SOARES; SOARES, 1990). Estes fármacos lideram a lista dos 5 medicamentos controlados mais vendidos em território nacional e o Clonazepam (CLO), comercializado como Rivotril, ocupou em 2003 a 9º posição entre os fármacos mais vendidos no Brasil (ANVISA, 2013). Os fármacos BDZs apresentam como estrutura básica inicial a 1,4-diazepina fundida a um anel aromático, denominada 1,4-benzodiazepina (WESTLAND; DORMAN, 2013). Os fármacos desta classe diferem-se entre si nos grupos funcionais ligados à estrutura principal. A Figura 1 apresenta a estrutura base dos benzodiazepínicos e alguns fármacos da classe. É possível notar a extrema semelhança estrutural destas moléculas, entretanto, as pequenas diferenças moleculares existentes conferem à cada droga, especificidades em suas aplicações. O midazolam por exemplo, apresenta propriedades sedativo-hipnóticas, sendo empregado para preparo de pequenas cirurgias, como cirurgias odontológicas, e procedimentos de alguns exames laboratoriais. Por outro lado, o alprazolam (ALP) encontra grande aplicabilidade no tratamento da ansiedade e o CLO é frequentemente utilizado devido as suas também conhecidas propriedades anticonvulsivantes. Algumas características físico-químicas e farmacocinéticas dos BDZs apresentados na Figura 1 estão listadas na

Tabela 1.



Ligantes “R” apresentados na estrutura básica dos BDZs referem-se à Cl, Br, F, NO₂, CH₃, entre outros.

Figura 1. Fórmula estrutural básica dos BDZs e alguns BDZs comumente utilizados.

Tabela 1. Características físico-químicas e farmacocinéticas de BDZs.

	Fórmula química	Massa (g/mol)	pKa	pKa em base forte	pKa em ácido forte	Solubilidade em água (mg L ⁻¹)	Bio-disponibilidade (%)	Metabólitos ativos
Alprazolam	C ₁₇ H ₁₃ ClN ₄	308,76	2,4	5,08	18,3	40 em pH 7,0	80 – 90	α-hidroxi-alprazolam
Diazepam	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O	284,743	3,4	2,92	--	50 a 25° C	93	nordiazepam, temazepam e OXAZ
Clonazepam	C ₁₅ H ₁₀ ClN ₃ O ₃	315,713	1,5	1,86	11,89	100 a 25° C	90	7-amino-clonazepam
Oxazepam	C ₁₅ H ₁₁ ClN ₂ O ₂	286,715	1,5	-1,5	10,61	178		Ausentes
Lorazepam	C ₁₅ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O ₂	321,157	1,3	2,68	12,24	80	90	Ausentes
Bromazepam	C ₁₄ H ₁₀ BrN ₃ O	316,158	2,5	2,68	12,24	0,4	84	3-hidroxi-bromazepam
Midazolam	C ₁₈ H ₁₃ ClFN ₃	325,771	3,48	6,57	--	9,87	90	α-hidroxi-midazolam

(DRUGBANK, 2017; DRUGINFOSYS, 2017; PHARLAB, 2017; PUBCHEM, 2017)

Como pode ser visto na

Tabela 1, os fármacos apresentam semelhantes valores de massa molecular e biodisponibilidade. Entretanto, a solubilidade em água é bastante variável entre estes compostos. Estas variações na solubilidade implicam diretamente na permanência dos BDZs na coluna d'água, bem como na sua remoção pelas ETE. Outra característica importante de um fármaco, é o seu pKa. O pKa de um fármaco pode ser entendido como o pH onde 50% das moléculas encontram-se ionizadas, em equilíbrio com a forma não ionizada. No organismo vivo, após ser administrado, o pKa influencia na absorção e ação dos fármacos, uma vez que fármacos ácidos permanecem neutros em condições de meio ácido e fármacos básicos permanece neutros em condições menos ácidas, sendo este estado de maior absorção e penetração nas membranas celulares. No ambiente aquático, um pensamento análogo pode ser desenvolvido. O pKa de um determinado fármaco influenciará na sua presença na forma neutra ou ionizada em um rio, por exemplo. Desta forma, as interações com os sedimentos, material particulado em suspensão, matéria orgânica dissolvida, água, etc. poderão ser mais fortes ou fracas, influenciando no comportamento e destino do fármaco no ambiente. Para os BDZs listados na

Tabela 1, baixos valores de pKa podem ser observados, indicando que estes compostos apresentam características de bases fracas (GHOBADI; YAMINI; EBRAHIMPOUR, 2014; KALOGRIA; PISTOS; PANDERI, 2013). No que se refere aos metabólitos dos BDZs excretados por seres humanos, para a maioria das drogas listadas na tabela, estes são

compostos farmacologicamente ativos metabolizados no fígado e excretados principalmente pela urina sob a forma livre ou conjugada (glucuronídeo e sulfato). Ocorre também, em menor quantidade, a excreção dos fármacos não metabolizados, bem como, a excreção dos BDZs e seus metabólitos pelas fezes e leite materno (DRUGBANK, 2017; DRUGINFOSYS, 2017; PHARLAB, 2017; PUBCHEM, 2017).

A presença de BDZs em águas superficiais e efluentes de ETE foi assunto de inúmeros trabalhos por todo o mundo (MENDOZA et al., 2014; RACAMONDE et al., 2014, 2015), até mesmo no Brasil (NUNES et al., 2015). Kosjek et al. (2012) avaliaram a ocorrência de DIAZ, OXAZ e bromazepam (BROMAZ) em águas superficiais, efluentes hospitalares e entrada e saída de ETE da região da Eslovênia empregando cromatografia gasosa com detector de massa (CG-MS). O objetivo deste estudo foi avaliar a presença e determinar a eficiência de remoção dos BDZs, além de identificar os produtos formados durante o tratamento da água residual. A presença destes fármacos foi verificada em várias amostras analisadas. Todas as amostras de efluente hospitalares avaliados continham os BDZs estudados, DIAZ (111 ng L^{-1}), BROMAZ (158 ng L^{-1}) e OXAZ (72 ng L^{-1}). Os resultados indicaram que apenas o tratamento combinado, biológico e fotoquímico acoplado, seguido por adsorção em carvão ativado, foi capaz de remover os BDZs com uma eficiência de 99,99%. As outras formas de tratamento não apresentaram adequada eficiência de remoção.

Assim como ocorre para os outros fármacos, quando BDZ aportam no ambiente aquático, na sua forma intacta ou como metabólitos, estes podem causar problemas à saúde de organismos aquáticos e aos seres humanos (BRODIN et al., 2013). A contaminação aos seres humanos ocorre devido à coleta e distribuição, na rede de abastecimento público, de águas superficiais contaminadas com os fármacos. Os processos de tratamento de esgoto e para água potável são ineficientes para a remoção destes fármacos e outros CE (GAFFNEY et al., 2015; SODRÉ; LOCATELLI; JARDIM, 2010). Mendoza e colaboradores avaliaram a presença de drogas de abuso e BDZs na água da rede de distribuição e nos rios Jarama e Manzanares na cidade de Madri, Espanha. Cocaína e efedrina foram encontradas na água de torneira analisada. Alprazolam (ALP), DIAZ e lorazepam (LORAZ) foram encontrados em todas as amostras de água de rios analisados. As concentrações de cada fármaco nas amostras de água superficial variaram de 2,9 a 9,1 ng L^{-1} para ALP, 3,3 a 55,7 ng L^{-1} para DIAZ e 34,1 a 167,0 ng L^{-1} para LORAZ. Embora os BDZs não tenham sido encontrados nas amostras coletadas nas torneiras, são ainda possíveis contaminantes ao ambiente e aos seres humanos (MENDOZA et al., 2014).

Os efeitos nocivos causados ao ecossistema devido à presença de BDZs ainda não são completamente conhecidos. Alguns estudos indicam que no ambiente, mesmo em baixas

concentrações, estas drogas podem apresentar atividade no sistema nervoso central de organismos aquáticos (BRODIN et al., 2013; GEBAUER et al., 2011). Brodin et al., (2013) realizaram experimentos com peixes da espécie *Perca Fluviatilis*, expondo-os à dois níveis de concentração do benzodiazepínico OXAZ ($1,8 \mu\text{g L}^{-1}$ e $910 \mu\text{g L}^{-1}$) durante um período de 7 dias. Após este tempo decorrido, mesmo os peixes expostos às baixas concentrações tiveram acumulação do fármaco em seus tecidos musculares. Além disso, mudanças comportamentais foram observadas nos peixes tais como, o aumento da atividade; diminuição da sociabilidade e maior velocidade de alimentação. Brodin e colaboradores (2014) em outro trabalho, avaliaram alterações comportamentais e processos de bioacumulação e biomagnificação em duas espécies expostas à baixas concentrações do fármaco psicoativo OXAZ. O peixe predador *Perca Fluviatilis* e larvas de sua presa invertebrada *Coenagrion hastulatum*, conhecida como donzelinha, foram objetos de estudo. Os estudos de bioacumulação e biomagnificação nos peixes foram conduzidos em quatro diferentes experimentos: os fármacos foram administrados através da (i) água; (ii) alimentação (larvas de donzelinha); combinação entre alimentação e água e (iv) controle. No que se refere às alterações comportamentais, os peixes apresentaram mudanças na sua atividade (movimentação), enquanto as donzelinhas não foram afetadas com o fármaco. Este resultado deixa claro que diferentes espécies expostas ao mesmo fármaco podem apresentar diferentes respostas comportamentais. Brodin et al. (2014) ainda concluíram que o consumo de presas contaminadas pode ser uma importante rota de exposição dos predadores através dos processos de bioacumulação e biomagnificação. Desta forma, a exposição de algumas espécies pode ser ainda maior. Todas estas alterações comportamentais observadas são preocupantes, pois podem levar a um descontrole ambiental, seja tanto pela diminuição de uma população que passa a ser predada mais facilmente, seja pela explosão populacional resultante de alterações nos hábitos alimentares. Além disso, pesquisas recentes mostraram que baixas concentrações de BDZs podem apresentar efeitos que vão além de alterações comportamentais causadas por interações com o sistema nervoso central.

Recentemente, Overturf et al., (2016) simularam a exposição de peixes da espécie *Ictalurus punctatus* ao DIAZ em concentração de $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ por 7 dias. O objetivo do estudo foi avaliar o potencial de bioacumulação do diazepam nos tecidos dos peixes, bem como avaliar a interação deste BDZ com o sistema endócrino. Overturf e colaboradores não observaram a bioacumulação do BDZ e também não relataram quaisquer mudanças comportamentais, entretanto notou-se modificações em um gene gonadal (P450scc) e na enzima 3β -HSD. A modulação do 3β -HSD e do P450scc pode apresentar efeito importante na produção de hormônios esteroides. Os resultados observados indicam que embora não tenha

ocorrido bioacumulação, a exposição crônica ao diazepam pode causar interferências ao sistema endócrino dos peixes (OVERTURF; OVERTURF; HUGGETT, 2016). Além destes trabalhos citados, alguns outros pesquisadores já demonstraram também alterações comportamentais em peixes, desencadeadas pela exposição à BDZs como diazepam, clonazepam e bromazepam, (BRANDÃO et al., 2013; GEBAUER et al., 2011; OGGIER et al., 2010; RICHENDRFER et al., 2012). Embora a legislação Brasileira não abranja e regulamente a presença destes fármacos, bem como sua concentração no ambiente, estes trabalhos supracitados demonstram a importância do estudo e regulamentação em torno destes CE, uma vez que seus efeitos em organismos aquáticos estão confirmados.

Estudos que avaliam a presença de fármacos em amostras de águas superficiais ou em efluentes de estações de tratamento de esgoto foram importantes para o desenvolvimento de métodos sensíveis de análise e para o monitoramento ambiental (BAKER; KASPRZYK-HORDERN, 2013; VAN DER VEN et al., 2004). Além disso, a presença confirmada destas substâncias em ambientes aquáticos é a primeira etapa para a criação de legislações mais rigorosas de controle de rejeitos e formas mais adequadas de tratamento (KOSJEK et al., 2012). Entretanto, a avaliação do comportamento de fármacos no ambiente aquático não é usual, tendo sido realizado apenas por alguns pesquisadores (da Silva et al. 2011; Moreno-González et al. 2015; Zhou and Broodbank 2014). Matongo et al. (2015) analisaram amostras de uma estação de tratamento de esgoto e de águas superficiais e sedimentos do rio Msunduzi, na África do Sul empregando cromatografia líquida de alta eficiência com detector de massa (CLAE-MS). Resíduos farmacêuticos de cafeína (estimulante), acetaminofem (antipirético), carbamazepina (antiepilético), clozapina (antipsicótico), eritromicina (antibiótico), metronidazol (antibiótico), ibuprofeno (antipirético), sulfametoxazol (antibiótico), sulfametazina (antibiótico) e trimetropin (antibiótico) foram determinados. Além das drogas terem sido detectadas na ETE, foram também quantificadas em águas superficiais em concentrações e frequência relevantes. O ibuprofeno, por exemplo, foi determinado em concentrações de $117 \mu\text{g L}^{-1}$, $84,6 \mu\text{g L}^{-1}$ e 659ng g^{-1} em águas residuais, águas superficiais e sedimentos respectivamente. Os antibióticos, no entanto, foram geralmente detectados em concentrações inferiores à $10 \mu\text{g L}^{-1}$ em águas superficiais e até $34,5 \mu\text{g L}^{-1}$ em águas residuais. Além disso, os autores constataram que as eficiências de remoção obtidas pela ETE foram de 6,55 a 98,00% para antipiréticos, 73,33 a 98,90% para antibióticos, 48,80% para o antiepilético e 86,4% para a cafeína. No que diz respeito as amostras coletadas no rio Msunduzi, a maioria fármacos, foi detectada tanto na água quanto nos sedimentos. Entretanto, o sulfametoxazol e o trimetropin foram encontrados apenas em amostras de água, enquanto o metronidazol foi detectado em uma amostra de sedimento. Embora água e sedimentos tenham

sido estudados, Matongo e colaboradores não realizaram uma discussão a respeito da distribuição dos fármacos analisados entre água e sedimentos

Sabe-se que as características físico-químicas das drogas, como polaridade, hidrofobicidade, pKa, bem como as características do ambiente são fatores balizadores do comportamento e destinos dos fármacos no ambiente (LÖFFLER et al., 2005; ZHOU; BROODBANK, 2014). Zhou and Broodbank (2014) avaliaram a presença e distribuição de 9 fármacos no sistema sedimento/água do rio Medway, no Reino Unido, durante o período de um ano. Além disso, foi avaliada a eficiência de remoção destes fármacos por uma estação de tratamento de esgoto (ETE). A eficiência de remoção teve uma variabilidade de 4 a 76% entre os fármacos estudados e os autores apontaram que variações sazonais podem interferir na concentração das drogas nos rios. Desta forma, Zhou and Broodbank (2014) afirmaram que o efluente da ETE é uma importante fonte de contaminação para o ambiente. Além disso, os fármacos estudados por CLAE MS/MS apresentaram grande variabilidade no coeficiente de partição sedimento/água (K_d), o qual relaciona a distribuição do analito entre estes dois componentes do sistema aquático, indicando um processo dinâmico das interações sedimento/água. Também foi observado neste estudo que, no geral, ocorreu uma diminuição do coeficiente de partição com o aumento da concentração de sólidos suspensos. Este comportamento deve-se provavelmente à interação dos analitos com os sólidos suspensos, mantendo os fármacos na coluna d'água.

Quando fármacos atingem o ambiente aquático, muitos fatores podem afetar seu destino e comportamento. Sabe-se que muitos fármacos sofrem processos de degradação quando expostos a radiação solar, porém quando no ambiente, podem encontrar-se adsorvidos a compostos orgânicos e desta forma tornarem-se mais protegidos da radiação solar, evitando assim a fotólise direta (BILA; DEZOTTI, 2003). Além disso, quando os fármacos se encontram associados ao material particulado, pode ocorrer sua decantação e sedimentação e conseqüentemente, menor exposição à radiação solar e maior estabilidade química, podendo persistir por décadas no sedimento (SUNDELIN, 2013). Moreno-González e colaboradores (2015) avaliaram a distribuição sazonal de compostos farmacêuticos em água e sedimentos marinhos da lagoa Mar Menor na Espanha. Métodos analíticos foram adaptados e validados para 55 drogas em água marinha e 50 em sedimentos. Destas drogas, 42 foram detectadas na água e 30 em sedimentos. Um total de 20 compostos em água e 14 nos sedimentos foram encontrados em concentrações acima do limite de quantificação, variando de ng L^{-1} a 168 ng L^{-1} em água marinha e ng g^{-1} a $50,3 \text{ ng g}^{-1}$ em sedimentos. Os autores observaram ainda, que as concentrações mais altas das drogas em água marinha foram detectadas durante o verão, próximo ao principal núcleo turístico, devido provavelmente à excreções dos banhistas e

outras formas de aporte não controladas (MORENO-GONZÁLEZ et al., 2015). Loffler et al. (2005) estudaram o destino e a persistência de seis substâncias farmacêuticas e de quatro metabólitos em um sistema sedimento/água. Cromatografia líquida de alta eficiência foi usada nesse estudo. Sistemas modelo foram enriquecidos com 100 ng g⁻¹ de cada droga. A concentração dos fármacos no sedimento e na água foi determinada imediatamente e após 0,25, 1, 2, 7, 14, 28, 56 e 100 dias da adição. Os autores observaram que algumas drogas não apresentaram persistência, diminuindo sua concentração total no sistema ao longo dos dias. Entretanto, outras drogas foram moderadamente ou altamente persistentes. Para estas drogas, foi observado que o equilíbrio da distribuição foi atingido com cerca de 30 dias. Dentre as substâncias estudadas, estavam o DIAZ e o OXAZ, que apresentaram alta e moderada persistência respectivamente, ou seja, se degradam muito lentamente. Os autores também concluíram que estas substâncias podem se associar ao sedimento e possuem um padrão de distribuição entre a água e o sedimento próximos entre si. No entanto, o DIAZ apresentou alta tendência de se ligar aos sedimentos, enquanto para o OXAZ esse comportamento foi ligeiramente menor. Os K_d determinados para o DIAZ e OXAZ foram 3,0 e 2,2 L kg⁻¹ respectivamente. Outras referências citadas por Loffler e colaboradores apontam para K_d estabelecidos de 4,6, 4,7 e 6,2 L kg⁻¹ para o DIAZ e 1,0, 1,1 e 2,2 L kg⁻¹ para OXAZ.

Como pôde ser visto, estudos que realizaram uma avaliação mais detalhada da distribuição de fármacos, em especial benzodiazepínicos, são poucos. A análise da coluna de água e dos sedimentos pode ser uma importante fonte de dados para uma melhor compreensão do comportamento destas substâncias no ambiente aquático. Além disso, a análise dos sedimentos, pode fornecer dados a respeito da contaminação a longo prazo do ambiente, ao passo que a análise da coluna de água esclarece sobre a contaminação apenas no momento da coleta (VRANA et al., 2014).

Os sedimentos constituem parte essencial dos ecossistemas aquáticos por regular o metabolismo de todo o sistema (EMÍDIO; DÓREA, 2010). A contaminação deste material por benzodiazepínicos tem seus efeitos desconhecidos, no entanto, a permanência destes contaminantes pode afetar diretamente o ecossistema aquático, em especial micro-organismos e animais de leito do rio. Já a permanência dos BDZs na coluna d'água, implica em uma maior disponibilidade destes contaminantes para a maioria dos peixes e também para os seres humanos e outros animais (BRODIN et al., 2013; GEBAUER et al., 2011; OVERTURF; OVERTURF; HUGGETT, 2016).

3.2 Técnicas utilizadas para a determinação de fármacos em amostras ambientais

A determinação de fármacos em geral nas mais distintas matrizes, vem sendo realizada majoritariamente por meio de técnicas cromatográficas. (ÁLVAREZ-RUIZ et al., 2015; JEONG et al., 2015; RACAMONDE et al., 2014; VAN DER VEN et al., 2004). Com finalidades forenses, Jeong e colaboradores (2015) desenvolveram um método para a determinação de benzodiazepínicos, zolpidem e seus metabólitos em urina. Cromatografia líquida aliada ao espectrômetro de massa, do inglês *Liquid chromatography–mass spectrometry* (LC–MS/MS) foi escolhida como técnica de análise para a identificação e quantificação dos compostos. Um padrão interno rotulado de deutério (deuterium labeled internal standards (IS)) foi utilizado nas quantificações. Os limites de quantificação obtidos para o método foram inferiores a $10 \mu\text{g L}^{-1}$ e a aplicabilidade do método foi confirmada em amostras de sangue de usuários destes fármacos. Injeções diretas de urina no cromatógrafo foram possíveis e alta sensibilidade e separações desejadas entre os compostos foram alcançadas (JEONG et al., 2015).

Especialmente quando se trata de estudos de cinho ambiental, as várias vantagens das técnicas cromatográficas como seletividade, baixos limites de quantificação, determinações simultâneas e confiabilidade na identificação dos analitos, principalmente quando associada à detectores de massa, fazem destas técnicas, interessantes ferramentas analíticas. Álvarez-Ruiz e colaboradores empregaram a LC–MS/MS para a determinação de drogas ilícitas tradicionais e emergentes em sedimentos, lodo e material particulado. Recuperações adequadas ($> 50\%$) para a maioria dos compostos, limites de quantificação abaixo de $3,96 \text{ ng g}^{-1}$ para todos os compostos e reprodutibilidade ($< 20\%$) foram obtidos para o método desenvolvido. Amostras reais de material particulado e lodo coletados em estações de tratamento de esgoto de Valência, Espanha, e sedimentos coletados ao longo do rio Turia, apresentaram concentrações quantificáveis de drogas como cocaínicos e opióides (ÁLVAREZ-RUIZ et al., 2015).

Sodré e colaboradores investigaram a presença de onze CE em águas de torneira no Brasil. Neste estudo, foi empregada a cromatografia gasosa com detector de massas e extração por SPE (SPE-GC-MS) foi empregada neste estudo. Seis compostos, inclusive interferentes endócrinos foram detectados nas amostras analisadas. Concentrações médias de até $0,34 \pm 0,13 \mu\text{g L}^{-1}$ para estigmasterol, $0,27 \pm 0,07 \mu\text{g L}^{-1}$ para colesterol, $0,22 \pm 0,06 \mu\text{g L}^{-1}$ para cafeína, e $0,16 \pm 0,03 \mu\text{g L}^{-1}$ para bisfenol A foram determinadas. Segundo os autores, as concentrações determinadas foram mais altas que o valor médio encontrado para este CE em água de torneira em outros lugares do mundo. Estes resultados podem refletir o fato de que os

reservatórios de água potável na cidade de Campinas, local da amostragem, sofrem com o aporte de grandes quantidades de esgoto bruto, sendo esta a provável fonte de contaminação (SODRÉ; LOCATELLI; JARDIM, 2010).

Tanoue et al., (2014) desenvolveram um método empregando cromatografia líquida de ultra alta eficiência (*ultra-high-performance liquid chromatograph*) acoplado a um *AB SCIEX QTRAP® 5500 mass spectrometer* (UHPLC-MS/MS) para a determinação de 17 produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais em órgãos e tecidos biológicos. O método proposto foi aplicado na determinação dos analitos em amostra de fígado e rim de aves, bem como no plasma, fígado e cérebro de peixes coletados em um córrego no Japão. Treze e 10 dos 17 compostos foram detectados no plasma e fígado de peixes respectivamente. Além disso, 5 dos compostos foram detectados no cérebro destes animais. Anti-inflamatórios não esteroides, agentes bactericidas e psicotrópicos foram frequentemente detectados nos tecidos dos peixes. Estes e outros trabalhos usaram a cromatografia para a determinação de compostos orgânicos como drogas lícitas e ilícitas em matrizes ambientais e biológicas (DA SILVA et al., 2011; JURADO et al., 2012).

As consideráveis qualidades das técnicas cromatográficas são indiscutíveis. No entanto, é sabido que custos instrumentais e operacionais são geralmente elevados. Como notado no decorrer deste referencial teórico, a cromatografia líquida é dentre todas as técnicas cromatográficas a mais frequentemente empregada em determinações de drogas. Embora a cromatografia a gás também possa ser utilizada em vários casos (GHOBADI; YAMINI; EBRAHIMPOUR, 2014). Mesmo que a cromatografia líquida seja uma técnica excelente de separação que possibilita a posterior determinação dos analitos, tradicionalmente, grandes volumes de solventes orgânicos muitas vezes tóxicos são requeridos. Estes solventes são utilizados tanto durante a corrida cromatográfica (etapa de separação e eluição dos analitos) quanto nos processos de pré-tratamento de amostra, na maioria das vezes indispensáveis. Além dos aspectos financeiros envolvidos no uso de solventes orgânicos caros de elevada pureza, questões ambientais e de segurança também devem ser considerados, uma vez que centenas de mililitros de resíduos voláteis tóxicos podem ser gerados durante um dia de análise.

Um dos solventes orgânicos mais empregados na cromatografia líquida é a acetoneitrila. Este solvente vem sendo utilizado em misturas com água em diferentes proporções como fase móvel, principalmente com a finalidade de separação e purificação de analitos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou então HPLC (*high performance liquid chromatography*). Entretanto, no final de 2008, a diminuição da oferta deste solvente no mercado impulsionou uma alta jamais vista nos preços da acetoneitrila. Este cenário incentivou

a diminuição do uso deste solvente através de sua substituição por outros e, inevitavelmente, a procura por diminuir os volumes de solvente orgânicos que já vinha acontecendo, se intensificou (LANÇAS, 2009a). Neste sentido, a cromatografia clássica vem se modificando, na tentativa de se enquadrar aos parâmetros de química verde e reduzir custos. Colunas cada vez menores, que conseqüentemente necessitam menores volumes de solventes estão surgindo lentamente (LANÇAS, 2009b). Entretanto as colunas convencionais de HPLC (diâmetro interno entre 3,2 e 4,6 mm) eram ainda em 2009, as mais utilizadas em cromatografia líquida. Estas colunas operam com fluxo médio de 1 mL min⁻¹ resultando em um volume médio de 0,5 L de fase móvel em um dia de análise. Atualmente, possuímos colunas cromatográficas com diâmetro interno de 0,01 a 0,15 mm com consumo de fase móvel variando de 10 a 1000 nL min⁻¹. Porém na prática, a migração total da cromatografia líquida para colunas capilares ainda não é possível. A maioria dos cromatógrafos líquidos presentes nos laboratórios operam com colunas convencionais. Várias modificações e adaptações vêm sendo implantadas pelas fabricantes, entretanto o desenvolvimento de equipamentos específicos para trabalhar com estes reduzidos volumes e altas pressões vem sendo feito por poucas empresas. Além disso, a variedade de tipos de colunas (diferentes fases estacionárias) ainda é bem limitada quando comparado às colunas convencionais (LANÇAS, 2009b). Sendo assim, as várias vantagens da miniaturização das colunas, como o menor consumo de solvente, melhor resolução e separação de pico, melhor sensibilidade, etc., ainda não estão disponíveis em todos os laboratórios. Além das questões instrumentais, as diminuições da espessura das colunas, implica na necessidade de utilização de solventes e reagentes ainda mais puros e, os cuidados com os processos de preparo de amostra e filtrações da fase móvel devem ser redobrados. Todos esses cuidados que devem ser tomados, suprimentos como membranas e outros e modificações ou aquisição de novos equipamentos elevam ainda mais os custos das análises cromatográficas.

Neste sentido, técnicas alternativas de análise menos custosas vêm sendo utilizadas por diversos grupos de pesquisa. As técnicas eletroquímicas são uma alternativa interessante para a determinação de muitos compostos orgânicos. Elevada frequência analítica, simplicidade, baixo custo, capacidade de detecção em níveis de concentração baixa, resposta dependente das formas químicas de um mesmo elemento, análise de misturas, são algumas das suas características. Diversos tipos de eletrodos como os de carbono vítreo e suas modificações, diamante dopado com boro, impressos, prata, amalgama sólida de prata, mercúrio, entre outros, foram desenvolvidos e utilizados na determinação de compostos orgânicos (BRAHIM et al., 2016; COTTICA et al., 2009; COUTO; LIMA; QUINAZ, 2016; DE SOUZA; MASCARO; FATIBELLO-FILHO, 2011; JAIN; YADAV, 2012). Dentre esses

eletrodos, o eletrodo de gota pendente de mercúrio, do inglês *Hanging Mercury Drop Electrode* (HMDE), apresenta consideráveis adjetivos que o destacam em relação aos demais eletrodos. Elevado sobrepotencial à redução do hidrogênio, ampla faixa negativa de potencial (de 0 a -2 V dependendo do eletrólito suporte), superfície reprodutível a cada gota, bem como uma superfície extremamente lisa e uniforme a cada nova gota, são algumas de suas qualidades (ARSLAN; ÇAKIR, 2010).

Embora o HMDE possua várias vantagens, preocupações em torno da toxicidade do Hg incentivaram a busca por outros eletrodos com propriedades químicas semelhantes, porém ambientalmente amigáveis. Eletrodos de amalgama de diferentes tipos, eletrodos de filme de mercúrio, que utilizam menor quantidade de Hg e eletrodos de bismuto foram desenvolvidos para preencher essa necessidade (DE SOUZA et al., 2011).

De Souza e colaboradores (2007) empregaram o eletrodo de amálgama sólida de cobre (CuSAE) para a determinação de herbicidas de triazina (atrazina e ametryne) em águas naturais. Este eletrodo foi utilizado em substituição ao HMDE com finalidade de diminuir a geração de resíduos tóxicos. Os resultados obtidos por estes eletrodos foram comparados com os obtidos por HPLC. Os limites de detecção alcançados pelo CuSAE foram 3,06 e 3,78 $\mu\text{g L}^{-1}$ para atrazina e ametryne respectivamente, próximos aos obtidos com o HMDE (4,54 e 5,38 $\mu\text{g L}^{-1}$) e HPLC (3,19 e 2,69 $\mu\text{g L}^{-1}$). As recuperações obtidas nos estudos de exatidão foram acima de 92,7% para soluções padrão preparadas somente com o eletrólito suporte e entre 70,3 e 79,4% para amostras de águas naturais enriquecidas com 5,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de cada herbicida. Os desvios padrão relativos obtidos foram inferiores a 3,9%. O eletrodo foi ainda aplicado em determinações de atrazina em calda de cana, uma vez que esse cultivo é frequentemente tratado com triazinas. Recuperações alcançadas nesta matriz foram em torno de 46%. Os autores atribuíram a baixa recuperação à provável adsorção de sacarose e flavonoides na superfície eletrolítica, entretanto, afirmam que os resultados foram satisfatórios em relação aos encontrados por outros métodos, principalmente se levado em consideração que tratamentos de amostra não foram realizados (DE SOUZA et al., 2007).

Gerent e Spinelli (2016) empregaram um eletrodo de filme de bismuto *in situ* para a determinação do interferente endócrino paration em leite desnatado utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada catódica. Parâmetros voltamétricos foram otimizados e uma ótima faixa linear foi obtida (0,2 – 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Uma excelente repetibilidade (3%) e bons limites de detecção e de quantificação de 55,7 nmol L^{-1} e 169,0 nmol L^{-1} respectivamente foram obtidos. A performance do sensor foi testada usando amostras de leite desnatado enriquecidas com paration (GERENT; SPINELLI, 2016).

Lezi e colaboradores (2012) fizeram uma curta revisão sobre a utilização de eletrodos de bismuto para a determinação de compostos orgânicos. Os próprios autores afirmam que mesmo tendo propriedades eletroquímicas semelhantes às do HMDE, estes eletrodos foram mais utilizados para estudos com metais, como no caso da comparação entre eletrodos de filme de bismuto, filme de mercúrio e HMDE realizada por De Carvalho e colaboradores (2007). Entretanto, compostos tóxicos (nitrofenóis, 2-amino-6-nitrobenzotiazol, nitrobenzeno, pesticidas, etc.), fármacos e drogas (vitamina B12, sildenafil, colchicina, medicamentos de aminosalicilato e sulfatiazina, etc.), compostos orgânicos biológicos (fenóis, metalogiotioninas, ácido abscísico), já foram estudos empregando eletrodos de bismuto. Limites de detecção satisfatórios usualmente inferiores a concentrações de $\mu\text{mol L}^{-1}$ foram atingidos, no entanto, a baixa seletividade não possibilita a aplicações destes eletrodos para análises ambientais de compostos orgânicos, sendo eles úteis para finalidades de *screening*, segundo os autores.

Todos estes eletrodos acima citados apresentaram boas respostas voltamétricas e sucesso nas suas aplicações, entretanto, os eletrodos sólidos ainda sofrem com processos de passivação e heterogeneidade da superfície. A superfície heterogênea de um eletrodo, pode comprometer a reprodutibilidade das medições voltamétricas. Além disso, quando se tratando de eletrodos quimicamente modificados, embora eles apresentem alta sensibilidade e seletividade, dentre outras qualidades, dependendo da modificação, problemas de estabilidade e reprodutibilidade podem acontecer. Sendo assim o HMDE ainda continua sendo uma ótima opção. Nunes e colaboradores (2018) em publicação recente, realizaram um levantamento bibliográfico a respeito da utilização do HMDE para a determinação de compostos orgânicos e inorgânicos na última década. O levantamento realizado apontou para a ainda importância de tal técnica e eletrodo em laboratórios de pesquisa principalmente em países em desenvolvimento, onde recursos destinados a pesquisa são mais escassos. 151 publicações utilizando o HMDE foram encontradas e destas, cerca de 60% foram com compostos orgânicos. Uma avaliação do número de publicações por ano, apontou para o não abandono do HMDE, mesmo com o surgimento de técnicas mais modernas de análise (NUNES; DOS ANJOS; QUINÁIA, 2018).

Embora o Hg seja um metal tóxico, é importante destacar que o Hg pode ser recuperado e purificado com elevado grau de pureza (99,9999%) através de destilação e lavagem com ácido nítrico diluído (EPA/625/R-94/004, 1994). As primeiras medições voltamétricas utilizando o Hg como eletrodo de trabalho demandavam volumes consideráveis do metal, no modo gotejante. Entretanto, atualmente, com os avanços tecnológicos, a quantidade de resíduos de Hg gerados é ínfima, cerca de 1 μL em uma determinação completa

(BARBOSA et al., 2011). Este volume de Hg gerado é desprezível frente as toneladas liberadas anualmente em forma de vapores no seu estado elementar pela indústria mineradora e outras fontes (BLACK et al., 2017; WASSERMAN; HACON, 2001; YANG et al., 2016). Segundo Zuman (2002) “vivemos em uma era de mercurifobia irracional” pois o Hg em temperatura ambiente não apresenta riscos, principalmente nas pequenas quantidades utilizadas nas medições voltamétricas com o eletrodo no modo pendente. Além disso, os compostos organomercuriais, que apresentam maior toxicidade, não são formados durante as análises voltamétricas (ZUMAN, 2002). Embora, os riscos aos analistas e ao ambiente sejam mínimos, cuidados durante a utilização e descarte dos resíduos são apreciados.

O Hg vem sendo utilizado como eletrodo na polarografia clássica desde a década de 20 (VOLKE, 1983). Jaroslav Heyrovsky, considerado pai da polarografia, foi capaz de desenvolver um método para a determinação quantitativa de várias substâncias em solução utilizando um eletrodo gotejante de mercúrio, do inglês *dropping mercury electrode* (DME). Sua maior contribuição foi relacionar a corrente resultante de um processo eletroquímico de um dado analito, à sua concentração na solução. Esta descoberta lhe rendeu em 1959 o Prêmio Nobel em Química pelo desenvolvimento dos métodos polarográficos de análise (BARD; FAULKNER, 2001; ZUMAN, 2002). Como já citado anteriormente, avanços instrumentais permitiram a utilização de volumes consideravelmente menores de Hg com a utilização do eletrodo no modo pendente (HMDE). Outro avanço alcançado, foi o emprego das técnicas pulsadas. Limitações existentes na polarografia como, a demora nas análises e limites de detecção muito altos foram consideravelmente melhorados. Deste ponto em diante, tais técnicas passaram a ser chamadas de voltametria de pulso diferencial e de onda quadrada (SKOOG et al., 2006).

Aspectos teóricos da voltametria

A aplicação de potencial no eletrodo de trabalho pode ser feita de diferentes formas. Estas formas de aplicação de potencial são conhecidas como sinais de excitação. A perturbação do sistema com um potencial aplicado de forma linear é conhecida como voltametria linear (Figura 2a). Esta forma de aplicação é a mais simples e já foi muito utilizada, entretanto, limites de detecção pobres restringem sua utilização atualmente. Pulso diferencial e onda quadrada são duas técnicas pulsadas amplamente utilizadas para análises quantitativas. Na voltametria de pulso diferencial (PD) ocorre a sobreposição de um pequeno pulso de cerca de 50 mV sobre uma varredura linear em instrumentos analógicos (Figura 2b) ou em uma varredura na forma de escada em instrumentos digitais (Figura 2c) (SKOOG et al., 2006). A amostragem de corrente é realizada em dois pontos, um imediatamente antes da

aplicação do pulso (S_1) e outro em (S_2) no final da aplicação do pulso, como pode ser observado na Figura 2b e Figura 2c. A diferença entre a corrente amostrada em S_1 e S_2 é chamada de Δi e refere-se a corrente de difusão, proporcional a concentração do analito. Além da melhora da corrente faradaica, a amostragem realizada nestes dois pontos é capaz de compensar a corrente capacitiva, uma vez que seu valor nos dois pontos de amostragem são praticamente iguais (ALEIXO, 2003).

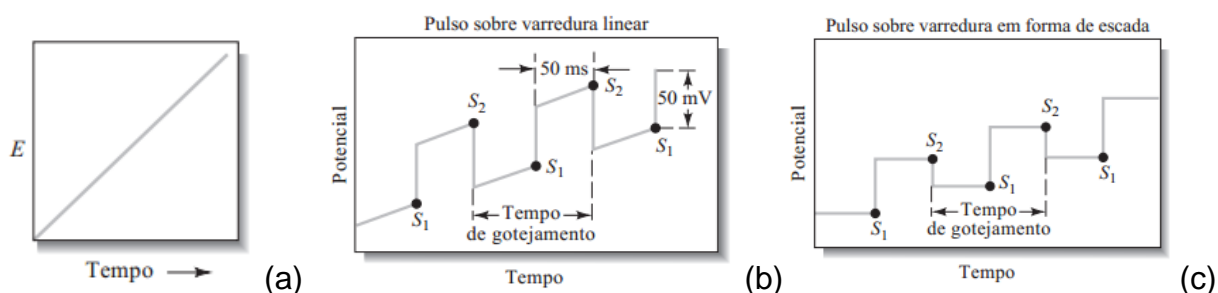


Figura 2. Sinais de excitação empregados em voltametria (a) linear, (b) de pulso diferencial para equipamentos analógicos, (c) de pulso diferencial para equipamentos digitais. Adaptado de (SKOOG et al., 2006).

A voltametria de onda quadrada, do inglês *square wave* (SW), assim como a de pulso diferencial apresenta excelente detectabilidade e resolução, uma vez que compensações da corrente capacitiva também podem ser realizadas. Entretanto, a sensibilidade pode ser igual ou ligeiramente melhor em comparação ao pulso diferencial. Além disso, os voltamogramas podem ser obtidos mais rapidamente. A programação do potencial nesta técnica é feita de forma que ocorra uma superposição de pulsos (Figura 3a) sobre uma rampa de potencial na forma de escada (Figura 3b), resultando em um sinal de excitação na forma de onda quadrada (Figura 3c).

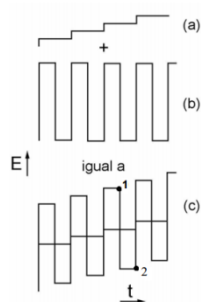


Figura 3. Sinal de excitação da onda quadrada. (a) Rampa de voltagem em forma de escada, (b) onda quadrada, (c) sinal de excitação. Adaptado de (ALEIXO, 2003).

A melhor sensibilidade alcançada com SW em relação ao PD, geralmente é observada para compostos que possuem processos eletroquímicos reversíveis. Isso porque a intensidade do pulso no sentido inverso é suficiente para oxidar os produtos gerados no sentido direto. Sendo assim, como é realizada uma diferença (Δi) entre a corrente no sentido direto (catódica, i_1) e inverso (anódica i_2) as correntes resultantes dos dois processos eletroquímicos acabam se somando, como mostrado na Figura 4.

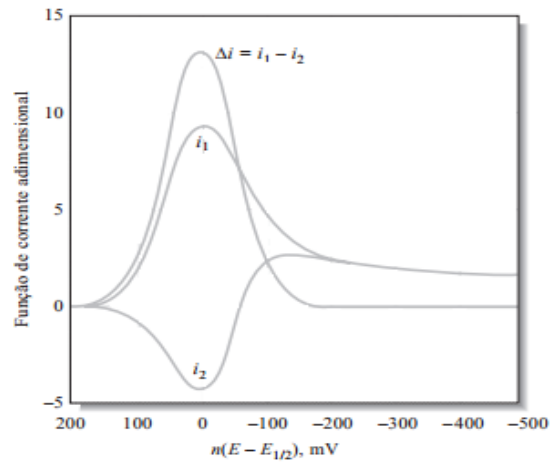


Figura 4. Resposta de corrente para uma reação reversível, obtida por voltametria de onda quadrada. Adaptado de (ALEIXO, 2003).

Outra forma de aplicação de potencial frequentemente utilizada é a triangular que resulta em voltamogramas cíclicos (Figura 5). Esta técnica, voltametria cíclica (VC), é largamente utilizada em estudos de reações redox, na detecção de intermediários de reação, observação e acompanhamento de reações processos eletroquímicos de interesse químico, biológico, etc. (SKOOG et al., 2006). Nos experimentos com VC a varredura de potencial é realizada primeiramente em uma direção e em seguida em outra direção, enquanto a corrente é amostrada (Figura 5a) (SKOOG et al., 2006). Esta forma de varredura de potencial resulta em um voltamograma típico que pode ser observado na Figura 5b. Nota-se na Figura 5 que a varredura de potencial no sentido direto de 0,8 V até -0,15 V resulta em um pico voltamétrico catódico que teve início em aproximadamente +0,4 V e tem seu máximo no ponto D. No ponto F ocorre a inversão da direção da varredura, no entanto, a corrente permanece sendo catódica porque os potenciais ainda são suficientes para provocar a redução do analito, a qual cessa quando a corrente vai para zero e então passa a ser anódica. A varredura da direção anódica provoca o surgimento de mais um pico voltamétrico, resultante da reoxidação da espécie que se acumulou próximo a superfície do eletrodo.

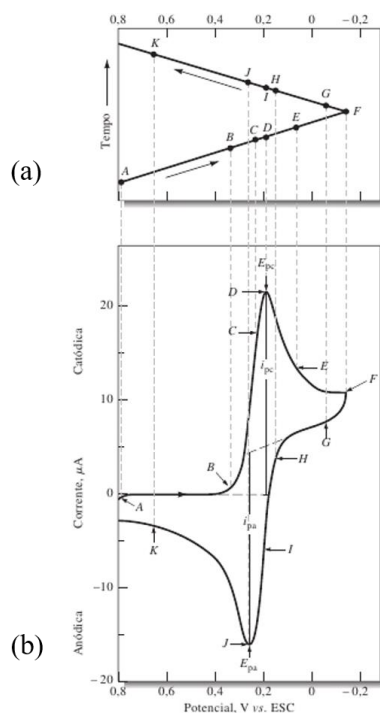


Figura 5. Sinal de excitação da voltametria cíclica (a) e voltamograma cíclicos obtido para uma espécie reversível. Voltamogramas obtidos com eletrodo de platina vs eletrodo saturado de calomelano.

Os limites de detecção obtidos pela voltametria de pulso diferencial e onda quadrada foram consideravelmente melhorados com a utilização das técnicas pulsadas. Entretanto, as melhoras mais significativas nos limites de detecção foram alcançadas com a utilização dos métodos de redissolução. Nos métodos de redissolução, primeiramente o analito é pré-concentrado sobre a superfície do eletrodo de trabalho (usualmente HMDE ou filme de Hg) por meio da aplicação de um potencial fixo enquanto a solução é mantida em agitação. Após este tempo de deposição a eletrólise é interrompida, bem como a agitação, e inicia-se uma varredura de potencial para que ocorra a determinação do analito. Usualmente na voltametria de redissolução anódica (VRA) o eletrodo trabalha como um cátodo durante a acumulação e como um ânodo na etapa de redissolução, com o analito sendo reoxidado. Tal método encontra aplicabilidade na determinação de íons metálicos e vem sendo frequentemente utilizado, como mostrado por Nunes et al. (2018). Em muitos casos os íons presentes em solução são reduzidos formando, convenientemente uma amálgama na superfície do HMDE. Durante a etapa de redissolução estes metais são reoxidados, retornando para a solução (SKOOG et al., 2006). Outro método muito utilizado é a voltametria de redissolução catódica (VRC). Na VRC o eletrodo teoricamente funciona como um ânodo durante a deposição e como cátodo durante a redissolução. Este método é frequentemente empregado em estudos com compostos orgânicos eletroativos e metais complexados, como os listados por Nunes et al (2018) em sua revisão.

Nos parágrafos anteriores ficou clara a importância e a abrangência das técnicas voltamétricas na continuação da pesquisa nas mais diferentes áreas. Em especial o HMDE, que devido as suas propriedades eletroquímicas, mostra ser um eletrodo versátil e adequado para a determinação de diversos compostos em diferentes amostras. Entretanto, mesmo tendo suas vantagens, quando se trata de compostos orgânicos, a seletividade não é uma de suas qualidades. Lezi et al (2012) cita em sua revisão sobre os eletrodos de bismuto, que baixas seletividades para os eletrodos restringem sua aplicação como ferramenta de *screening* em amostras ambientais, uma vez que a identidade do analito não pode ser confirmada. Da mesma forma o HMDE não permite a confirmação estrutural do composto alvo, entretanto formatos e potenciais de pico característicos podem sugerir a identidade do analito. Na voltametria, melhores seletividades são alcançadas com eletrodos quimicamente modificados, os quais diminuem a interferência causada por outras substâncias ou compostos químicos presentes em amostras complexas (GALLI et al., 2006). Entretanto nos estudos realizados com o HMDE, técnicas alternativas podem ser empregadas para a confirmação do analito.

Reconhecidamente, técnicas espectrométricas permitem a confirmação estrutural de compostos orgânicos, devido à possibilidade de identificar a massa dos compostos de interesse e confirmar sua estrutura através do padrão de fragmentação das moléculas. Como já citado anteriormente, técnicas cromatográficas aliadas aos detectores de massa vêm sendo utilizadas para este propósito. No entanto, os custos instrumentais e consumos de reagentes e suprimentos restringem sua aplicação. Neste sentido, uma técnica mais ambientalmente correta vem sendo utilizada para a análise, na sua maioria qualitativa, de compostos orgânicos. *Matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight – mass spectrometry* (MALDI-TOF-MS) tem sido largamente empregada em estudos de interesse principalmente microbiológicos.

MALDI-TOF: Aspectos teóricos e usos

O desenvolvimento de técnicas brandas de ionização como MALDI-TOF-MS e ESI (*electrospray ionization*), por volta dos anos 80, permitiram a análise de compostos orgânicos de elevada massa molecular como proteínas. Isto ocorre porque a ionização mais suave permite que ocorra uma transferência do analito para a fase gasosa sem que haja a decomposição e, desta forma, nos espectros é possível identificar o íon molecular (analito não fragmentado). Este fato possibilitou, por exemplo, a caracterização química de biomoléculas e posteriormente a identificação de microrganismos e animais por meio da detecção de proteínas específicas, sendo observado o padrão de picos obtidos nos espectros (ASSIS; JULIANO; JULIANO, 2011; MAASZ et al., 2017; PÉREZ-SANCHO et al., 2017).

Para as análises realizadas por MALDI, a amostra previamente misturada com a matriz (geralmente um ácido orgânico capaz fornecer prótons para o analito) é co-cristalizada sobre uma superfície (*target*). Esta é uma das formas mais comuns de preparar a amostra no *target* para ser analisada, isso porque ocorre uma melhor homogeneização da mistura matriz/amostra. Entretanto, outras técnicas podem ser também empregadas, como por exemplo a formação de uma fina camada de matriz sobre o *target*, a qual posteriormente recebe a solução contendo a amostra que recristaliza sobre a matriz. A Figura 6 esquematiza as duas formas mais comuns de deposição da amostra e matriz sobre o *target*.

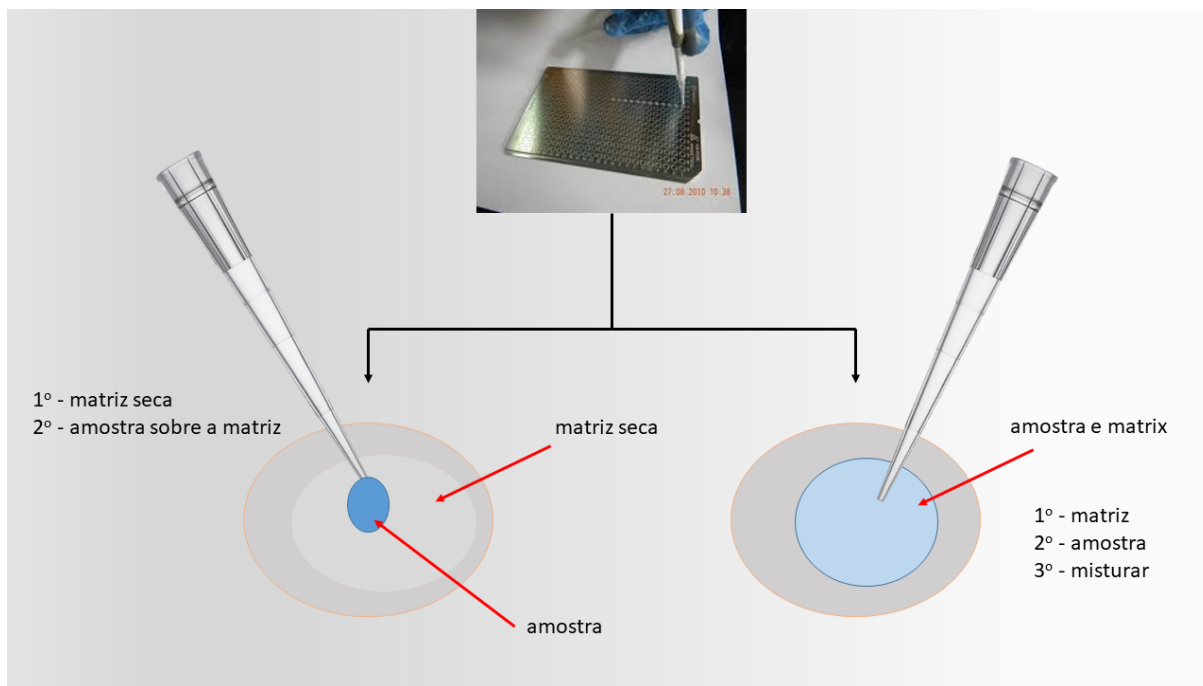


Figura 6. Diferentes formas de preparar uma determinada amostra para ser analisada por MALDI -TOF.

As matrizes são geralmente preparadas como soluções saturadas de 20 mg mL^{-1} , sendo utilizada uma mistura de água com acetonitrila como solvente em muitos casos. A matriz funciona como uma espécie de “amortecedor” entre o laser e a amostra, atenuando a potência do laser que, se incidisse diretamente sobre a amostra poderia destruir as moléculas dos analitos. Sendo assim, a matriz tem função de absorver a radiação proveniente do laser, desencadeando a dessorção da amostra que passa do estado sólido para o estado gasoso e promover então uma ótima ionização dos compostos a serem analisados além de fornecer ou receber prótons dos analitos dependendo o modo a se trabalhar, positivo ou negativo. (SPECTROMETRY, 2013). Além da matriz, usualmente uma pequena quantidade de ácido trifluoracético (TFA) é adicionado como fonte de íons para a geração dos íons $[M + H]$. As matrizes mais comumente utilizadas em análises por MALDI-TOF no modo íon positivo são os ácidos 2,5-dihidroxibenzoico (DHB), 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinâmico (sinapinic acid, SA),

α -ciano-4-hidroxicinamina (CHCA) e 2,5-di-hidroxibenzóico mais ácido 2-hidroxi-5-metoxibenzóico (SDHB). No modo íon negativo o 2,4,6-Tri-hidroxiafetofenona monohidratada (THAP) vem encontrando aplicações na determinação de oligossacarídeos e glicopeptídeos. Entretanto, embora apenas estas matrizes tenha sido citadas neste texto, várias outras estão disponíveis comercialmente (MERCK, 2017).

A escolha entre as diferentes matrizes existentes leva em consideração diversos aspectos. Primeiramente, é importante que a matriz apresente boa solubilidade em um solvente volátil no qual a amostra também seja solúvel. A solubilidade de ambos, matriz e amostra, em um mesmo solvente permitirá uma co-cristalização adequada e melhores reprodutibilidades serão alcançadas para os espectros. Em casos de não solubilidade, técnicas como deposição matriz/amostra em camadas ou em forma sanduíche podem ser utilizadas, entretanto, estas técnicas não são tão eficientes e aumentam o tempo de preparo de amostra (SPECTROMETRY, 2013). Cada matriz resulta em melhores resultados para compostos de baixo, médio ou alto peso molecular. Além disso, existem matrizes ácidas para o modo positivo, no qual são formados íons positivos, e matrizes básicas, para o modo negativo, com as quais são analisados íons negativos. O SA, por exemplo, é mais utilizado para compostos de alta massa molecular e preferencialmente utilizado no modo íon positivo, já o DHB resulta em bons sinais para compostos de baixo peso molecular no modo positivo, porém pode também ser utilizado no modo negativo (GAO; CASSADY, 2008; MENDIS, 2017). Gao e colaboradores (2008) investigaram a produção de íons negativos de proteínas e peptídeos por MALDI-TOF. Mais de 30 peptídeos e proteínas foram investigados em modo positivo e negativo. Para todos os peptídeos e proteínas, foram identificados íons negativos empregando DHB, mesmo sendo esse um ácido, e portanto um doador de prótons que favorece a formação de íons positivos ($M + H$)⁺. Além disso, mesmo os peptídeos altamente básicos, sem sítios ativos ácidos apresentaram bons sinais de íons negativos. Entretanto, os espectros obtidos no modo negativo foram mais “limpos”, com menos picos, que os observados no modo positivo empregando DHB.

Outro ponto a ser considerado durante a escolha da matriz, é a homogeneidade da distribuição dos cristais no *spot* sobre o *target*. Embora o DHB resulte em uma boa ionização dos compostos de interesse, sua recristalização no *target* é bem heterogênea. Esta característica se torna um problema quando baixas concentrações dos analitos estão presentes na amostra, além disso a heterogeneidade da distribuição da matriz e da amostra co-cristalizada resulta em intensidades de sinal analítico variável, comprometendo a reprodutibilidade. Desta forma, usualmente CHCA e AS são usados como matriz para baixas concentrações de analitos. Outro procedimento frequentemente realizado com o objetivo de

aumentar a intensidade do sinal dos analitos e melhorar a homogeneidade da deposição da matriz e conseqüentemente a reprodutibilidade entre *spots* e nos espectros é a combinação de matrizes. Laugesen e Roepstorff (2003) analisaram a resposta espectrométrica resultante da mistura de duas matrizes comumente utilizadas em análises por MALDI, DHB e CHCA, no mapeamento da massa de peptídeos e análise de proteínas. Os autores observaram uma melhor cobertura do *spot* bem como uma melhor reprodutibilidade entre os *spots* para a mistura. Além disso, este método permitiu uma maior tolerância a presença de sais e impurezas, dispensando a necessidade de pré-purificações das amostras (LAUGESSEN; ROEPSTORFF, 2003). A

Figura 7. apresenta microfotografias das matrizes cristalizadas isoladamente, bem como da combinação entre elas. Como descrito anteriormente, o CHCA apresenta uma distribuição homogênea da matriz com microcristais. Essa distribuição mais uniforme não permite a presença de grandes diferenças entre as intensidades de sinal, resultando em uma boa reprodutibilidade entre as medidas. Por outro lado, os cristais referentes ao DHB são bem maiores e tendem a ficar unidos. Desta forma, a distribuição da matriz e conseqüentemente dos analitos não é homogênea, uma vez que ocorre uma co-cristalização entre estas espécies e a reprodutibilidade dos espectros pode ser prejudicada. Na

Figura 7c, DHB e CHCA foram misturados. O aspecto visual se assemelha com o da

Figura 7a quanto a sua uniformidade, entretanto é possível notar a presença de cristais maiores na borda do *spot*, sendo a composição principal destes cristais, provavelmente DHB. Embora a mistura se assemelhe com o CHCA puro, Laugesen e Roepstorff (2003) afirmaram ter obtido melhores resultados nos espectros com esta mistura.

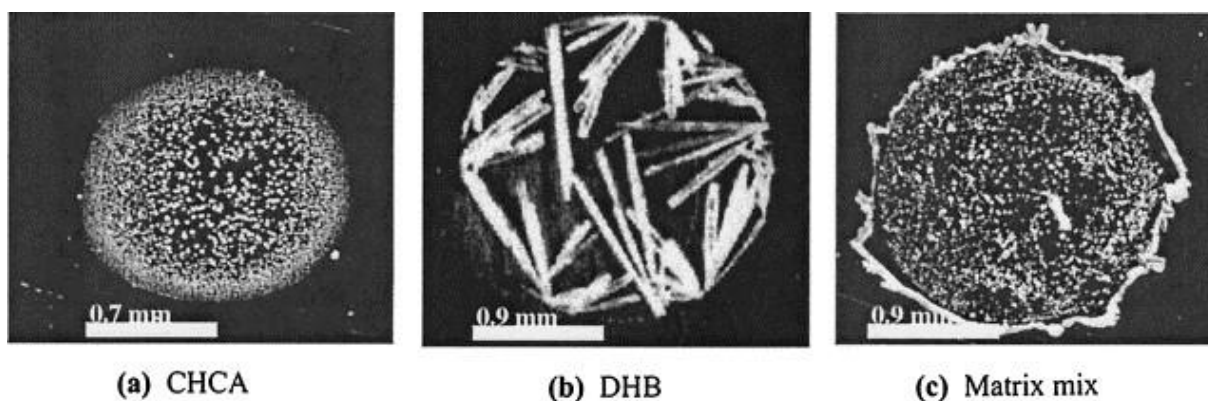


Figura 7. Microfotografia obtida para o (a) CHCA, (b) DHB e (c) uma mistura entre as duas matrizes (LAUGESSEN; ROEPSTORFF, 2003).

Após a co-cristalização da amostra com a matriz sobre o *target*, este pode ser finalmente levado ao equipamento para que seja realizada a análise. Resumidamente, após a

geração de vácuo no interior do equipamento, para diminuir a colisão entre as moléculas, o *target* é atingido por um feixe de laser o qual fornecerá energia para que ocorra a dessorção da amostra e da matriz. Este processo está esquematizado na Figura 8. Este feixe de laser possui espessura muito inferior ao *spot* de matriz/amostra, o que resulta na necessidade de serem efetuados vários *shots* sobre a amostra. Usualmente, o laser tem comprimento de onda próximo a 337 nm, o que fica dentro da faixa de absorbância das matrizes 300 a 360 nm.

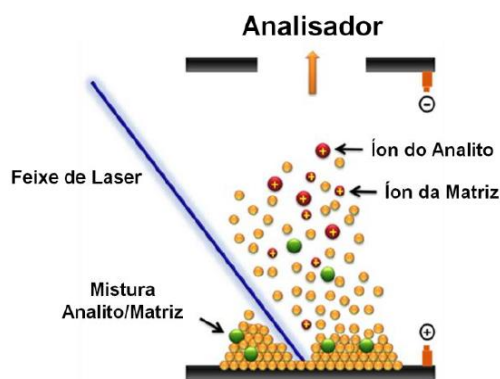


Figura 8. Etapa de ionização da matriz e da amostra por meio da incidência de um feixe de laser (JUNIOR, 2015).

Após a dessorção e ionização da amostra, um gerador de campo elétrico acelera os íons formados na etapa anterior em um tubo de vácuo em direção ao analisador de massas. A velocidade alcançada por cada composto é proporcional à sua razão m/z , desta forma, ao percorrer o tubo de voo, os compostos são separados e os que possuem menor peso molecular alcançam o detector antes dos compostos com maior peso molecular. Quando os íons atingem o detector, uma placa contendo microcanais, esta superfície libera elétrons que são multiplicados nos por estes canais aumentando o sinal. Este sinal elétrico é adquirido pelo computador, processado e transformado em um espectro de massa (Figura 9).

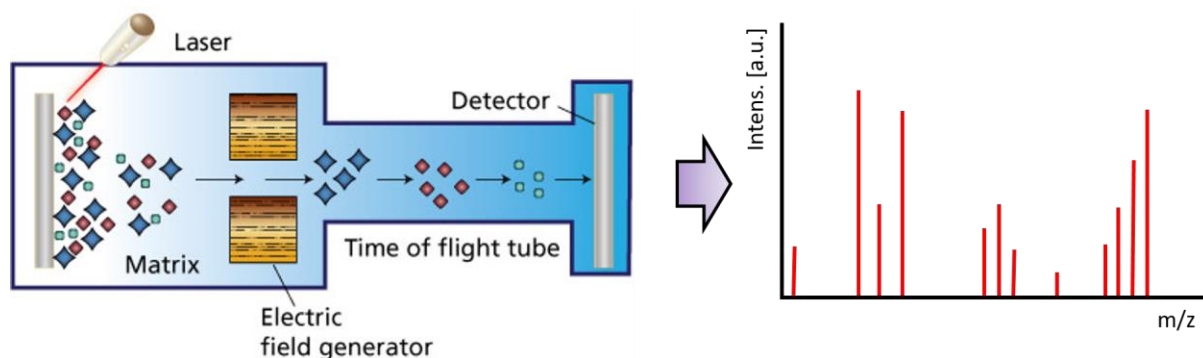


Figura 9. Esquematização do funcionamento de um equipamento de MALDI-TOF-MS. Figura adaptada de (<http://dna-barcoding.blogspot.com.br/2013/08/maldi-tof-ms.html>)

Mello et al., (2017) empregaram a MALDI-TOF para a diferenciação de microalgas verdes cocóides de água doce em nível de espécies e cepas. Uma vez que biomoléculas são expressões fenotípicas que podem ser úteis na taxonomia de organismos vivos, espectros dos

compostos orgânicos, em especial proteínas, de células inteiras destes microorganismos podem auxiliar na sua identificação. Diferentes matrizes foram testadas, entretanto o HCAC foi escolhido devido a melhor razão sinal ruído. O método de suspensão na matriz foi utilizado para a análise de 18 cepas de microalgas pertencentes a 12 diferentes espécies. A dissimilaridade das análises mostrou ser possível a distinção entre casses e espécies das microalgas com os espectros obtidos (MELLO et al., 2017).

Wickhorst et al. (2017) estudaram a bactéria *Arcanobacterium hippocoleae* a qual foi isolada de um útero de égua aparentemente saudável. A caracterização fenotípica foi realizada por meio da análise de peptídeos empregando MALD-TOF e a caracterização genotípica foi feita por meio da análise de moléculas alvo 16S rDNA, 16S-23S e os genes que codificam a subunidade β da ARN polimerase bacteriana (*rpoB*), o factor de alongamento tu (*tuf*) e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*gap*). Os autores afirmam que o método por MALDI para a caracterização fenotípica e a caracterização genotípica podem ser empregados para rápidos diagnósticos de infecções e para entender qual o papel desta bactéria em infecções em cavalos (WICKHORST et al., 2017). A identificação de bactérias foi também realizada por Gürsoy et al. (2017). A espécie *Prevotella* oral foi isolada e caracterizada por meio de seu perfil químico. Análises foram conduzidas com MALDI-TOF uma vez que as reações bioquímicas convencionais são incapazes de diferenciar as novas espécies de *Prevotella* de forma confiável. HCAC foi escolhido como matriz neste estudo. Os autores consideraram as análises por MALDI ótimas para a identificação e discriminação de diferentes bactérias, entretanto, afirmam que é necessário expandir a base de dados com um número de cepas dentro de cada espécie (GÜRISOY et al., 2017).

Maasz et al. (2017) empregaram MALDI-TOF para a identificação de efêmeras (insetos) e peixes. A determinação sexual também foi realizada para uma das espécies de peixes, identificando marcadores sexuais. As espécies puderam ser adequadamente separadas e foi possível realizar a discriminação entre machos e fêmeas do peixe alburnos. Os autores consideraram a MALDI uma rápida, sensível, confiante e barata ferramenta para a identificação de espécies similares. Embora os autores tenham considerado as medidas sendo de baixo custo, reconhecem que um elevado custo inicial para a aquisição do equipamento é uma de suas desvantagens, além da necessidade de ampliação dos bancos de dados. HCAC 0,7 mg mL⁻¹ foi utilizado como matriz neste estudo (MAASZ et al., 2017).

Além da identificação de animais, bactérias e algas, MALDI-TOF tem encontrado aplicação na determinação de outros compostos orgânicos. Sivagnanam et al. (2016) desenvolveram um método para a identificação de quatro alcaloides de ergot (micotoxinas produzidas pelos fungos do gênero *Claviceps*) em esclerócios (massa de hifas que tem como

função a sobrevivência do fungo). Tais fungos podem estar presentes em diversos grãos cereais e podem causar problemas à saúde humana e animal quando ingeridos em alimento contaminado. Usualmente técnicas cromatográficas tais como LC-MS e GC-MS são empregadas nos estudos com tais micotoxinas. Entretanto, Sivagnanam e colaboradores desenvolveram um método rápido e exato para a identificação de ergosina, ergocornina, ergocriptina e ergocristina empregando MALDI-TOF. Uma simples preparação de amostra foi necessária e separações cromatográficas ou derivatizações foram dispensadas. Novamente neste trabalho, HCAC foi utilizado como matriz.

Os trabalhos até o momento citados usando MALDI-TOF, tiveram como foco a caracterização e identificação de compostos biológicos, sendo essa uma das suas maiores aplicações. Tais compostos são usualmente macromoléculas com elevada massa molecular. Estas macromoléculas são relativamente mais fáceis de serem estudadas, uma vez que a linha base no espectro torna-se melhor para elevadas razões massa/carga (m/z). Por outro lado, estudos com moléculas de baixa massa empregando MALDI-TOF não são usuais devido às interferências da própria matriz que elevam o ruído na região de baixa massa no espectro, como pode ser visto na Figura 10. No espectro da Figura 10 é possível observar uma alta concentração de picos até a região aproximada de 550 m/z . Esses picos são provenientes de impurezas presentes na matriz, da própria matriz na forma do íon molecular ionizado ($M + H$)⁺, fragmentos da matriz e associações como ($2M + H$)⁺, ($M + Na$)⁺, ($M + K$)⁺, entre outros. Após 550 m/z o espectro torna-se bem mais “limpo”, sendo essa uma região mais confortável de se trabalhar. É importante ressaltar que massas ainda maiores que 2500 $g\ mol^{-1}$ podem ser estudadas. Teoricamente a técnica de MALDI-TOF-MS não possui limitações quanto a massa dos compostos, bastando estender a faixa de aquisição de dados.

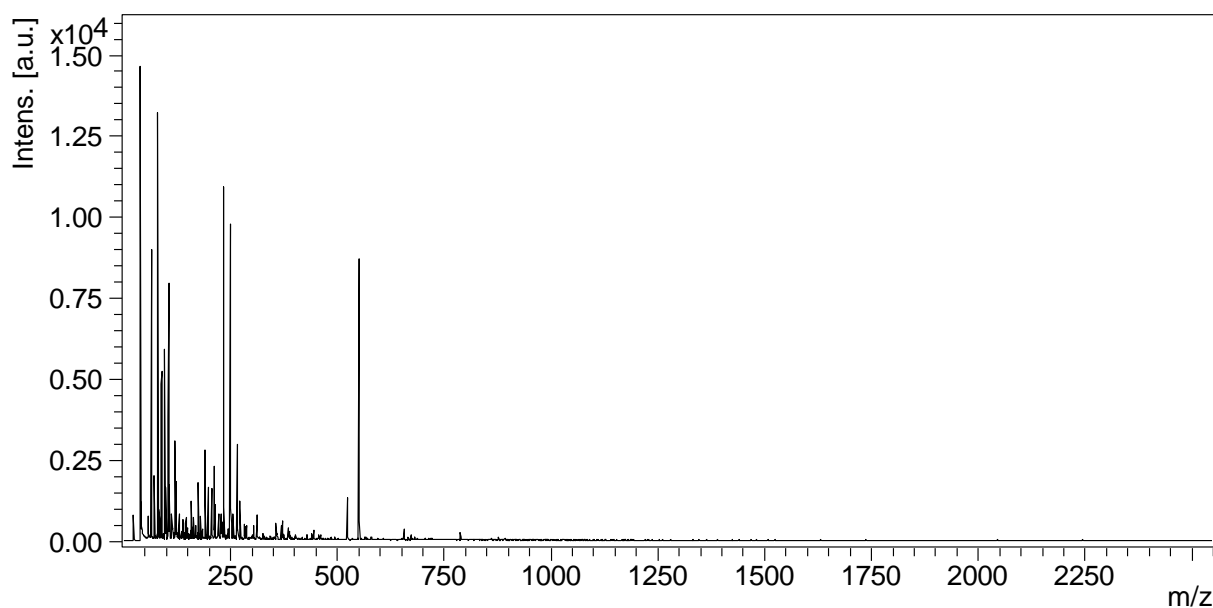


Figura 10. Espectro de massa obtido com a matriz HCAC por MALDI-TOF.

No entanto, alguns trabalhos voltados a determinação de compostos de baixa massa molecular vêm sendo desenvolvidos. Para tanto, matrizes de elevada pureza e diferentes concentrações da matriz estão sendo estudadas. Nozawa et al. (2016) realizaram determinações simultâneas de seis antidepressivos cíclicos e suas drogas relacionadas. THAP e CHCA foram avaliadas como matriz, bem como a sua concentração. O CHCA foi escolhido em uma concentração de $0,7 \text{ mg mL}^{-1}$ para as determinações por MALDI. Limites de detecção entre $0,3$ e $2 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ foram obtidos. O método foi desenvolvido para aplicação em amostras biológicas humanas de sangue e urina. As drogas estudadas por Nozawa são comumente observadas em casos de envenenamento no Japão. Sendo assim dois casos reais foram analisados e 6 metabólitos puderam ser detectados nas amostras de sangue e urina (NOZAWA et al., 2016). Da mesma forma, Nozawa et al. (2015) estudaram 8 outras drogas psicoativas e dois de seus metabólitos. Neste trabalho, os benzodiazepínicos e seus dois derivados 7-aminonitrazepam, nitrazepam, 7-aminoflunitrazepam, zolpidem, flunitrazepam, bromazepam, etizolam, triazolam, zopiclone e brotizolam foram determinados em sangue humano. CHCA foi a matriz escolhida para provocar a ionização dos compostos alvo e diazepam- d_5 foi usado como padrão interno para as quantificações. Os limites de detecção obtidos variaram de $0,07$ a $2 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. Os autores consideraram o método adequado para o *screening* de BDZs em sangue já que apenas $20 \text{ } \mu\text{L}$ de amostra foram suficientes e os resultados foram satisfatórios. O método foi aplicado em dois casos reais de envenenamento por drogas. Estes últimos estudos realizados com fármacos demonstram a possibilidade de empregar MALDI-TOF na determinação de compostos de baixa massa molecular.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Amostragem de sedimentos e água naturais e preparo de amostra

As amostras de água superficial foram coletadas utilizando-se frascos de vidro previamente descontaminados. A coleta foi realizada por imersão do frasco a 10 cm abaixo da superfície. As amostras de água foram então acondicionadas em refrigerador. Amostras de sedimentos, por sua vez, foram coletadas utilizando-se frascos de coleta de vidro, para os sedimentos próximos da margem e em pequenas profundidades em relação a superfície da água. Um dispositivo composto por um frasco plástico de coleta anexado a uma haste de 2,5 m de comprimento foi usado para amostragem em maiores profundidades em relação a superfície da água. A amostragem dos sedimentos foi realizada por coleta do material superficial do leito dos rios. Os sedimentos foram coletados, acondicionados em frascos plásticos fechados e congelados até o momento das análises. Alíquotas destas amostras foram retiradas, descongeladas e secas a temperatura ambiente. Após secagem, o sedimento foi então macerado em almofariz, peneirado (malha de 1 mm) e guardado em um dessecador até os estudos de extração. Todo o material de coleta e armazenagem foi lavado com detergente neutro e enxaguado, em seguida deixado em banho de ácido nítrico 5% v/v e enxaguado cinco vezes com água deionizada. Após esta etapa, mais um enxague com etanol e propanona foi realizado, objetivando remover possíveis contaminantes orgânicos. No momento da coleta todos os recipientes foram previamente enxaguados três vezes com a água do ponto de coleta. Para avaliar a presença de possíveis contaminantes que poderiam ser lixiviados dos frascos de armazenamento para as amostras, análises voltamétricas de água deionizada deixada nos frascos por um período de 24 horas foram realizadas. Nenhum interferente foi detectado.

Pontos de coleta

Amostras de sedimentos e água foram coletadas no Brasil e no Canadá. Estas amostras foram utilizadas para a validação dos métodos voltamétricos desenvolvidos, otimização das condições de extração dos fármacos, avaliação da presença dos BDZs e estudos do K_d . Várias amostras foram coletadas com o objetivo de verificar a presença dos BDZs nestes ambientes, além de obter amostras com diferentes características para os estudos do K_d . A Figura 11 apresenta a localização geográfica dos pontos onde foram coletadas amostras. Sedimentos e água foram coletadas em duas províncias do Canadá e em um estado no Brasil. As fotos dos pontos de coleta de 2 a 16 são apresentadas na Figura 12. Para o ponto de coleta de número 1, registros fotográficos não foram realizados. A Tabela 2 apresenta uma breve descrição, a

localização e as coordenadas geográficas dos pontos de coleta analisados no presente trabalho.

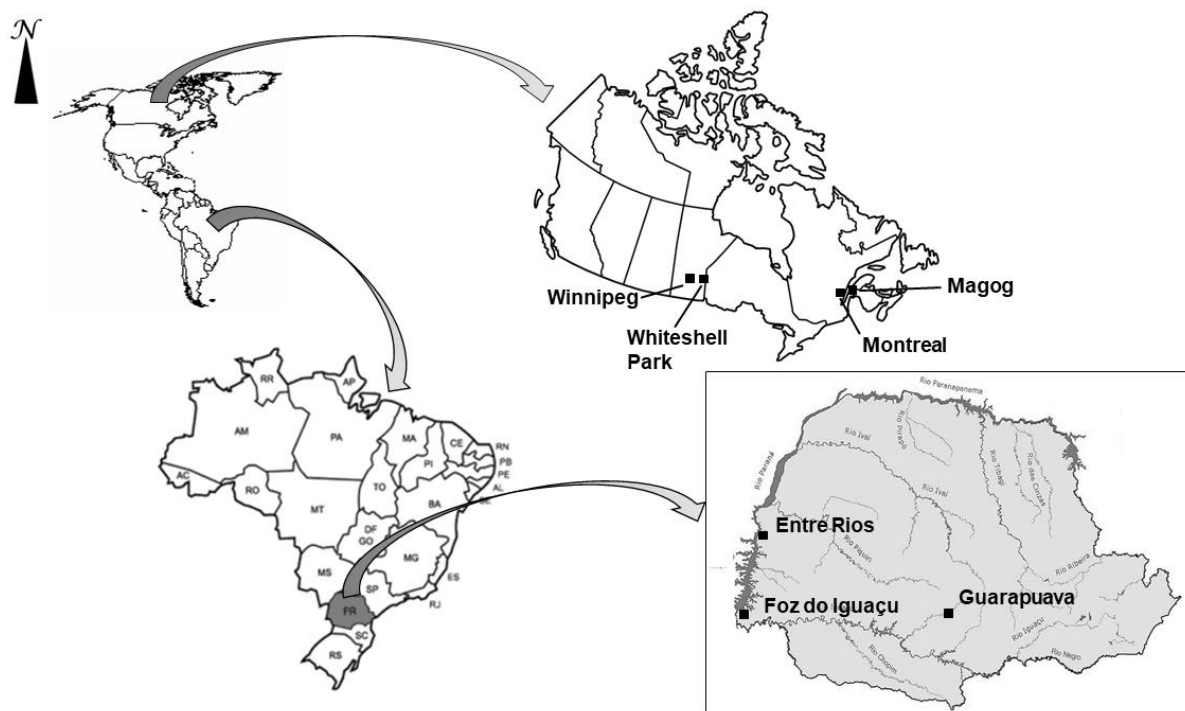


Figura 11. Mapa dos locais de amostragem de sedimentos e água no Canadá e Brasil. Figura adaptada de <http://meucantinhodesugestes.blogspot.com.br/2012/01/conhecimentos-em-geografia-atividades.html>, <http://www.desenhosparacolorir24.com/escola-e-aprendizado/geografia-e-mapas/Canada>, e www.diaadia.pr.gov.br/index.php.

Tabela 2. Locais de amostragem de sedimentos e águas naturais.

Ponto	Descrição	Local	Coordenadas geográficas	Amostra
1	Nascente de rio	Céu Azul, PR/BR	S 25°6'39.88"; O 53°52'15.98"	Sedimento
2	Praia Três Lagoas	Foz do Iguaçu, PR/BR	S 25°43'54.55" O 54°51'10.73"	Água
3	Praia Entre Rios	Entre Rios, PR/BR	S 24°68'38.70" O 54°23'78.71"	Água
4	Nascente	Batel – Guarapuava, PR/BR	S 25°23'38.14" O 51°29'8.10"	Água
5	Rio Carro Quebrado	Vila – Guarapuava, PR,BR	S 25°22'56.59" O 51°29'18.17"	Água
6	Lago do CEDETEG	Vila Carli – Guarapuava, PR/BR	S 25°23'8.70" O 51°29'26.64"	Água
7	Rio Cascavel	Montante da ETE – Guarapuava, PR/BR	S 25°24'31.64" O 51°30'27.88"	Sed./água
8	Rio Cascavel	Jusante da ETE– Guarapuava, PR/BR	S 25°24'50.26" O 51°30'54.84"	Sed./água
9	Parque do Lago	Batel – Guarapuava, PR/BR	S 25°40'00.62" O 51°47'10.95"	Sed./água
10	Rio Jordão	Montante da ponte do parque do Jordão – Guarapuava, PR/BR	S 25°43'99.92" O 51°45'48.66"	Sed./água
11	Rio Jordão	Jusante da ponte do parque do Jordão – Guarapuava, PR/BR	S 25°43'99.92" O 51°45'48.66"	Sed./água
12	Red River	Winnipeg, MB/CA	S 49°81'29.80" O 97°13'06.75"	Sed./água
13	Seine River	Winnipeg, MB/CA	S 49°83'49.40" O 97°08'66.54"	Sed./água
14	Lake Memphremagog	Magog, QC/CA	S 45°26'77.93" O 72°16'07.19"	Sed./água
15	Praires River	Montreal, QC/CA	S 45°53'90.00" O 73°71'27.39"	Sed./água
16	Brerenton Lake	Whiteshell Park, MB/CA	S 49°91'14.89" O 95°52'61.32"	Sed./água



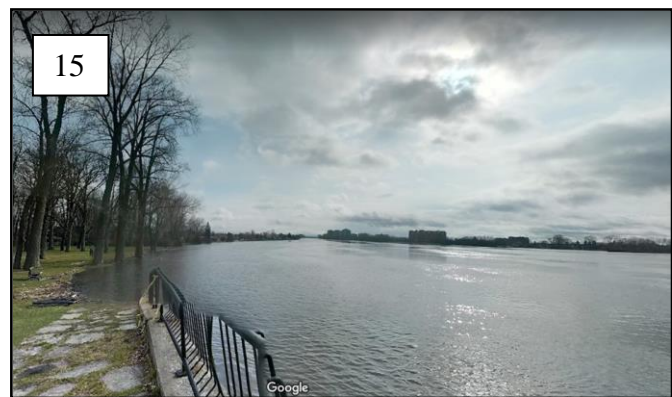


Figura 12. Fotos dos pontos de coleta de amostras de água e sedimentos. Imagens de autoria própria e adaptadas de <http://www.clickfozdoiguacu.com.br/prainha-de-tres-lagoas-passa-por-revitalizacao-para-receber-visitantes/>, <http://www.tourisme-memphremagog.com/en/> e google maps.

Os sítios de amostragem de 1 a 11 listados na tabela acima estão localizados no estado do Paraná no Brasil. O sítio de coleta nº 1 está localizado em uma reserva privada próxima ao Parque Nacional do Iguazu e corresponde a uma área preservada, isenta de contaminação

antrópica. Os sedimentos desta nascente de rio foram utilizados para a otimização do método de extração e primeiros estudos do coeficiente de distribuição (K_d). O ponto 2 de amostragem, se refere a uma praia de água doce localizada no reservatório do lago de Itaipu. Este reservatório é utilizado para finalidade de geração de energia hidroelétrica, água potável e lazer. Amostras de água superficial foram coletadas neste ponto. O ponto 3 de coleta, assim como a praia Três Lagoas, também faz parte do reservatório do lago de Itaipu. Água superficial foi coletada neste ponto e analisada por voltametria. O sítio de amostragem número 4 é uma nascente de água localizada no bairro Batel em Guarapuava, uma região com densidade demográfica considerável. A água desta fonte é diariamente utilizada pela população local para consumo, e lavagem de veículos e utensílios. Estudos de validação foram conduzidos com a água desta fonte. O ponto 5 de coleta, rio Carro Quebrado, tem boa parte de seu percurso dentro do perímetro urbano, estando sujeito à contaminação por esgoto residencial e industrial. O ponto 6 de coleta é um lago presente dentro do campus da Universidade Estadual do Centro-Oeste o qual é utilizado para finalidades recreativas e de pesquisa. Este lago possui expressiva densidade de vida animal e não sofre com o aporte de esgoto industrial ou urbano. Suas águas foram analisadas. No sítio de número 6, foram coletados água e sedimentos para serem analisados e utilizados nos estudos do K_d . Este ponto de coleta se localiza a montante da estação de tratamento de esgoto de Guarapuava no rio Cascavel, ETE Vassoural. Outro ponto a jusante da ETE também foi estudado (8). Assim como para o ponto 7, amostras de água e sedimentos do rio Cascavel foram coletadas, analisadas e utilizadas para os estudos do K_d . As amostras de água e sedimentos coletadas no ponto 8 apresentavam aspectos visuais distintos das amostras coletadas no ponto 7. Além disso, estas amostras (ponto 8) possuíam odor característico proveniente do aporte de esgoto tratado. O ponto de coleta 9 foi em um riacho que deságua em um lago no centro de Guarapuava. O riacho possui baixo, porém constante fluxo de água e tem boa parte do seu percurso dentro do perímetro urbano, estando suscetível ao aporte de esgoto doméstico. Sedimentos e água superficial foram coletados para serem analisados e utilizados nos estudos de K_d . Os pontos de coleta de amostras de número 10 e 11 estão localizados no Rio Jordão, importante afluente da bacia do Iguçu. Amostras de água e sedimentos foram coletadas a montante (10) e a jusante (11) da ponte de acesso ao parque do Jordão. As amostras de sedimentos apresentaram aspectos visuais distintos, uma vez que uma espécie de represa foi construída junto à ponte. Sendo assim, as duas amostras foram caracterizadas, analisadas e empregadas nos estudos do K_d para os BDZs.

As amostras coletadas no Canadá, com exceção às amostras do ponto 12, foram empregadas exclusivamente para os estudos de otimização das metodologias de extração para

análises por MALDI-TOF-MS. No ponto de coleta de número 12, foram amostrados água e sedimentos do Red River, o qual é um grande rio que cruza, com percurso sinuoso, a cidade de Winnipeg na província de Manitoba no Canadá. Winnipeg é a capital e a maior cidade da província, com pouco mais de 700 mil habitantes. A amostra 13 foi coletada em um pequeno rio, Seine River, que assim como o Red River, cruza a cidade de Winnipeg. Amostras de água e sedimentos foram coletadas neste rio para serem analisadas. O ponto de coleta número 14, foi na cidade de Magog, no lago Memphremagog. Este lago tem origem de degelo, ocupando uma grande extensão territorial com água doce. Este lago possuía considerável poluição, entretanto, esforços de descontaminação melhoraram a qualidade de suas águas. A amostra coletada no ponto 15 é oriunda do rio Praires entre a cidade de Montreal e Laval, em Québec, Canadá. O entorno deste rio é altamente ocupado pela cidade e o ponto de coleta foi próximo a um hospital. Sendo assim, este rio pode também estar sofrendo com contaminações humanas. O último ponto de coleta, sítio número 16, foi no parque provincial de Whiteshell, no lago Brenton, província de Manitoba. Este local é um parque de preservação ambiental, rico em rios e lagos, e com vida animal abundante. Embora seja um local preservado, muitas habitações humanas emolduram as margens dos lagos da região, o qual recebe o ano todo um número expressivo de turistas. Sendo assim amostras de água e sedimentos foram também coletados e analisados por MALDI-TOF-MS.

Procedimentos de extração e preparo de amostra para as análises voltamétricas

Estudos prévios de extração sólido-líquido dos BDZs de sedimentos de uma nascente enriquecidos com os fármacos foram realizados. As condições de extração dos fármacos ALP, DIAZ e CLO do sedimento foram otimizadas por meio de planejamentos fatoriais (2^3) com ponto central e ensaios univariados. Os fatores volume do solvente (3 a 9 mL) formas de extração (shaker ou ultrassom), tempo de extração (5 a 15 min) e massa da amostra (0,5 a 1 g) foram avaliados de forma multivariada. A determinação do solvente extrator, pH e presença de um sal no meio foram avaliados por estudos univariados. Os solventes avaliados foram: metanol, metanol/água (1:1), acetato de etila/metanol (1:1), acetato de etila/metanol/água (1:1:2), propanona/metanol (1:1), propanona/metano/água (1:1:2), água/acetonitrila/metanol (2:2:1), água/acetonitrila/metanol (1:2:2), metanol/água (1:1) seguido por metanol/acetonitrila (1:1) seguido por acetonitrila/água (1:1), metanol/água (1:1) pH 12, metanol/água (1:1) pH 3,8, metanol/água (1:1) + NaCl (11,1 g L⁻¹) e metanol/acetonitrila (1:1). Diferentes solventes foram avaliados até a determinação do melhor extrator.

As análises de água por voltametria puderam ser realizadas sem quaisquer procedimentos de extração ou pré-tratamento da amostra, sendo necessária apenas a filtração

em cadinho de vidro sinterizado, para remoção de materiais sólidos, e a diluição das amostras para diminuir a interferência causada por componentes da matriz.

Procedimentos de extração e preparo de amostra para as análises espectrométricas

Para as análises de sedimentos realizadas por MALDI-TOF, foi necessário também otimizar processos de extração dos BDZ. Além disso, procedimentos de *cleanup* foram indispensáveis, uma vez que elevada interferência de matriz foi observada. Sendo assim, a etapa de *cleanup* precisou também ser otimizada. Os estudos de extração sólido-líquido e *cleanup*, empregando Stage Tip, foram conduzidos usando 0,1 g de amostra, pesados em um tubo de micro centrífuga de 1,5 mL, enriquecido com $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$ de cada BDZ. A extração foi conduzida empregando-se duas extrações com 1 mL de metanol cada, seguidas por mais duas extrações com 1 mL de acetona cada. Os extratos foram então unidos e evaporados sobre um suave fluxo de ar. O resíduo foi então reconstituído com 200 μL de metanol 2% em água. Em seguida, o extrato foi passado por uma microcoluna de ponteira artesanal (StageTip, com 5 camadas de disco Empore SPE 2215 – C18 (octadecil) 47 mm, 3M) previamente condicionada e equilibrada com 100 μL de metanol e água respectivamente. A fase móvel utilizada na eluição foi composta por água (A) e metanol (B), ambas soluções com 0,1% de ácido acético.

Para as análises de água, determinações diretas não foram possíveis devido a elevados efeitos de matriz. Desta forma, métodos de extração foram otimizados. Amostras de água superficial foram extraídas empregando-se QuEChERS (*Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe*), adaptado de Westland e Dorman (2013) (WESTLAND; DORMAN, 2013), e SPE (*solid phase extraction*). Estas duas formas de extração foram avaliadas quanto à sua capacidade de pré-concentração e eliminação de interferentes. Para esta extração, 0,5 mL de amostra foi misturada com o mesmo volume de acetonitrila (ACN). A solução monofásica foi então agitada por 1 minuto, em seguida foi adicionado 0,2 g de MgSO_4 e 0,05 g de NaCl. A solução foi então agitada novamente por 1 minuto e centrifugada. A fase orgânica contendo os analitos foi então removida, evaporada e reconstituída com 10 μL de uma solução de ACN/ H_2O (7:3). Para as extrações realizadas com SPE, 10 mL de amostra foram passadas pela coluna previamente condicionada com metanol e estabilizada com água (1 mL de cada solvente). Após a passagem da amostra, os cartuchos SPE foram secos em vácuo e em seguida eluídos. A fase móvel na extração consistiu de misturas entre água e metanol. Diferentes proporções foram avaliadas como fase móvel.

Caracterização das amostras de sedimentos

Análises granulométricas dos sedimentos foram realizadas para as amostras dos sítios 1, 7, 8, 9, 10 e 11, empregando-se a metodologia do densímetro modificado (EMBRAPA, 1997). Primeiramente, 50 g do sedimento seco e peneirado foram acondicionados em um frasco de 500 mL acompanhado de 10 g de areia e 250 mL de solução de NaOH 1 mol L⁻¹. Este frasco foi então deixado sob agitação durante 16 h, em seguida, a solução foi passada por uma peneira com malha de 53 µm para a retenção da areia. A areia foi seca em estufa, pesada e descontada da massa inicial de areia adicionada, obtendo-se a massa de areia da amostra. O filtrado foi recolhido em uma proveta de 1L, deixado descansar por alguns minutos e então a suspensão foi agitada por 1 minuto. A densidade e a temperatura da suspensão foram amostradas após 4 minutos (silte + argila) e 2 horas (argila). Os cálculos pertinentes foram realizados obtendo-se então as proporções de argila e silte (EMBRAPA, 1997). Os teores de matéria orgânica e carbono orgânico total foram determinados através do método volumétrico. Tal método é baseado na adição de uma solução de dicromato (Cr₂O₇²⁻), em quantidade excedente, à amostra de sedimentos. O dicromato reage com a matéria orgânica presente na amostra e seu excedente é determinado por uma titulação de oxirredução com solução de Fe²⁺ (RAIJ et al., 2001). O pH dos sedimentos foi determinado segundo a metodologia adaptada de Guimarães e colaboradores (GUIMARÃES; BASTOS; LOPES, 1970; LIMA; SOUZA; FIGUEIREDO, 2007). Uma massa de 10 ± 0,1 g de sedimentos foram pesados em um copo de béquer, em seguida, foram acrescentados 10 mL de água destilada e o sistema foi homogeneizado por agitação. A mistura foi agitada e deixada em repouso por uma hora. Após este tempo, a mistura foi novamente agitada e o pH foi amostrado com um pHmetro Hanna com eletrodo de membrana de vidro combinado com Ag/AgCl.

Caracterização das amostras de água

As amostras de água foram caracterizadas quanto ao seu pH, temperatura e oxigênio dissolvido. 50 mL de cada amostra foram utilizados nestas análises. As determinações de pH foram feitas utilizando um pHmetro Hanna com eletrodo de membrana de vidro combinado com Ag/AgCl. Estas medições foram feitas assim que as amostras foram levadas ao laboratório. A temperatura de cada amostra foi medida no momento da coleta, usando um termômetro de mercúrio (Incoterm). A medição oxigênio dissolvido foi realizada com um medidor portátil de oxigênio dissolvido digital, com compensação de temperatura automática, logo após a coleta das amostras.

4.2 Reagentes e soluções

Análises voltamétricas

Os reagentes empregados no desenvolvimento desta pesquisa foram de grau analítico e água deionizada (por osmose reversa, GEHAKA OS10 LX) foi empregada na lavagem da vidraria e preparo de soluções. Os padrões dos fármacos utilizados foram ALP (Pharmanostra), DIAZ (Pharmanostra), CLO (Fagron) e LORAZ (Pharmanostra) dissolvidos em metanol (Biotec), em concentração aproximada de 200 mg L⁻¹. Em seguida, soluções de trabalho de 1 mg L⁻¹ foram preparadas por diluição da solução estoque em água deionizada. As soluções estoque e de trabalho foram armazenadas sob refrigeração (4°C) em frascos âmbar. Todas as soluções de trabalho foram refeitas mensalmente.

A solução tampão fosfato foi preparada a partir de soluções de ácido acético (Sigma Aldrich, 99,8%) e ácido fosfórico (Fluka, 85%), ambas 0,1 mol L⁻¹. Para o DIAZ, ALP e CLO, o tampão teve seu pH ajustado entre 6,0 e 8,0 com solução 2 mol L⁻¹ de hidróxido de sódio (Synth, 97%).

Análises espectrométricas

Solventes orgânicos grau HPLC e matrizes de elevada pureza foram empregados nas análises realizadas por MALDI-TOF-MS. Soluções estoque dos BDZs (aproximadamente 2 µg L⁻¹) foram preparadas através da dissolução da massa adequada de cada droga em acetonitrila (ACN) (Merck). Para os estudos de otimização dos parâmetros da técnica e em água, para os ensaios de extração, as soluções de trabalho foram preparadas por diluição das soluções estoque em solução de acetonitrila/água (7:3). As soluções de trabalho foram preparadas em concentrações de 40,0; 80,0; 100,0 e 200,0 µg L⁻¹ de cada fármaco isoladamente e da mistura dos fármacos. Água ultrapura (Simplicity® ultrapure water system – ultravioleta, Merck - millipore) foi usada na preparação das soluções utilizadas. Os compostos ácido sinapínico (SA)(Sigma), ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB) (Sigma), DHB mais ácido 2-hidroxi-5-metoxibenzoico (SDHB) (Sigma), 2',4',6'-Trihidroxiacetofenona monohidratada (THAP) (Fluka) e ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) (Aldrich) foram avaliados como matriz. As soluções de AS, DHB, SDHB, e CHCA foram preparadas por dissolução de 20 mg de cada composto em 1 mL de TA30. A solução de TA30 é constituída de ácido trifluoroacético (0,1% em água) / acetonitrila (3:7). A solução de THAP foi preparada através da dissolução de 20 mg de THAP em 1 mL de acetonitrila / 20 mM de citrato de amônia (1:1).

4.3 Instrumentação e condições experimentais

Análises voltamétricas

O analisador voltamétrico 757 VA Computrace da Metrohm, contendo cela eletroquímica com três eletrodos foi utilizado. Sendo o eletrodo de trabalho o de gota pendente de mercúrio (HMDE), o eletrodo de referência foi o Ag/AgCl com KCl 3 mol L⁻¹ e o contra eletrodo um fio de platina. Um volume total de 10 mL na cela voltamétrica foi rigorosamente utilizado, sendo 1 mL da solução tampão como eletrólito suporte, e o volume restante (9 mL) referente à amostra e água ultrapura. O volume de amostra não foi fixado. Determinações quantitativas dos BDZs se procederam empregando a técnica de voltametria de redissolução catódica por pulso diferencial (VRC PD) e adição padrão. A remoção do oxigênio da cela voltamétrica se deu pela passagem de nitrogênio gasoso (N_{2(g)}) de elevada pureza (99,999%) (ALPHAGAZ).

Voltametrias cíclicas do DIAZ e do CLO variando-se a velocidade de varredura de 25 a 300 mV s⁻¹ foram realizadas com o objetivo de avaliar o comportamento e a natureza do processo eletroquímico dos fármacos. Soluções contendo 100 µg L⁻¹ de cada BDZ foram empregadas nestes estudos. As soluções foram analisadas em tampão fosfato (pH 7,0) e os parâmetros utilizados neste estudo foram: Tempo de purga inicial, 500 s; Potencial de acumulação, -0,8 V; tempo de acumulação, 120 s; Número de varreduras, 1.

A otimização dos métodos de análise para as determinações do DIAZ e CLO procedeu-se através da avaliação dos parâmetros voltamétricos de maneira univariada, com soluções aquosas contendo 10 µg L⁻¹ dos fármacos em cela. Os parâmetros variados foram: amplitude de pulso, tempo de pulso, velocidade de varredura (vv), tempo de equilíbrio, potencial de acumulação (E_{ac}) e tempo de acumulação (t_{ac}). O tempo de purga inicial e o tempo de equilíbrio foram mantidos em 600 s e 5 s respectivamente. O pH das soluções, assim como os parâmetros voltamétricos, foram avaliados em termos de intensidade de corrente de pico (I_p) e resolução dos picos voltamétricos. As otimizações foram feitas para cada fármaco individualmente, ou seja, apenas o BDZ objeto de estudo estava em solução. As condições estudadas bem como as condições de análise para cada parâmetro estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Condições estudadas de cada parâmetro para a otimização dos métodos voltamétricos para o DIAZ e CLO.

DIAZ		
Parâmetro	Condições estudadas	Condições de análise
pH	5,0, 5,5, 6,0, 6,95 e 8,1	E_{ac} , -0,6 V; t_{ac} , 120 s; velocidade de varredura 25 mV s ⁻¹ ; amplitude de pulso, 80 mV; tempo de pulso, 40 ms
E_{ac} (V)	-1,0, -0,9, -0,8, -0,7, -0,6, -0,5, -0,4, -0,3, -0,2, -0,1 e 0,0	amplitude de pulso, 80 mV; tempo de pulso, 40 ms; velocidade de varredura, 25 mV s ⁻¹ ; t_{ac} , 120 s e pH 6,0
Amplitude de pulso (mV)	20, 40 60, 70, 80, 90, 100 e 120	E_{ac} , -0,6 V; t_{ac} , 120 s; velocidade de varredura 40 mV s ⁻¹ ; tempo de pulso, 40 ms e pH 6,0
Tempo de pulso (ms)	20, 40, 60, 80 e 90	E_{ac} , -0,6 V; t_{ac} , 120 s; velocidade de varredura 40 mV s ⁻¹ ; amplitude de pulso, 100 mV e pH 6,0
vv (mV s ⁻¹)	25, 30, 35, 40, 45 e 50	E_{ac} , -0,6 V; t_{ac} , 120 s; amplitude de pulso, 80 mV; tempo de pulso, 40 ms e pH 6,0
CLO		
Parâmetro	Condições estudadas	Condições de análise
pH	5,0, 5,5, 6,0, 7,0 e 8,1	E_{ac} , -0,3 V; t_{ac} , 120 s; velocidade de varredura 25 mV s ⁻¹ ; amplitude de pulso, 80 mV e tempo de pulso, 40 ms
E_{ac} (V)	-1,0, -0,9, -0,8, -0,7, -0,6, -0,5, -0,4, -0,3, -0,2, -0,1 e 0,0	t_{ac} , 120 s; velocidade de varredura 25 mV s ⁻¹ ; amplitude de pulso, 80 mV; tempo de pulso, 40 ms e pH 8,0
t_{ac} (s)	0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 240 e 280 s	E_{ac} , -0,3 V; velocidade de varredura 25 mV s ⁻¹ ; amplitude de pulso, 80 mV; tempo de pulso, 40 ms e pH 8,0
Amplitude de pulso (mV)	20, 40, 60, 80, 100 e 120	E_{ac} , -0,3 V; velocidade de varredura 25 mV s ⁻¹ ; t_{ac} 120 s; tempo de pulso, 40 ms e pH 8,0
Tempo de pulso (ms)	20, 40, 60, 80, 100, 120 e 140	E_{ac} , -0,3 V; velocidade de varredura 25 mV s ⁻¹ ; t_{ac} 120 s; amplitude de pulso, 80 mV e pH 8,0
vv (mV s ⁻¹)	15, 25, 30, 35, 40, 45 e 50	E_{ac} , -0,3 V; t_{ac} 120 s; amplitude de pulso, 80 mV; tempo de pulso, 40 ms e pH 8,0

Análises espectrométricas

As análises foram realizadas em um espectrômetro de massas UltrafleXtreme™ MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics, Leipzig, Alemanha) equipado com tecnologia LID-

LIFT™ para experimentos de massa tandem. 1000 - 7000 *shots* de laser foram usados para adquirir os espectros. A potência do laser usada nas análises foi ajustada entre 29 - 40% e os espectros foram adquiridos em modo refletor de ionização positiva em uma faixa de massa de 0 a 500 m/z. As voltagens das fontes de íon 1 e 2 foram ajustadas para 20 kV e 17,8 kV respectivamente. A voltagem da lente foi regulada para 7 kV, o tempo de extração do íon de pulso foi de 140 ns e a tensão do detector foi otimizada para 2,4 kV. As diferentes matrizes estudadas foram avaliadas quanto à intensidade e resolução dos picos dos analitos, bem como, quanto ao sinal de fundo do espectro da matriz na ausência dos BDZs. Após a escolha do CHCA como matriz, sua concentração foi avaliada em uma faixa de 0,5 a 20 mg mL⁻¹ (solução saturada). Amostras de água natural e de sedimentos coletadas no Canadá e no Brasil foram empregadas para a otimização da metodologia por MALDI-TOF.

4.4 Validação dos métodos

Análises voltamétricas

Os estudos de validação foram conduzidos para cada fármaco separadamente, ou seja, apenas o BDZ foco de estudo estava presente em solução, com exceção aos estudos de seletividade. A validação das metodologias analíticas para o DIAZ e CLO foi realizada avaliando-se algumas figuras de mérito. São elas: Linearidade, sensibilidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), exatidão (estudos de recuperação), precisão (repetitividade e precisão intermediária), seletividade (estudos de interferência com compostos orgânicos e íons metálicos). Nestes estudos, as condições voltamétricas e de pH otimizadas foram empregadas. Os estudos de linearidade foram feitos a partir de curvas analíticas no intervalo de concentração de 0,498 a 95,754 µg L⁻¹ para o DIAZ e de 0,485 a 96,12 µg L⁻¹ para o CLO obtidas com 120 s de *t*_{ac}. A análise da linearidade foi feita por meio de uma regressão linear utilizando o software estatístico Minitab 16.2.2. A aceitação da linearidade ficou condicionada à avaliação do F de regressão (*F*_{reg}), o qual indica se o modelo é linear ou não e deve ser maior que o *F*_{crítico} (*P* < 0,05), e do F de falta de ajuste (*F*_{faj}), que indica se o modelo proposto se ajusta ao método e deve ser menor que o *F*_{crítico} (*p* > 0,05). Para o cálculo do LD e do LQ foram utilizadas as equações 1 e 2 respectivamente.

$$LD = SD \times 3/B \quad \text{Equação 1}$$

$$LQ = SD \times 10/B \quad \text{Equação 2}$$

Nestas equações SD corresponde ao desvio padrão das medidas do eletrólito suporte (tampão fosfato) no potencial de pico (*E*_{pico}) de cada fármaco (-0,4 V para CLO e -0,88 V para o DIAZ)

e B corresponde ao coeficiente angular da equação da reta obtida com a curva analítica para cada fármaco.

A avaliação da exatidão dos métodos foi feita por meio de estudos de adição e recuperação do analito em soluções preparadas com água deionizada e em amostras naturais de água, amostra 4 e 5 (Tabela 2), enriquecidas com padrões dos fármacos (2,5, 5 e 7,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada BDZ). As amostras de águas naturais foram filtradas em cadinho de vidro sinterizado e diluídas em um fator de até 10 vezes para as análises voltamétricas. A diluição da amostra real teve por objetivo diminuir interferências de matriz, sendo realizada progressivamente até a obtenção de um sinal analítico adequado. Os estudos de exatidão foram feitos em triplicatas. A precisão dos métodos foi determinada em dois níveis, a repetitividade e a precisão intermediária. Para a repetitividade foram preparadas soluções contendo 7,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de DIAZ e de CLO em 5 distintos balões volumétricos. As soluções para a repetitividade foram preparadas e analisadas no mesmo dia empregando VRC PD com amostragem de corrente em triplicata. Para a determinação da precisão intermediária, soluções contendo 7,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito foram preparadas e analisadas em cinco dias consecutivos com amostragem de corrente em triplicata. A avaliação da precisão de cada método foi feita com o auxílio da Equação 3.

$$\text{RSD} = \text{SD} \times 100/\text{X} \quad \text{Equação 3}$$

RSD é o desvio padrão relativo, SD é o desvio padrão e X é o valor médio das medidas.

Para a avaliação da seletividade do método de cada BDZ, interferentes orgânicos e inorgânicos foram utilizados nestes estudos. Cada interferente foi avaliado isoladamente, objetivando determinar a influência de cada espécie sobre o sinal analítico do DIAZ e do CLO. Entretanto, para o método desenvolvido para o DIAZ, a interferência conjunta de três BDZs também foi estudada. Estudos de seletividade para a determinação de DIAZ em águas naturais foram realizados através de ensaios de interferência com compostos orgânicos (ALP, CLO, LORAZ, nimesulida e 17 α -etinilestradiol), ácidos húmicos e com íons metálicos (Cu^{2+} , Fe^{3+} e Zn^{2+}). Soluções contendo 4,96 $\mu\text{g L}^{-1}$ de DIAZ foram previamente analisadas, em seguida adições de até 4 vezes a concentração do DIAZ foram feitas com os possíveis fármacos interferentes. A avaliação da interferência ocorreu pela análise das intensidades de corrente de pico (I_p) para o DIAZ. Verificada a interferência de BDZs sobre o sinal analítico do DIAZ, estudos de recuperação do analito na ausência e presença de cada interferente (ALP, CLO e LORAZ) foram realizados. Nestes estudos, foram preparadas soluções contendo apenas aproximadamente 5,02 $\mu\text{g L}^{-1}$ de DIAZ e soluções contendo 4,98 $\mu\text{g L}^{-1}$ de DIAZ juntamente com 5,00 $\mu\text{g L}^{-1}$, 5,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 4,97 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ALP, CLO e LORAZ respectivamente. A

concentração do DIAZ foi determinada e a recuperação calculada para cada sistema (DIAZ, DIAZ + CLO, DIAZ + ALP e DIAZ + LORAZ). A interferência conjunta do ALP, CLO e LORAZ sobre o sinal analítico do DIAZ também foi estudada. Neste estudo, uma solução contendo $4,98 \mu\text{g L}^{-1}$ de DIAZ, foi previamente analisada e, em seguida, aproximadamente $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de ALP, CLO e LORAZ foram adicionados à cela voltamétrica. A interferência causada pela matéria orgânica dissolvida foi avaliada pela adição de ácidos húmicos. O ácido húmico comercial utilizado nestes estudos contém aproximadamente 35% de carbono orgânico dissolvido (COD). Sendo assim, uma solução contendo $9,96 \mu\text{g L}^{-1}$ de DIAZ foi contaminada com 0,2, 0,6, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 e $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ de COD. A I_p foi amostrada na solução inicial e em cada adição do interferente. Para avaliar a interferência causada por íons metálicos, concentrações dos interferentes de até 24 vezes maiores que a do analito foram empregadas em solução contendo $4,96 \mu\text{g L}^{-1}$ de DIAZ.

A avaliação da seletividade para o CLO procedeu-se com compostos orgânicos (ALP, DIAZ e LORAZ), ácidos húmicos e íons metálicos (Cu^{2+} , Fe^{3+} e Zn^{2+}). Soluções contendo $5,02 \mu\text{g L}^{-1}$ de CLO foram analisadas e a amostragem de corrente no potencial de pico do fármaco foi realizada. Em seguida, concentrações de 5,0, 10,0, 15,0 e $20,0 \mu\text{g L}^{-1}$ dos fármacos interferentes foram adicionadas na cela voltamétrica. Sendo assim, os sistemas CLO + ALP, CLO + DIAZ e CLO + LORAZ foram avaliados. Para a avaliação da interferência causada por ácidos húmicos, uma solução contendo $9,93 \mu\text{g L}^{-1}$ de CLO foi enriquecida consecutivamente com 0,2, 0,6, 1,0, 1,5, 2,0 e $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ de COD e a I_p foi amostrada em cada condição. Nos estudos de interferência causada por íons metálicos, soluções contendo $5,02 \mu\text{g L}^{-1}$ de CLO foram contaminadas com 10, 20, 40, 80 e $120 \mu\text{g L}^{-1}$ de Zn^{2+} , Cu^{2+} e Fe^{3+} . A amostragem da I_p no potencial de pico do CLO ocorreu após cada adição do interferente.

4.5 Estudos do coeficiente de distribuição (K_d)

O estudo do K_d em sistemas de sedimento/água enriquecidos com os analitos é uma prática que pode ser utilizada quando as espécies de interesse não são detectadas nas amostras não enriquecidas (LÖFFLER et al., 2005). Sendo assim, para avaliar o K_d dos BDZs (CLO, ALP e DIAZ) em sistemas aquáticos, amostras de água e sedimentos dos pontos de coleta 7, 8, 9, 10, 11 e 12 foram enriquecidas com os fármacos e utilizadas nestes estudos. Além destas amostras, os sedimentos do ponto de coleta 1, uma argila bentonítica comercial (Argel) e água do ponto de coleta de número 4 foram empregados nos estudos iniciais do K_d . A adequação da massa de sedimentos e volume de água, bem como a concentração dos BDZs foi observada nestes testes preliminares. Um sistema montado com a argila Argel e água deionizada foi utilizado para compreender o comportamento dos BDZs frente à argila. O ALP foi empregado

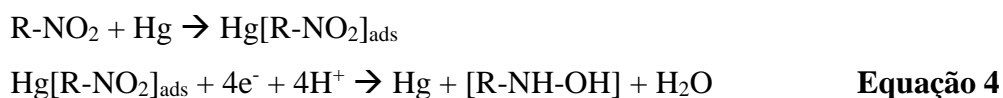
como fármaco modelo. No ponto de amostragem de número 1, nascente de rio localizada na cidade de Céu azul - PR, sedimentos foram coletados no ano de 2015 para servirem como amostra padrão e branco para os testes iniciais de extração de BDZs em sedimentos. Como a amostra de água do mesmo ponto de coleta não estava mais disponível, utilizou-se água de outra nascente (sítio 4 localizado no bairro Batel em Guarapuava) para os estudos iniciais do K_d . Para as amostras de 7 a 12, sedimentos e água do mesmo ponto de coleta foram utilizados nestes estudos. Os experimentos para avaliar o K_d dos BDZs foram realizados em tubos Falcon de 50 mL. 1 g de sedimento foi pesado diretamente em cada tubo, em seguida, 15 mL de água foram adicionados sobre os sedimentos. O sistema foi então enriquecido com 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada BDZ isoladamente e deixado em agitação em uma incubadora a 25° C e 150 rpm por 15 h. Após o período de agitação, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi removido e estocado em refrigeração para ser analisado. Os sedimentos foram extraídos diretamente do tubo Falcon. A presença de possíveis compostos interferentes provenientes do tubo Falcon foi descartada através de análise voltamétrica do “branco” da solução extratora deixada durante o mesmo tempo de extração na ausência de amostra. O K_d foi calculado após a determinação da concentração de cada BDZ na água ($\mu\text{g L}^{-1}$) e no sedimento ($\mu\text{g g}^{-1}$). A relação entre os parâmetros físico-químicos da água e dos sedimentos com o K_d dos BDZs foi avaliada por meio de uma análise de componentes principais, (*principal component analysis*, PCA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

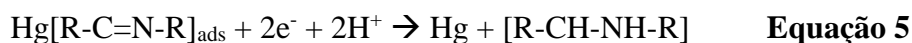
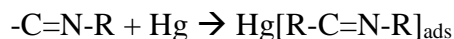
5.1 Voltametria cíclica (VC)

Estudos com VC foram realizados para o DIAZ e CLO com a finalidade de compreender a natureza do processo de transferência de massas de cada fármaco ao eletrodo de trabalho, bem como, os processos eletroquímicos envolvidos na determinação destes BDZs. Estes estudos com VC serviram ainda para a escolha da técnica voltamétrica (onda quadrada ou pulso diferencial) empregada nos estudos subsequentes. Para o ALP, a avaliação do comportamento eletrolítico também foi realizada em estudos anteriores (NUNES et al., 2015).

As determinações por VC para o CLO foram feitas em uma ampla faixa de potencial (-0,2 a -1,6 V), objetivando avaliar os processos eletroquímicos que este fármaco sofre tanto no sentido direto (catódico) quanto no sentido inverso (anódico). A Figura 13A apresenta o voltamograma do eletrólito suporte, pode-se notar a presença de um pico voltamétrico no potencial de -1,0 V referente provavelmente à redução de traços de oxigênio dissolvido. Na Figura 13B, observa-se a presença de dois picos voltamétricos no sentido direto da varredura de potencial (-0,40 ± 0,02 V e -1,04 ± 0,01 V). Observa-se ainda, que a perturbação do sistema com a alteração da velocidade de varredura (vv) propiciou um aumento da intensidade de corrente, bem como um deslocamento do potencial para um sentido catódico em ambos os picos, sendo este último característico de processos irreversíveis (DE TOLEDO et al., 2005; NUNES et al., 2015, 2016). O primeiro pico de redução do fármaco (-0,4 V) deve-se provavelmente a redução do grupo nitro ligado ao anel aromático (Figura 1) envolvendo a transferência de 4 elétrons e 4 prótons, como proposto pela Equação 4 (DE CARVALHO et al., 2010).



O segundo sítio ativo, comum entre os BDZs estudados, foi o grupo C=N, presente na forma de uma amina heterocíclica na estrutura. A redução deste sítio ativo na superfície do eletrodo de trabalho causou o surgimento de um segundo pico voltamétrico no potencial aproximado de -1,04 V durante a VC. O processo eletroquímico envolvido na redução deste sítio ativo envolve a transferência de 2 elétrons e dois prótons na superfície do eletrodo de trabalho (DE CARVALHO et al., 2010), como mostrado pela Equação 5.



No sentido inverso da varredura de potencial (-1,6 a -0,2 V), nenhum pico voltamétrico foi observado, indicando que o processo eletroquímico de redução dos dois sítios ativos do CLO na superfície do eletrodo de mercúrio apresenta comportamento irreversível nas condições estudadas. As velocidades da reação direta e inversa de um dado composto estão diretamente relacionadas com a reversibilidade do processo eletroquímico em questão. De forma que em processos irreversíveis, a velocidade de reação em uma direção é muito mais lenta que na outra, sendo assim considerada desprezível (Skoog et al., 2006).

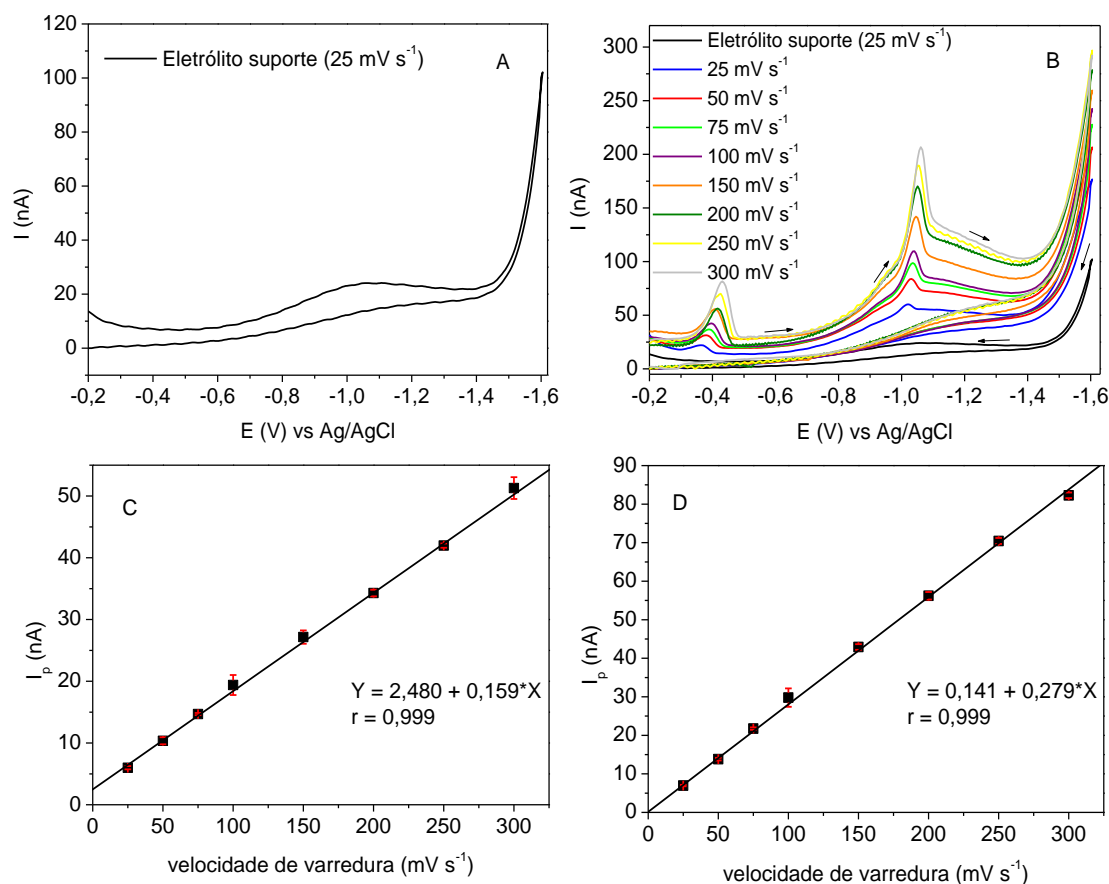


Figura 13. Estudos com VC para o CLO. (A) Eletrólito suporte: tampão fosfato pH 7,0. (B) Voltamogramas cíclicos obtidos para uma solução 100 µg L⁻¹ de CLO em meio de eletrólito de suporte, pH 7. (C) Dependência de I_p em função da vv para o primeiro pico (-0,4 V). (D) Dependência de I_p em função da vv para o segundo pico (-1,04 V). Parâmetros de análise: E_{ac}, -0,8 V; t_{ac}, 120 s; pH 7,0

As Figura 13 C e Figura 13 D apresentam os resultados da perturbação do sistema por meio do aumento da vv, em termos de I_p, para o primeiro e o segundo processo eletroquímico do CLO respectivamente. Em uma visão geral, nota-se que o aumento da vv proporcionou um aumento da I_p de forma linear com coeficiente de correlação superior a 0,99 para ambos os picos. Tal comportamento, aponta para um processo eletroquímico controlado por adsorção e não pela difusão do analito na superfície do eletrodo (DE TOLEDO et al., 2005). O processo

eletroquímico controlado por adsorção foi confirmado plotando-se I_p em função da raiz quadrada da velocidade de varredura ($vv^{1/2}$) e $\log I_p$ em função do \log da velocidade de varredura ($\log vv$) (Figura 14). De acordo com a literatura, processos adsortivos resultam em uma curva não linear para a interação entre I_p e $vv^{1/2}$ (PHAM et al., 1994). Em adição, a relação $\log I_p$ vs $\log vv$ deve apresentar uma curva de modelo linear com coeficiente angular (*slope*) próximo de 1,0 para sistemas adsortivos (BUKKITGAR et al., 2013, 2016). Para processos controlados por difusão admitem-se inclinações próximas a 0,5. Pode-se notar nas Figuras Figura 14A e Figura 14C que uma curva não linear foi obtida quando foi relacionado I_p e vv para ambos os picos voltamétricos. Além disso, a relação entre $\log I_p$ em função do $\log vv$ apresentou coeficientes angulares de $0,87 \pm 0,01$ e $0,987 \pm 0,008$ para o primeiro e o segundo pico respectivamente, valores próximos a 1 (Figura 14B e Figura 14D). Portanto desta forma confirma-se o processo eletroquímico do CLO sendo controlado pela adsorção (BUKKITGAR et al., 2013, 2016).

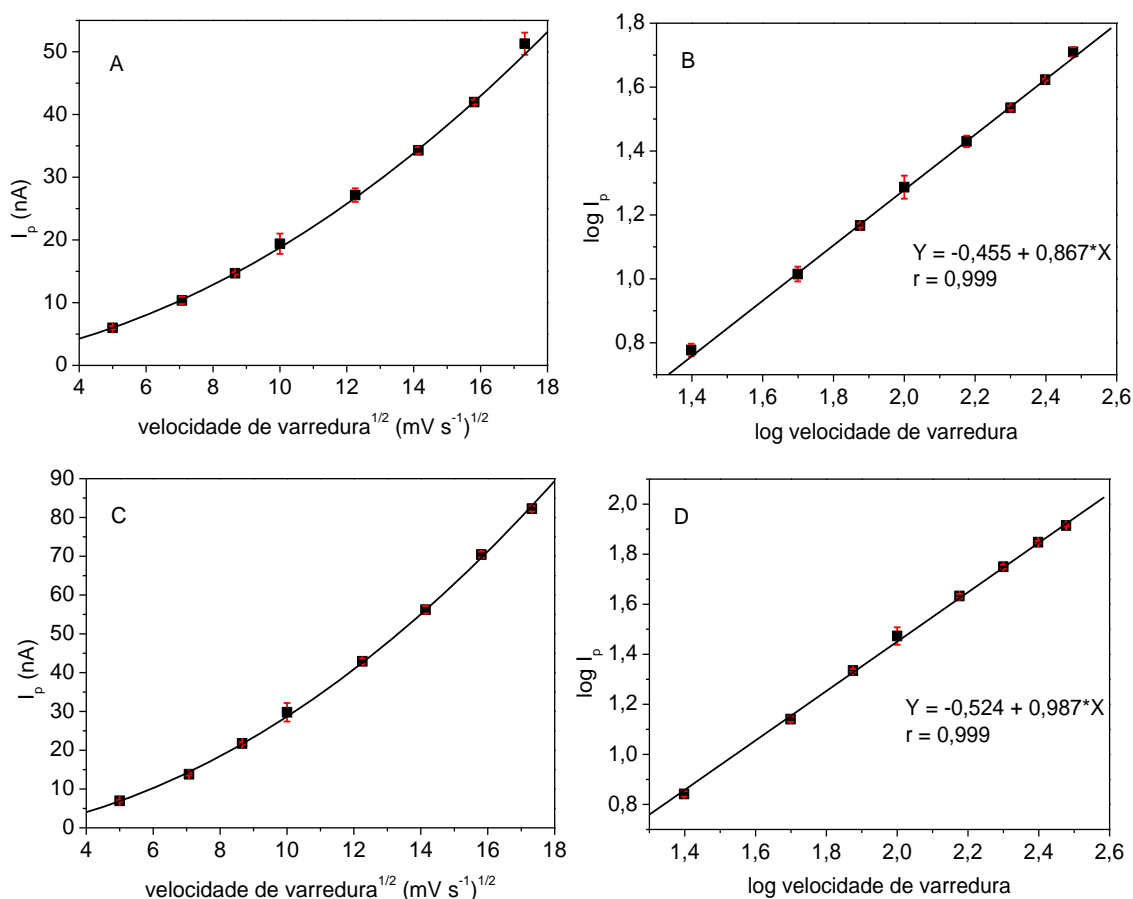


Figura 14. Tratamento dos dados obtidos na determinação do CLO por VC para a compreensão dos processos eletroquímicos. (A) Interação entre I_p e $vv^{1/2}$ para o primeiro pico (-0,4 V). (B) Interação entre \log de I_p e \log de vv para o primeiro pico (-0,4 V). (C) Interação entre I_p e $vv^{1/2}$ para o segundo pico (-1,04 V). (D) Interação entre \log de I_p e \log de vv para o segundo pico (-1,04 V).

O estudo dos mecanismos eletroquímicos do DIAZ seguiu o mesmo procedimento empregado para o CLO. No voltamograma mostrado na Figura 15 nota-se a presença de um único pico voltamétrico irreversível no potencial de $-1,04 \pm 0,02$ V, possivelmente

relacionado com a redução do grupo C=N do DIAZ na superfície do eletrodo. O aumento da velocidade de varredura ocasionou um aumento da I_p , indicando um processo adsortivo. A redução do fármaco envolve a transferência de 2 elétrons e 2 prótons e segue o mesmo mecanismo proposto para o CLO na Equação 5 (DE CARVALHO et al., 2010). Em adição, nota-se na Figura 15A um brando deslocamento do potencial de meia onda (E_{pico}) para potenciais mais catódicos com a alteração da vv para valores mais altos.

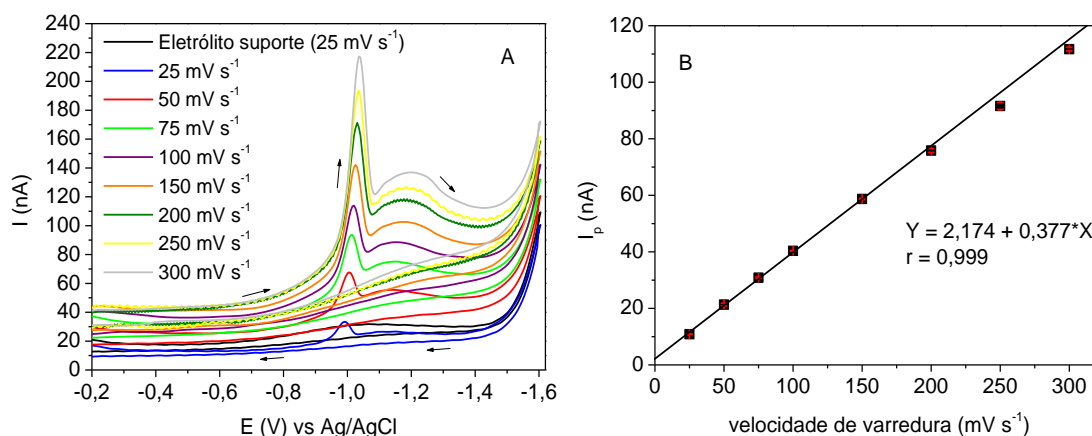


Figura 15. Estudos com VC para o DIAZ. (A) Voltamogramas cíclicos de 100 µg L⁻¹ de DIAZ. (B) Dependência de I_p em função da vv empregada. Parâmetros de análise: E_{ac} , -0,8 V; t_{ac} , 120 s; pH 7,0.

A curva resultante da relação entre I_p do DIAZ em função da velocidade de varredura utilizada, seguiu um comportamento linear, dando indício que processo de transferência de massas do DIAZ é controlado pela adsorção, tal como observado para o CLO.

A confirmação do mecanismo de transporte de massas do analito se deu pelo tratamento de dados obtidos na voltametria cíclica deste composto. Assim como observado para o CLO, os gráficos que relacionam a I_p com $vv^{1/2}$ e $\log I_p$ com $\log vv$ apontaram para um sistema controlado por adsorção. Um comportamento linear, característico de processos adsortivos, para a curva plotada com I_p em função da $vv^{1/2}$ foi observado (Figura 16A), bem como um coeficiente angular de $0,92 \pm 0,04$, próximo de 1 (Figura 16B). Ambos estudos apontam para a natureza adsortiva do processo de transferência de massas do analito à superfície eletrolítica. Outros BDZs também apresentaram este comportamento (NUNES et al., 2015).

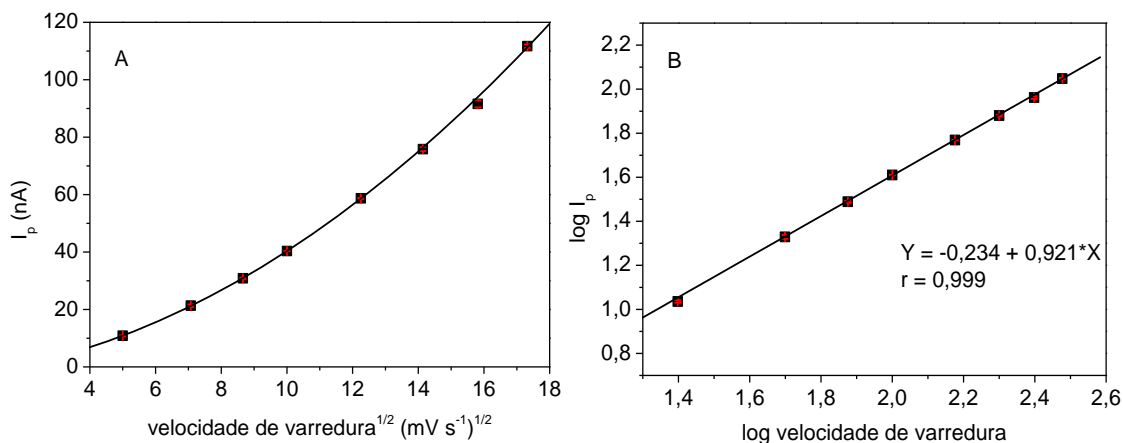


Figura 16. Tratamento dos dados obtidos na determinação do DIAZ por VC para a compreensão dos processos eletroquímicos envolvido. (A) Iteração entre I_p e $vv^{1/2}$. (B) Interação entre $\log I_p$ e \log de vv .

No que se refere a escolha da técnica pulsada, onda quadrada (SW) ou pulso diferencial (PD), sabe-se que SW apresenta algumas vantagens em relação a PD como maior velocidade de varredura e LD e LQ mais baixos. Entretanto, a melhora significativa do sinal voltamétrico e consequentemente do LQ ocorre quando o processo eletroquímico do analito é reversível (ALEIXO, 2003; SKOOG et al., 2006). Como as VC realizadas (Figura 13B e Figura 15A) mostraram a ausência de pico no sentido inverso da varredura de potencial (do potencial mais negativo para o mais positivo), não se justificou a utilização da técnica de SW para a determinação do CLO e do DIAZ. Desta forma, devido ao excelente sinal voltamétrico obtido para ambos os fármacos por PD, esta técnica foi empregada nas determinações voltamétricas. Tal observação já foi feita em estudos anteriormente realizados com o ALP, o fármaco mostrou-se irreversível no que diz respeito ao seu processo eletroquímico, e assim, a técnica de PD também foi escolhida (NUNES et al., 2015). Em geral, determinações voltamétricas de BDZs empregam a técnica PD (DE CARVALHO et al., 2010; GHASEMI; NIAZI; GHORBANI, 2006; HERNANDEZ et al., 1987).

5.2 Otimização e validação dos métodos voltamétricos

Diversos parâmetros voltamétricos foram estudados visando melhorar os sinais voltamétricos do DIAZ e do CLO. Após otimizadas as metodologias, parâmetros de validação foram analisados objetivando garantir a confiabilidade dos resultados obtidos por tais métodos.

5.2.1 Diazepam

Otimização da metodologia

Diversos eletrólitos suporte tais como biftalato de potássio, tartarato de sódio, ácido bórico, oxalato de sódio, tampão fosfato com Triton-x, entre outros, foram avaliados para a

determinação do DIAZ (voltamogramas não apresentados). O objetivo destas análises foi encontrar um meio que apresentasse uma menor intensidade de sinal de corrente de fundo no potencial de $-0,9800 \pm 0,004$ V (Figura 17) que é muito próxima ao E_{pico} do DIAZ e poderia interferir na determinação do fármaco. Dentre os eletrólitos avaliados escolheu-se trabalhar com o tampão fosfato, devido ao melhor sinal de fundo e possibilidade de controle do pH do meio. Entretanto, a intensidade de corrente do branco não pôde ser totalmente reduzida. Sendo assim, uma avaliação do tempo de purga foi realizada, para compreender a relação entre a intensidade do sinal de fundo e a presença de oxigênio (O_2) dissolvido. A Figura 17A apresenta os voltamogramas obtidos para o eletrólito suporte tampão fosfato em diferentes tempos de purga inicial. Pode-se notar que o aumento do tempo de purga foi responsável pela diminuição da I_p do sinal de fundo no potencial de $-1,0$ V. Este comportamento fica mais claro na Figura 17B, em que a I_p diminuiu até o tempo de 600 s. Após 600 s de purga, observa-se uma estagnação da I_p em cerca de 7,5 nA, sem eliminação total do sinal de fundo, indicando que quantidades traço de oxigênio dissolvido permaneceram na solução, provavelmente oriundas do gás empregado na purga. Desta forma fixou-se 600 s como tempo de purga e uma solução de lavagem para o gás foi preparada na tentativa de remover o O_2 remanescente, presente como impureza em concentrações inferiores a 1 ppm segundo o fabricante. A interferência causada pela presença do O_2 já é conhecida pela literatura e é o motivo pelo qual a purga com um gás inerte é realizada. Duas ondas catódicas são observadas quando o O_2 está presente em solução. A Equação 6 apresenta a reação de redução para o O_2 , no potencial de $-1,0$ V, que provavelmente está ocorrendo na cela voltamétrica (Aleixo 2003; Skoog, 2006).

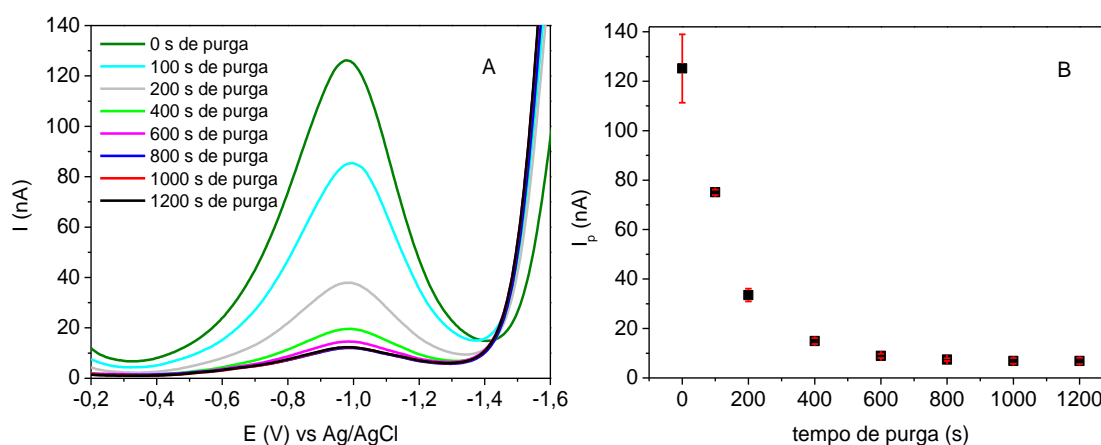
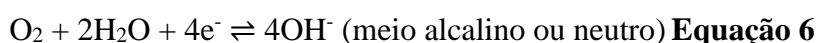
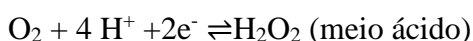


Figura 17. Voltamogramas obtidos na análise do eletrólito suporte tampão fosfato pH 7,0 com diferentes tempos de purga (VRC PD). (A) Voltamogramas completos para o eletrólito suporte. (B) Gráfico da intensidade de

corrente de pico em função do tempo de purga empregado para a análise voltamétrica do eletrólito de suporte. Parâmetros utilizados: E_{ac} , -0,8 V; t_{ac} , 120 s; velocidade de varredura 25 mV s⁻¹.

Como não foi possível a remoção completa do oxigênio da cela voltamétrica por meio da purga, uma solução de cloreto de vanádio foi preparada. Dois gramas de metavanadato da amônio foram dissolvidos em 25 mL de HCl concentrado aquecido, diluindo para 250 mL de água (RIDGE, 2016). Esta solução teve como função purificar o N_{2(g)} removendo quantidades traço de O_{2(g)} presente como impureza no gás de purga. O vanádio é mantido em sua forma reduzida pela presença de zinco na forma de amálgama, desta maneira, quando o gás contendo impurezas de oxigênio é borbuhlado na solução de lavagem, o O₂ oxida o vanádio e por consequência é removido do gás de purga (ALLEN; FU; DENG, 1993). Alguns testes foram realizados, no entanto, o sistema mostrou-se ineficiente, não removendo todo o oxigênio presente no gás. Desta maneira, a solução de vanadato não foi utilizada nos estudos seguintes. Sendo assim, foi necessária a avaliação do pH do meio para deslocar o potencial de meia onda do DIAZ para potenciais menos negativos com melhores condições de corrente de fundo. A Figura 18 mostra como o frasco de lavagem havia sido montado na linha de gás.

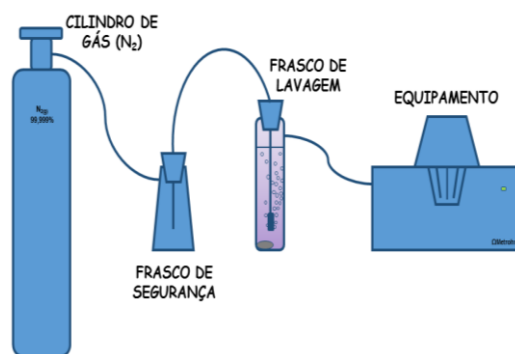


Figura 18. Sistema de gás com frasco de lavagem acoplado.

Estudos para avaliar a influência do valor do pH do tampão fosfato, utilizado como eletrólito suporte, sobre a resposta voltamétrica do fármaco foram realizados. Devido ao elevado background (corrente de fundo) em um potencial de pico próximo ao do fármaco, a escolha do pH da solução não levou em conta apenas a resolução e a intensidade de corrente do pico, mas também foi necessário avaliar sua posição em relação ao branco. Sendo assim, o pH do eletrólito suporte foi variado de 5,0 a 8,1, em uma solução contendo 9,5 µg L⁻¹ de DIAZ. Valores de pH extremos não foram avaliados pois, escolheu-se trabalhar com condições de pH naturalmente encontradas em amostras ambientais.

Como pode ser visto na Figura 19A, o aumento do pH da solução proporcionou um deslocamento do E_{pico} do fármaco para potenciais mais negativos. Este comportamento é frequentemente observado em moléculas orgânicas e deve-se provavelmente a alterações da eletroquímica das mesmas devido a desprotonações de sítios ativos presentes na estrutura.

Além disso, nota-se que a intensidade de corrente de pico do DIAZ é altamente dependente do pH da solução. Observa-se que a I_p foi maior para os valores de pH 6, 7 e 8,1. As maiores I_p obtidas nos estudos de pH da solução foram para o pH 7 e 8,1, que não diferiram estatisticamente entre si (Teste T ($T_{\text{calculado}} < T_{\text{crítico}}$ e $p > 0,05$)). Embora a maior I_p não tenha sido para o pH 6,0, o DIAZ apresentou um E_{pico} de -0,89 V, mais distante do E_{pico} do background (-1,0 V) nesta condição, e conseqüentemente uma melhor linha de base. Deste modo, o tampão fosfato pH 6 foi escolhido como eletrólito suporte para as determinações voltamétricas do DIAZ. Este pH não foi o mesmo utilizado por de Carvalho e colaboradores para a determinação simultânea do DIAZ com outros BDZ. O pH 10 foi considerado a melhor condição nestes estudos (DE CARVALHO et al., 2010).

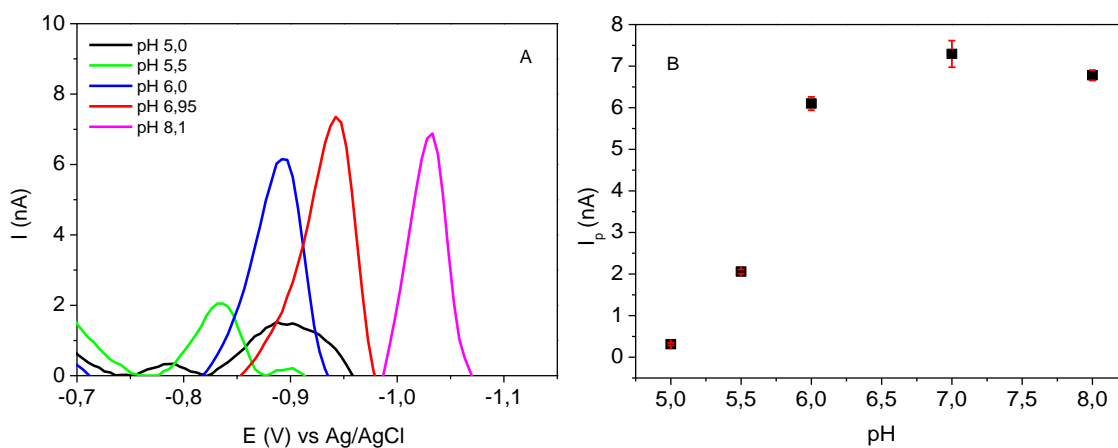


Figura 19. Estudo do pH utilizando VRC PD em meio de eletrólito suporte tampão fosfato (A) Voltamogramas obtidos na determinação de $9,95 \mu\text{g L}^{-1}$ de DIAZ. (B) Relação entre a intensidade de corrente de pico (I_p) e o pH da solução. Parâmetros empregados: E_{ac} , -0,6 V; t_{ac} , 120 s; velocidade de varredura 25 mV s^{-1} ; amplitude de pulso, 80 mV; tempo de pulso, 40 ms.

Um dos principais parâmetros responsáveis por melhorar a seletividade e os limites de detecção em voltametria de pulso diferencial é o potencial de acumulação (E_{ac}), o qual permite a pré-concentração dos analitos na superfície do eletrodo no momento da medida voltamétrica. Este parâmetro foi variado de -1,0 a 0,0 V e os resultados estão apresentados na Figura 20. É possível observar nos voltamogramas da Figura 20A que o potencial de acumulação interfere drasticamente na intensidade do sinal voltamétrico do DIAZ. Para os potenciais de -0,2, -0,1, 0,0 e -1,0 V praticamente não existe um pico voltamétrico referente ao analito. Na Figura 20B, a resposta da intensidade de pico em função do E_{ac} fica mais evidente. Até o potencial de -0,6 V, o qual apresentou melhor resposta, a intensidade do pico sofreu um aumento, seguido por uma queda para os potenciais de -0,7 a 1,0 V. Deste modo, escolheu-se trabalhar com E_{ac} de -0,6 V devido sua melhor resposta voltamétrica, tanto no que se refere à intensidade como à resolução do pico voltamétrico. de Carvalho et al. (2010) realizaram a determinação simultânea de um grupo de BDZs contendo diazepam, medazepam e clordiazepóxido. Para a determinação deste grupo escolheu-se o potencial de -0,8 V em

tampão Ringer pH 10, diferente do potencial escolhido no presente trabalho.

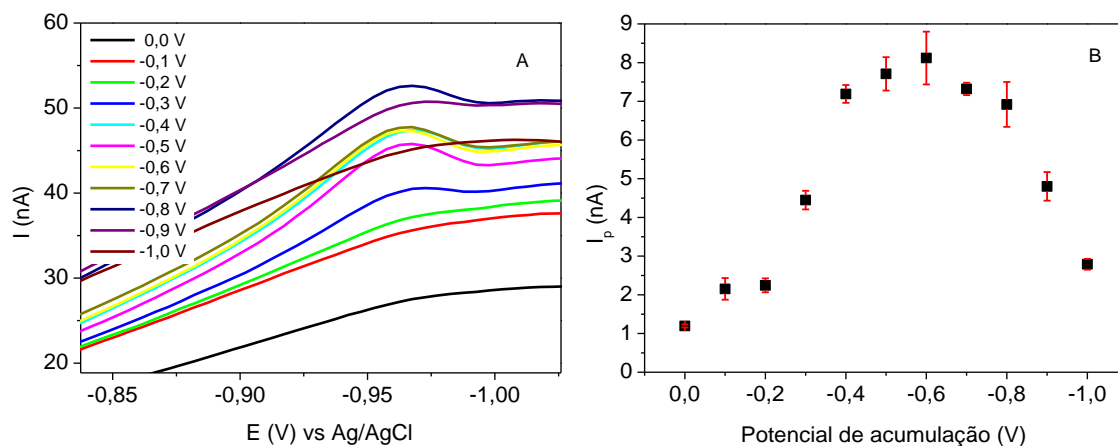


Figura 20. Estudo do potencial de acumulação empregado VRC PD em meio de eletrólito suporte tampão fosfato, pH 6,0. (A) Voltamogramas obtidos na determinação de $9,95 \mu\text{g L}^{-1}$ de DIAZ. (B) Relação entre a intensidade de corrente de pico (I_p) e o E_{ac} aplicado. Parâmetros empregados: amplitude de pulso, 80 mV; tempo de pulso, 40 ms; velocidade de varredura, 25 mV s^{-1} ; t_{ac} , 120 s.

A velocidade de varredura de potencial foi variada de 25 a 50 mV s^{-1} . Velocidades de varredura mais altas implicam em maior velocidade de análise, porém podem diminuir a resolução dos picos voltamétricos. Já vv muito baixas podem prolongar o tempo de análise. Na Figura 21A nota-se que o aumento da vv proporcionou um aumento da intensidade de corrente de pico (I_p), como pode ser melhor observado na figura ao lado, Figura 21B. Além disso, observa-se um pequeno deslocamento do E_{pico} para potenciais mais negativos com o aumento deste parâmetro. Este deslocamento não é desejado pois o sinal analítico do fármaco aproxima-se do E_{pico} do sinal do branco. Em todos os voltamogramas, com exceção para 50 mV s^{-1} , uma boa resolução voltamétrica foi obtida. Embora as I_p tenham sido mais altas para 45 e 50 mV s^{-1} , escolheu-se 40 mV s^{-1} como condição ótima para este parâmetro devido a melhor resolução do pico voltamétrico.

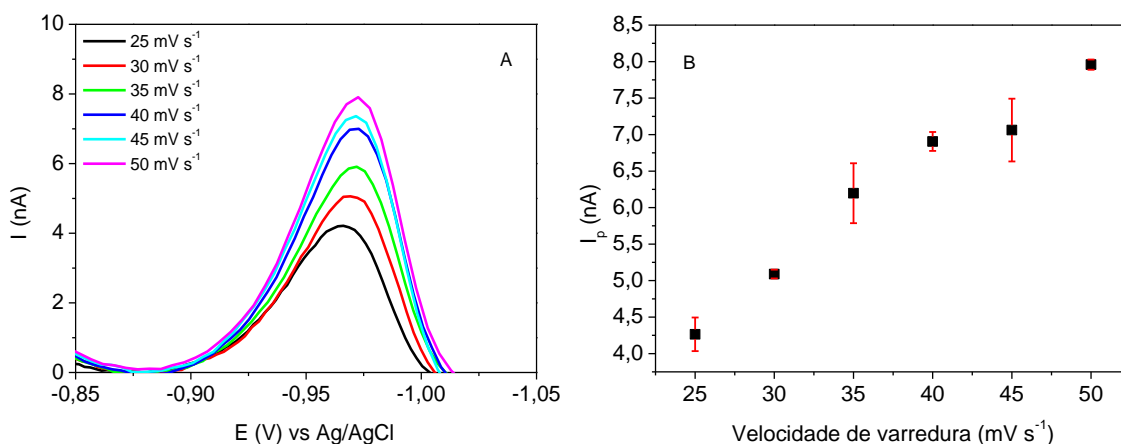


Figura 21. Estudo da velocidade de varredura utilizando VRC PD em meio de eletrólito suporte tampão fosfato, pH 6,0. (A) Voltamogramas obtidos na determinação de $9,95 \mu\text{g L}^{-1}$ de DIAZ. (B) Relação entre a intensidade de

corrente de pico (I_p) e a velocidade de varredura aplicada. Parâmetros empregados: E_{ac} , -0,6 V; t_{ac} , 120 s; amplitude de pulso, 80 mV; tempo de pulso, 40 ms.

Outro parâmetro voltamétrico avaliado foi a amplitude de pulso. Este parâmetro está diretamente ligado a intensidade de corrente de pico do fármaco e foi variado de 20 a 120 mV. Pode-se notar na Figura 22A que o aumento da amplitude de pulso proporcionou um aumento da intensidade de corrente de pico chegando a aproximadamente 7,5 nA em 60 mV. De 60 a 120 mV não houve mudanças bruscas na I_p . Nota-se ainda que o aumento da amplitude ocasionou um deslocamento do E_{pico} para potenciais menos negativos. A relação entre I_p e amplitude de pulso pode melhor ser observada na Figura 22B. A condição escolhida como ótima para este parâmetro foi de 100 mV por apresentar adequada I_p e resolução voltamétrica, além de deslocar o E_{pico} para um potencial menos negativo, mais longe do potencial de pico da corrente de fundo.

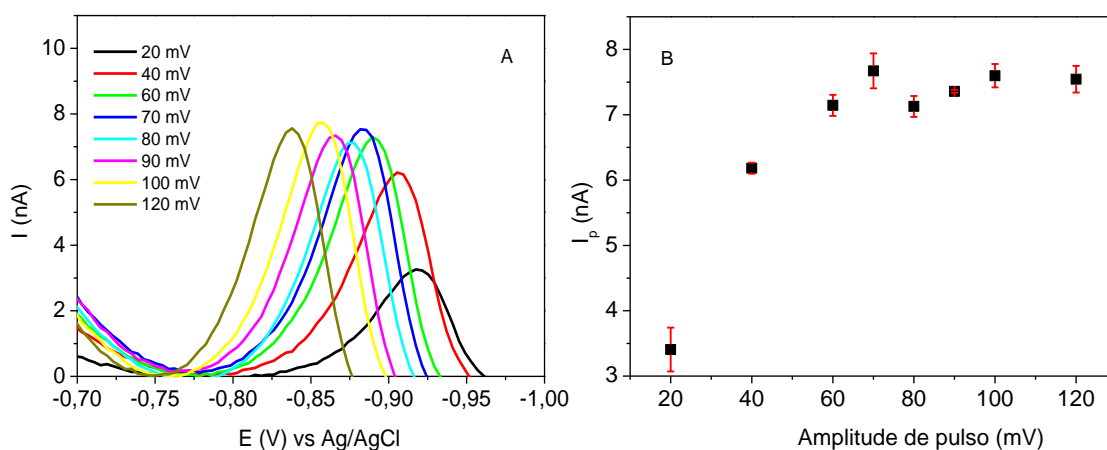


Figura 22. Estudo de amplitude de pulso utilizando VRC PD em meio de eletrólito suporte tampão fosfato pH 6,0 (A) Voltamogramas obtidos na determinação de $9,95 \mu\text{g L}^{-1}$ de DIAZ. (B) Relação entre a intensidade de corrente de pico (I_p) e a amplitude de pulso. Parâmetros empregados: E_{ac} , -0,6 V; t_{ac} , 120 s; velocidade de varredura 40 mV s^{-1} ; tempo de pulso, 40 ms.

O tempo de pulso aplicado também foi avaliado em uma faixa de 20 a 90 ms. Pode-se notar na Figura 23A que o aumento do tempo de pulso causou uma diminuição da intensidade de corrente de pico do DIAZ e um leve deslocamento do potencial de pico para uma região mais anódica. Na Figura 23B nota-se que a I_p diminuiu quase quatro vezes do tempo de pulso de 20 até 90 ms. Esta redução deve-se ao fato que a aplicação do incremento de potencial provocar uma migração do analito ao eletrodo de trabalho, aumentando assim a concentração na região próxima a superfície do eletrodo. Tão logo o analito alcança a superfície do eletrodo, estas espécies são então reduzidas e a concentração do analito vai diminuindo com o tempo. Como a intensidade de corrente de pico diminuiu com o tempo e a resolução do sinal voltamétrico foi adequado para 20 ms de tempo de pulso, escolheu-se esta condição como ótima para este parâmetro. As condições de análise otimizadas para o DIAZ estão apresentadas na Tabela 4.

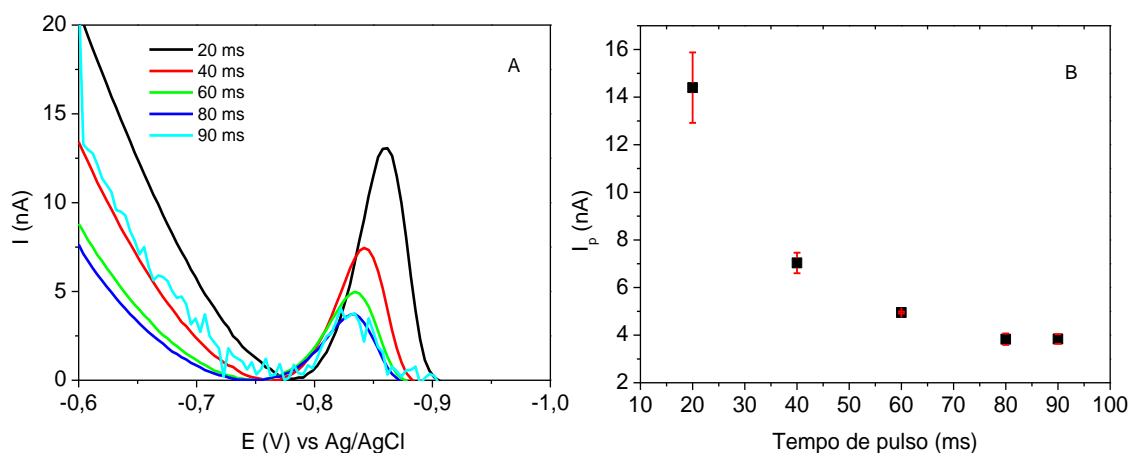


Figura 23. Estudo do tempo de pulso utilizando VRC PD em meio de eletrólito suporte tampão fosfato pH 6,0 (A) Voltamogramas obtidos na determinação de $9,95 \mu\text{g L}^{-1}$ de DIAZ. (B) Relação entre a intensidade de corrente de pico (I_p) e o tempo de pulso empregado. Parâmetros empregados: E_{ac} , -0,6 V; t_{ac} , 120 s; velocidade de varredura 40 mV s^{-1} ; amplitude de pulso, 100 mV.

Tabela 4. Parâmetros de análise otimizados para a determinação do DIAZ.

Parâmetro	Condição
Potencial de acumulação	-0,6 V
Velocidade de varredura	40 mV s^{-1}
pH	6,0
Amplitude de pulso	100 mV
Tempo de pulso	20 ms
Tempo de purga	10 min
Tempo de equilíbrio	5 s

De Carvalho e colaboradores otimizaram as condições voltamétricas para vários BDZs, incluindo o DIAZ. Os pesquisadores definiram como condições ótimas para a determinação do DIAZ o E_{ac} de -0,8 V por 10 s em tampão Ringer pH 10 (DE CARVALHO et al., 2010). Estas condições foram diferentes das consideradas ótimas no presente trabalho. Entretanto, para de Carvalho (2010), uma condição ótima para a determinação de grupos de BDZs foi encontrada, desta forma não foram considerados os melhores parâmetros para cada fármaco isoladamente e sim para o grupo.

Validação da metodologia

Para a validação do método analítico, algumas figuras de mérito foram avaliadas. A seletividade foi avaliada por meio de estudos com interferentes orgânicos e íons metálicos. Para o estudo com interferentes orgânicos, foram utilizados fármacos da mesma classe, como os também benzodiazepínicos alprazolam (ALP), clonazepam (CLO) e lorazepam (LORAZ) e fármacos de outras classes como o hormônio 17α -etinilestradiol (EE) e o anti-inflamatório

nimesulida (NIM), além de ácidos húmicos. A Figura 24A apresenta a resposta de I_p de 4,97 $\mu\text{g L}^{-1}$ de DIAZ em função da concentração dos fármacos interferentes adicionados em concentrações até quatro vezes maiores. É visível nesta figura que os fármacos ALP, CLO e LORAZ provocaram uma considerável interferência na intensidade do sinal voltamétrico do DIAZ. Entretanto para o CLO e LORAZ observa-se um aumento da I_p ao passo que para o ALP nota-se uma diminuição da magnitude do sinal.

A interferência causada pelo CLO deve-se a presença de um segundo pico voltamétrico referente a um grupamento C=N semelhante ao do DIAZ com o mesmo E_{pico} . Para o LORAZ, para o qual também foi observada uma interferência positiva, este sinal deve-se ao E_{pico} do fármaco (-0,853 V) ser muito próximo ao do DIAZ (-0,866 V) nestas condições de análise. Desta forma, não é possível a separação dos sinais dos três BDZs. Para o ALP, que causou diminuição do sinal do DIAZ, é possível notar a presença de dois picos nos voltamogramas (Figura 24B), o primeiro referente ao ALP em -0,81 V e o segundo ao DIAZ em -0,86 V. É possível notar nestes voltamogramas que a adição do ALP causou o surgimento de um pico voltamétrico próximo ao sinal do DIAZ provocando a diminuição à metade da I_p do DIAZ no início do experimento. Entretanto para as concentrações de 10, 15 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ do interferente, a intensidade do sinal voltamétrico do DIAZ permaneceu constante. Sendo assim, o ALP é capaz de interferir, mas não comprometer a determinação do analito, pois os fármacos apresentam potenciais de pico distintos.

Na Figura 24A, ainda é possível notar que a adição de NIM e EE não provocaram quaisquer interferências no sinal voltamétrico do DIAZ. A I_p permaneceu praticamente constante e a leve diminuição de corrente (cerca de 0,2 nA) deve-se provavelmente às adições do fármaco que alteram o volume da cela voltamétrica de 10,052 para 10,260 mL e consequentemente reduziu a concentração do analito em solução.

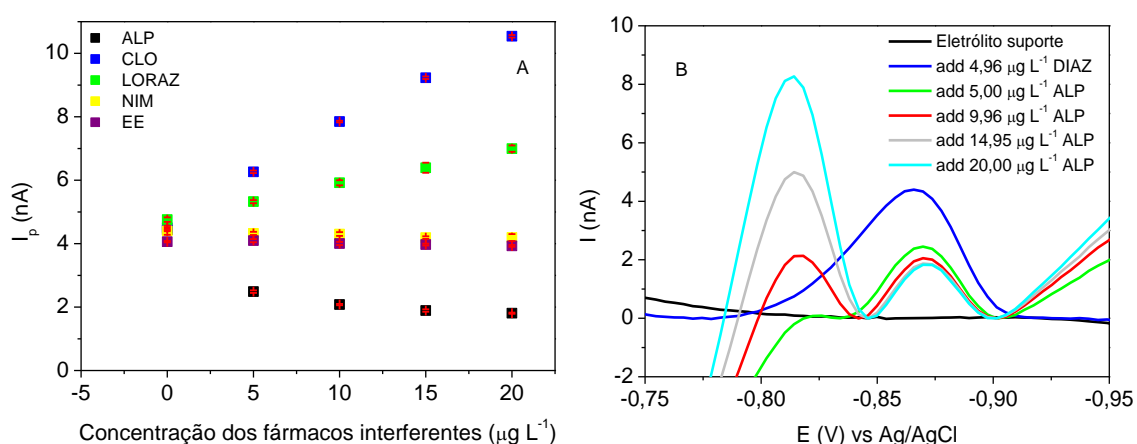


Figura 24. Estudos de seletividade para 4,96 $\mu\text{g L}^{-1}$ de DIAZ utilizando VRC PD em meio de eletrólito suporte tampão fosfato pH 6,0. (A) Relação entre I_p e concentração dos fármacos interferentes. (B) Voltamogramas

obtidos na determinação do diazepam com adições consecutivas de ALP. Parâmetros empregados: E_{ac} , -0,6 V; t_{ac} , 120 s; velocidade de varredura 40 mV s⁻¹; amplitude de pulso, 100 mV; tempo de pulso, 40 ms.

Para confirmar a interferência dos BDZs sobre a quantificação do DIAZ, estudos de recuperação foram realizados na presença de outros fármacos do grupo em solução sintética. A concentração do analito e de cada interferente utilizado foi de aproximadamente 5 µg L⁻¹ e diferentes ensaios foram propostos. Nos ensaios de 2 a 4 a recuperação do DIAZ foi conduzida com concentrações iguais de cada fármaco. Para o ensaio n° 5 foi utilizado 5 µg L⁻¹ de DIAZ, CLO, ALP e LORAZ em solução. A Tabela 5 mostra os resultados obtidos para cada condição experimental.

Tabela 5. Estudos de recuperação do DIAZ na presença de outros BDZs.

Ensaio	Fármacos	Concentração adicionada (µg L ⁻¹)	Concentração determinada (µg L ⁻¹)	Recuperação (%)
1	DIAZ	5,02	5,1 ± 0,4	101 ± 8,2
2	DIAZ + ALP	4,98	4,1 ± 0,1	80 ± 2
3	DIAZ + CLO	4,98	6,9 ± 0,7	138 ± 15
4	DIAZ + LORAZ	4,98	5,8 ± 0,3	116 ± 4
5	DIAZ + BDZs	4,98	6,2 ± 0,8	125 ± 6

As recuperações obtidas para o DIAZ nos diferentes ensaios propostos variaram de 80 a 138%. Para o ensaio n° 2 a recuperação para o DIAZ foi de 80%. Tal resultado está de acordo com a Figura 24, pois a presença do ALP em solução causa uma diminuição da I_p e conseqüentemente da recuperação para o DIAZ. Já a presença do CLO ou do LORAZ em solução provocaram uma recuperação maior do analito. Estes resultados também já eram esperados, uma vez que estes BDZs provocam um aumento da I_p no E_{pico} do DIAZ resultante de picos de redução no mesmo potencial de pico do analito. Além disso, nota-se que a maior recuperação obtida foi para o ensaio 3, onde o mesmo interferente (CLO) provocou um maior aumento de I_p (maior inclinação da curva), observado na Figura 24A. Desta forma, o sinal de pico no E_{pico} do DIAZ pode ter uma contribuição de corrente de outros BDZs como o LORAZ e CLO. A interferência causada pelo LORAZ provavelmente não pode ser eliminada devido às semelhanças das estruturas químicas destes dois fármacos que apresentam picos voltamétricos no mesmo E_{pico} . Entretanto, a recuperação obtida para o DIAZ na presença do LORAZ foi inferior a 120%, permitindo ainda a aceitação dos valores determinados. A baixa interferência causada pelo LORAZ deve-se a sua baixa sensibilidade ao método do DIAZ, que resulta em baixas respostas de corrente. A sensibilidade diminuída para o LORAZ é devido ao fato do pH 6 não ser a condição ideal para essa droga, como mostrado por Ghasemi et al. (2006). A I_p do LORAZ é inversamente proporcional ao aumento do pH do meio, além disso, o E_{ac} ideal para o LORAZ é de -0,2 V, enquanto para o DIAZ é de -0,6 V (GHASEMI;

NIAZI; GHORBANI, 2006). Em resumo, é preciso ter em mente que em uma determinação em amostra real, o sinal analítico obtido na amostra pode ser resultado da redução eletroquímica de uma mistura de DIAZ e LORAZ, com prevalência do sinal referente ao DIAZ.

Por outro lado, a interferência causada pelo CLO, embora seja mais acentuada, pode ser contornada. Primeiramente, pode-se quantificar a I_p no E_{pico} do DIAZ, o qual corresponde a DIAZ + CLO, em seguida realiza-se a quantificação no pico correspondente ao CLO (-0,4 V), determinando sua concentração na amostra. Em seguida, usando a equação linear construída pelo método de adição padrão em uma amostra real, é possível determinar a I_p , referente apenas à concentração do CLO, no E_{pico} de -0,91 V (segundo pico do CLO no E_{pico} do DIAZ). Neste momento, a I_p calculada para o CLO pode ser subtraída do sinal total de DIAZ + CLO (em -0,91 V). Plotando um gráfico de adição de padrão é possível determinar a concentração de DIAZ. Para confirmar esta hipótese, um experimento foi realizado enriquecendo-se uma solução com aproximadamente $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de DIAZ e CLO. Antes de realizar o tratamento proposto, a concentração de “DIAZ” determinada foi de $6,7 \pm 0,8 \mu\text{g L}^{-1}$, resultando em uma recuperação de $134 \pm 16\%$. Este resultado de recuperação é aceitável, no entanto, permanece alto e condizente com os resultados previamente apresentados na Tabela 5, confirmando a interferência causada pelo CLO. A I_p do CLO foi determinada nas condições voltamétricas e de pH do DIAZ em -0,91 V e subtraída da I_p referente à DIAZ + CLO previamente determinada. Uma nova equação de regressão foi encontrada e a concentração do DIAZ foi determinada. Após o tratamento proposto, a concentração determinada foi de $4,4 \pm 0,6 \mu\text{g L}^{-1}$ com recuperação obtida de $98 \pm 13\%$, resultando em uma boa aproximação da concentração de DIAZ na amostra, confirmando a possibilidade de utilização desta técnica em amostras reais.

A presença de matéria orgânica dissolvida no ambiente aquático pode causar considerável interferência sobre sinal analítico de medições voltamétricas em amostras ambientais. Desta forma, ácidos húmicos foram também avaliados como interferentes. O ácido húmico utilizado neste estudo possui cerca de 35% em massa de carbono orgânico dissolvido. É sabido que a concentração de COD em águas superficiais é de aproximadamente 5 mg L^{-1} (CVRKOVIC-KARLOCI et al., 2011; DOS SANTOS; ABATE; MASINI, 2004). Como usualmente 1 ou 2 mL de amostra são adicionados na cela voltamétrica, com volume total de 10 mL, concentrações de até 3 mg L^{-1} de COD foram adicionadas. Como pode ser visto na Figura 25, a adição de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ de COD provocou alterações no voltamograma. É possível observar uma diminuição da I_p , bem como, um deslocamento do E_{pico} para potenciais menos negativos. Este comportamento é um indicativo de interações entre o DIAZ e os ácidos

húmicos que são reconhecidamente interferentes (GALLI; DE SOUZA; MACHADO, 2011; NUNES et al., 2015). As adições consecutivas de COD causaram a diminuição proporcional da I_p até a concentração de 15 mg L^{-1} de COD (2,44 nA). A partir desta concentração do interferente a corrente foi reduzida até 0,2 nA, suprimindo quase que completamente o sinal do DIAZ. Estas concentrações de COD embora possam ocorrer em amostras de águas naturais, não são comuns. Além disso, técnicas de diluição mostraram-se eficientes para contornar o problema (NUNES et al., 2015). No entanto, em muitas situações, a técnica de diluição da amostra pode não ser apropriada, uma vez que os analitos também se apresentam em baixas concentrações e assim, outras aproximações podem ser utilizadas. A extração em fase sólida (SPE), por exemplo, vem sendo amplamente utilizada para extração, pré-concentração e *cleanup* de fármacos em amostras complexas como as ambientais (GHOBADI; YAMINI; EBRAHIMPOUR, 2014; MENDOZA et al., 2014).

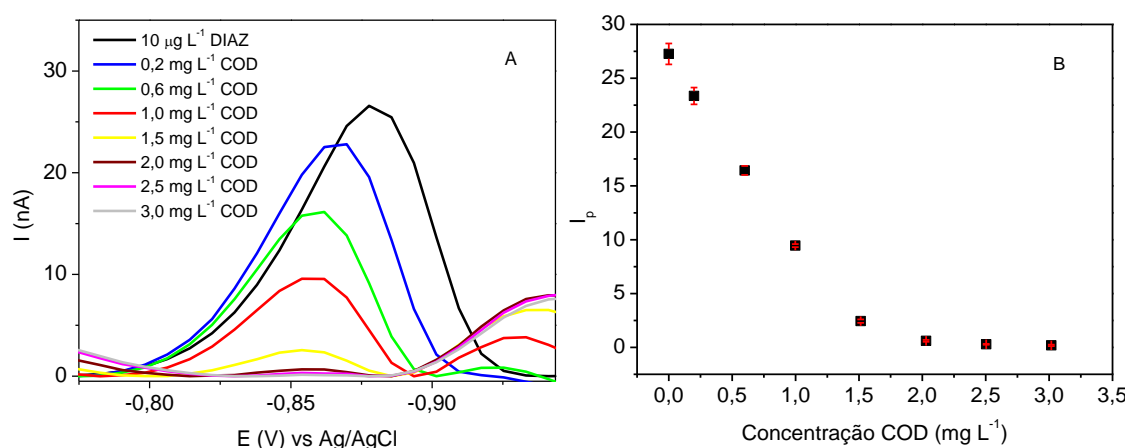


Figura 25. Estudos de interferência de ácidos húmicos sobre o sinal voltamétrico do DIAZ.

Estudos com interferentes metálicos (Zn^{2+} , Cu^{2+} e Fe^{3+}) também foram realizados. Tais íons foram escolhidos por serem frequentemente encontrados em ambientes aquáticos. Na Figura 26A estão apresentados os voltamogramas obtidos na determinação do DIAZ com adições consecutivas de solução de Zn^{2+} . É possível notar que a I_p do fármaco diminuiu com as adições do interferente, entretanto, deslocamentos consideráveis no potencial de pico não foram observados. A interferência causada pelo Zn^{2+} pode ser melhor observada na Figura 26B. É possível notar que a intensidade de corrente de pico do DIAZ caiu de 4,27 para 2,13 nA com adições de Zn^{2+} , uma redução de 50%. Porém, no ambiente, o Zn presente não se encontra totalmente em forma livre, na sua maioria, ele se encontra preferencialmente complexado a compostos orgânicos. Para os íons Cu^{2+} e Fe^{3+} , não foram observadas interferências significativas no sinal de pico do DIAZ e desta forma os voltamogramas destes estudos não foram apresentados. Estudos realizados anteriormente (NUNES et al., 2015) apontaram que esse tipo de interferência pode ser minimizado através da diluição da amostra

sem perda de sensibilidade analítica, pois a técnica usando voltametria com HMDE permite que o analito seja pré-concentrado durante a etapa de deposição. Sendo assim, até mesmo possíveis interferências causadas pelo Zn^{2+} poderão ser minimizadas.

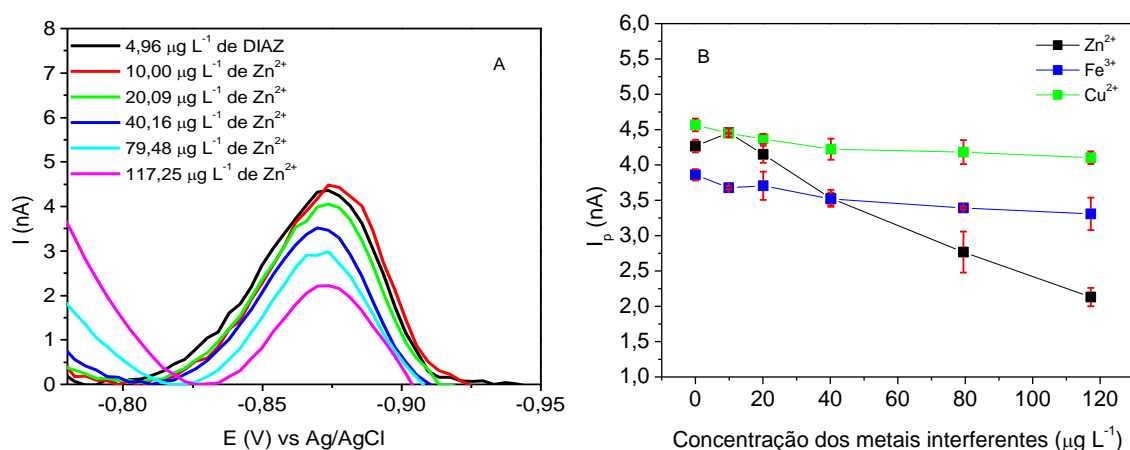


Figura 26. Estudos de seletividade para 4,96 $\mu g L^{-1}$ de DIAZ utilizando VRC PD em meio de eletrólito suporte tampão fosfato pH 6,0. Avaliação de interferentes inorgânicos. (A) Voltamogramas obtidos na determinação do DIAZ com adições consecutivas de solução de zinco na cela voltamétrica. (B) Relação entre I_p e concentração dos íons metálicos interferentes. Parâmetros empregados: E_{ac} , -0,6 V; t_{ac} , 120 s; velocidade de varredura 40 mV s^{-1} ; amplitude de pulso, 100 mV; tempo de pulso, 40 ms.

A linearidade do método foi investigada em uma faixa compreendida entre 0,5 e 95,75 $\mu g L^{-1}$. Foi observado um aumento contínuo da I_p até 66,5 $\mu g L^{-1}$ e uma estagnação da I_p para a concentração de 95,75 $\mu g L^{-1}$ (Figura 27 A e B). O não aumento da I_p para concentrações acima de 66,5 $\mu g L^{-1}$ deve-se provavelmente a saturação da superfície do eletrodo. Após a avaliação da linearidade, um software estatístico foi empregado para confirmar a linearidade e estipular a faixa linear de trabalho que foi de 0,5 a 20,1 $\mu g L^{-1}$ com um coeficiente de correlação linear $r = 0,9996$. Para este intervalo de concentração o F de regressão (F_{reg}) foi de 4148,66 > $F_{crítico}$ (4,23) ($p < 0,05$) e o F de falta de ajuste (F_{faj}) foi de 1,26 < $F_{crítico}$ (2,68) ($p > 0,05$) indicando que o modelo linear se ajustou perfeitamente ao método. A sensibilidade da técnica método é indicada pela inclinação da reta (*slope*), que foi de 1,24 nA e mostra uma resposta proporcional à adição do fármaco.

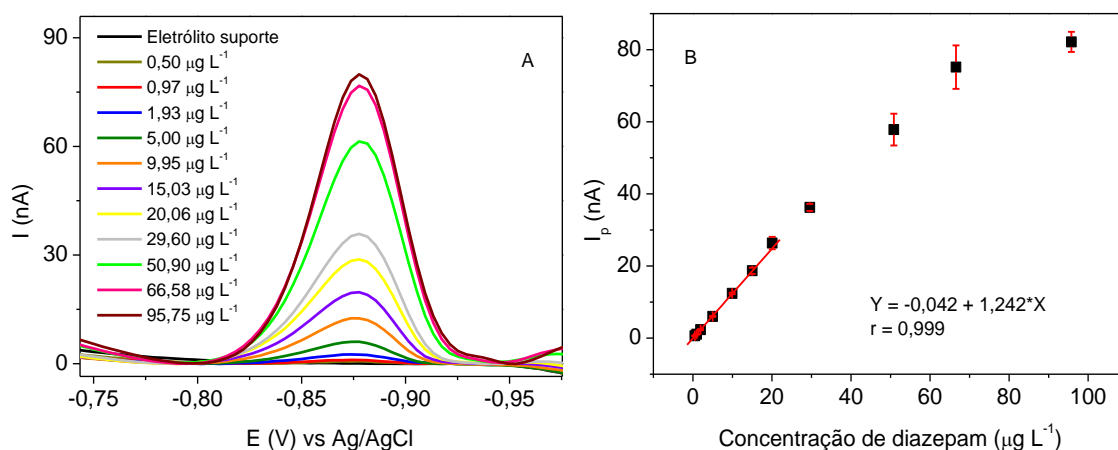


Figura 27. Estudo da linearidade utilizando VRC PD em meio de eletrólito suporte tampão fosfato pH 6,0 (A) Voltamogramas obtidos para a curva de calibração do DIAZ. (B) Curva de calibração do DIAZ. Parâmetros empregados: E_{ac} , -0,6 V; t_{ac} , 120 s; velocidade de varredura 40 $mV s^{-1}$; amplitude de pulso, 100 mV; tempo de pulso, 40 ms.

Os limites de detecção e de quantificação foram calculados conforme as equações 1 e 2 e deste modo a inclinação da curva foi utilizada para a determinação destes parâmetros de validação. Para o DIAZ, o desvio padrão das réplicas do branco foi de 0,034, obtendo-se assim um LD = 0,081 $\mu g L^{-1}$ e LQ = 0,271 $\mu g L^{-1}$ para 120 s de acumulação. Estes valores determinados foram melhores que os obtidos por Nunes et al. (2015) para um método desenvolvido e validado para o ALP.

A utilização de materiais de referência certificado (MRC), estudos de adição e recuperação e comparação entre métodos são formas de avaliar a exatidão de um método (ANVISA, 2003; AOAC, 2002). No presente trabalho, devido à ausência de um MRC e um método devidamente validado para comparação, estudos de adição e recuperação em água ultrapura e em água natural enriquecida com o padrão do fármaco em níveis altos e baixos de concentração foram realizados. O método de adição padrão foi empregado nas determinações devido à complexidade da matriz de estudo. A Tabela 6 traz os estudos realizados e seus resultados.

Tabela 6. Estudos de adição e recuperação em água ultrapura e águas naturais para o DIAZ.

Amostra	Concentração adicionada ($\mu g L^{-1}$)	Concentração determinada ($\mu g L^{-1}$)	Recuperação (%)
Água ultrapura	2,5	2,48 \pm 0,03	99 \pm 1
	5,0	5,1 \pm 0,4	102 \pm 8
	7,5	8,1 \pm 0,5	108 \pm 7
Água natural (amostra 4)	2,5	2,1 \pm 0,3	84 \pm 12
	7,5	7,0 \pm 0,4	93 \pm 5
Água natural (amostra 5)	2,5	1,8 \pm 0,1	72 \pm 4
	7,5	6,2 \pm 0,5	83 \pm 7

Pode-se notar na Tabela 6 que as recuperações obtidas foram próximas a 100% em especial nos ensaios com água ultrapura. Já para os estudos com água superficial enriquecida com o padrão do fármaco, recuperações mais baixas foram alcançadas. Para a amostra 4, água da nascente coletada no bairro Batel, as recuperações foram superiores a 80%, limite considerado adequado devido a concentração do analito e a complexidade da matriz (ANVISA, 2003). No entanto, para a amostra 5, água coletada no rio Carro Quebrado na vila Carli em Guarapuava, enriquecida com 2,5 $\mu g L^{-1}$ de DIAZ a recuperação obtida para 2,5 $\mu g L^{-1}$ foi um pouco inferior ao valor desejável, provavelmente devido à presença de interferentes como matéria orgânica dissolvida e íons metálicos. Este rio cruza o município de Guarapuava

e está sujeito a toda contaminação do perímetro urbano. Para a concentração de $7,5 \mu\text{g L}^{-1}$, uma recuperação adequada foi alcançada.

Os estudos de precisão de um método avaliam a proximidade dos valores determinados em uma série de medidas de uma dada amostra. A precisão pode ser avaliada em três níveis: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade. A repetitividade avalia a proximidade dos valores obtidos em um mesmo dia, a precisão intermediária em diferentes dias consecutivos, equipamentos diferentes ou analistas diferentes, já a reprodutibilidade deve ser avaliada inter-laboratorialmente (ANVISA, 2003). Os dados apresentados na Tabela 7 apontam para uma precisão do método desenvolvido. Nota-se na Tabela 7 que o desvio padrão relativo (RSD) para a repetitividade e para a precisão intermediária foi menor que 15%, limite máximo permitido para esta concentração, implicando em uma boa precisão para o método (ANVISA, 2003).

Tabela 7. Estudos de precisão para o DIAZ.

Precisão	Recuperação (%)	RSD (%)
Repetitividade	104 ± 10	9,9
Precisão intermediária	102 ± 6	6,3

5.2.2 Clonazepam

Otimização da metodologia

Para o desenvolvimento da metodologia analítica para o CLO os mesmos parâmetros voltamétricos avaliados para o DIAZ foram otimizados. A definição da melhor condição de trabalho levou em consideração a intensidade de corrente de pico e a resolução do sinal voltamétrico, bem como a corrente de fundo no potencial de interesse.

Os parâmetros que mais foram significativos para o sinal voltamétrico do CLO foram o pH do eletrólito suporte e o potencial de acumulação. O pH foi variado em uma faixa de 5,0 a 8,1, entretanto, em condições ácidas e neutras do eletrólito este fármaco não apresentou uma boa resposta voltamétrica Figura 28. É possível notar na Figura 28A, a presença de um pico voltamétrico, referente ao grupo eletroativo NO_2 (primeiro pico voltamétrico do fármaco). Percebe-se ainda, um deslocamento do potencial de pico do fármaco, bem como fica clara a dependência de I_p em relação ao pH da solução. De forma geral, avaliando o comportamento do gráfico (Figura 28B), nota-se um aumento de I_p com o aumento do pH. O pH 8 foi escolhido para os próximos estudos com o CLO por apresentar uma ótima resposta voltamétrica sem trabalhar em condições extremas de alcalinidade do meio.

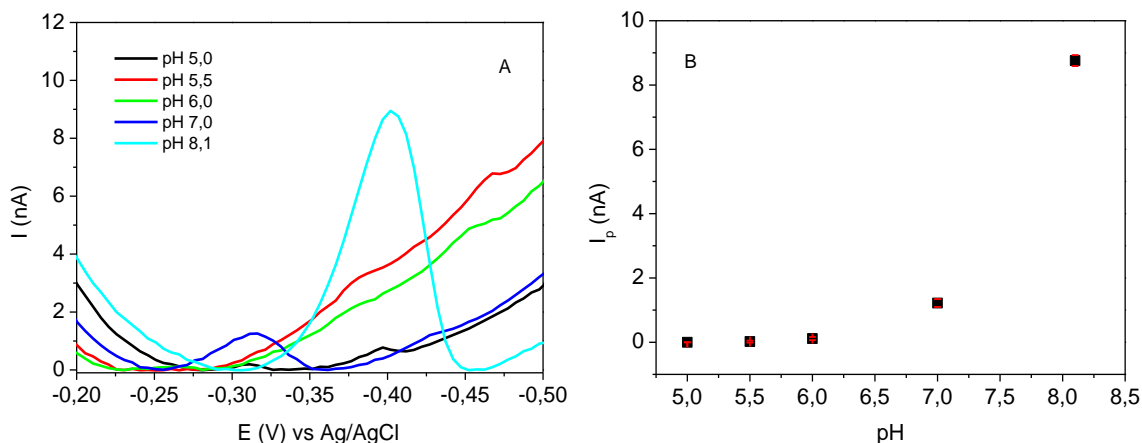


Figura 28. Estudo do pH utilizando VRC PD em meio de eletrólito suporte tampão fosfato. (A) Voltamogramas obtidos na determinação de $9,98 \mu\text{g L}^{-1}$ de CLO. (B) Relação entre a intensidade de corrente de pico (I_p) e o pH da solução. Parâmetros empregados: E_{ac} , -0,3 V; t_{ac} , 120 s; velocidade de varredura 25 mV s^{-1} ; amplitude de pulso, 80 mV; tempo de pulso, 40 ms.

O potencial de acumulação para o CLO foi estudado em uma faixa compreendida entre -1,0 e 0,0 V. Para os potenciais de -1,0 a -0,5 V o sinal voltamétrico do fármaco foi praticamente 0, tendo um leve aumento para o potencial de -0,4 V. Na Figura 29A, pode-se perceber que o E_{ac} de -0,3 V proporcionou a resposta de corrente mais expressiva. Na Figura 29B o comportamento do sinal de pico em função do E_{ac} aplicado fica evidente. Um crescimento do I_p até o valor máximo de $5,8 \pm 0,2 \text{ nA}$, com $E_{ac} = -0,3 \text{ V}$, seguido por um decréscimo da resposta voltamétrica pode ser observado. Como a maior I_p , bem como a adequada resolução do pico voltamétrico foi para -0,3 V de E_{ac} , esta condição foi escolhida como ideal para as determinações do fármaco, diferentemente ao E_{ac} escolhido para o DIAZ (-0,6V) e ALP (-0,8 V)(NUNES et al., 2015).

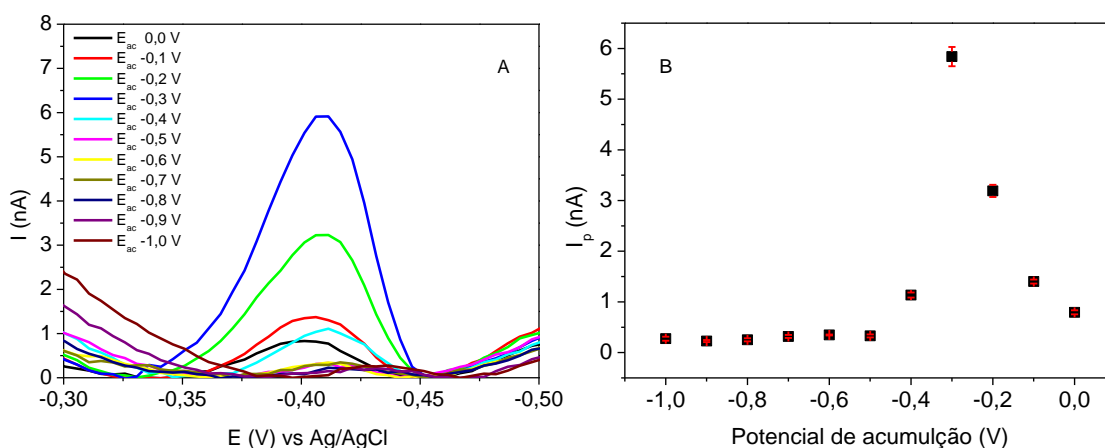


Figura 29. Estudo do potencial de acumulação utilizando VRC PD em meio de eletrólito suporte tampão fosfato pH 8,0. (A) Voltamogramas obtidos na determinação de $9,98 \mu\text{g L}^{-1}$ de CLO. (B) Relação entre a intensidade de corrente de pico (I_p) e o E_{ac} empregado. Parâmetros empregados: t_{ac} , 120 s; velocidade de varredura 25 mV s^{-1} ; amplitude de pulso, 80 mV; tempo de pulso, 40 ms.

O tempo de acumulação (t_{ac}) foi variado de 0 a 280 s para uma solução contendo $9,98 \mu\text{g L}^{-1}$ de CLO. Este estudo foi realizado com o objetivo de aprimorar o tempo de análise sem

prejudicar a intensidade do sinal voltamétrico. Geralmente, concentrações mais baixas do analito demandam maiores t_{ac} . Para o t_{ac} de 0 s não é possível notar a presença do sinal voltamétrico resultante da reação de redução eletroquímica do CLO (Figura 30A). A partir de 20 s de t_{ac} , observa-se um aumento de I_p até 140 s de acumulação, este aumento foi de cerca de 3 vezes a I_p inicial em 20 s. Após 140 s de acumulação, é observado um decréscimo de I_p , provavelmente devido a saturação do eletrodo de trabalho. Nota-se ainda na Figura 30A, que a modificação do t_{ac} empregado proporciona deslocamentos no E_{pico} do fármaco. Como tempos de acumulação muito longos não são desejáveis, por aumentar o tempo de análise e diminuir assim a frequência analítica, 120 s de t_{ac} foi empregado nos próximos estudos para concentração próxima a $10 \mu\text{g L}^{-1}$. O tempo de acumulação pode ser variado dependendo da concentração do analito.

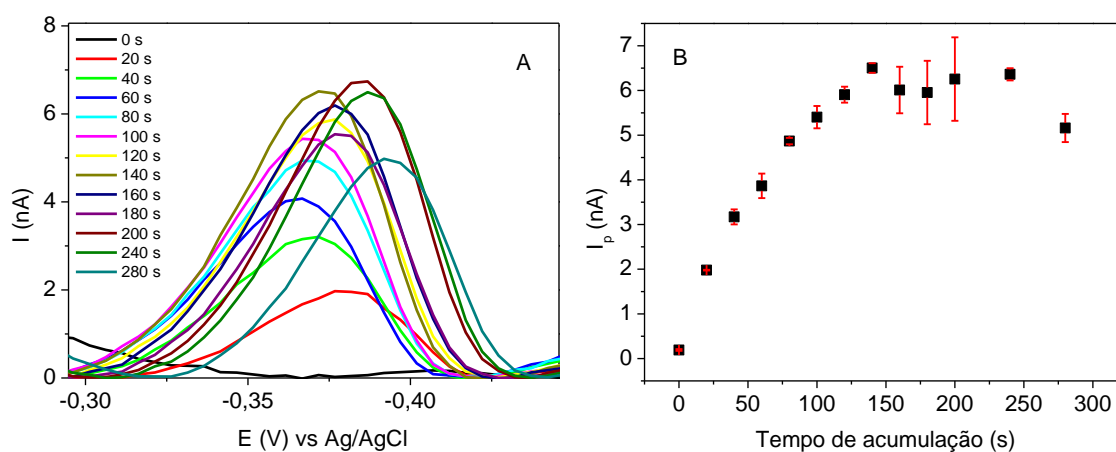


Figura 30. Estudo do tempo de acumulação utilizando VRC PD em meio de eletrólito suporte tampão fosfato pH 8,0. (A) Voltamogramas obtidos na determinação de $9,98 \mu\text{g L}^{-1}$ de CLO. (B) Relação entre a intensidade de corrente de pico (I_p) e o t_{ac} empregado. Parâmetros empregados: E_{ac} , -0,3 V; velocidade de varredura 25 mV s^{-1} ; amplitude de pulso, 80 mV; tempo de pulso, 40 ms.

Os incrementos de pulso foram responsáveis por melhorias nos LD e LQ das técnicas voltamétricas. A amplitude de pulso para o método do CLO foi variada de 20 a 120 mV. O aumento da amplitude de pulso provocou um deslocamento do E_{pico} do fármaco para potenciais mais positivos (Figura 31A). Tal variação não teve grande importância na determinação da condição ótima para este parâmetro, pois a corrente de fundo é bem baixa e outros eventos eletroquímicos próximos não são observados. Além disso, nota-se que a resposta de I_p também foi variada com a alteração deste parâmetro. A amplitude de pulso de 80 mV mostrou-se ideal. Elevada intensidade e ótima resolução do pico voltamétrico culminaram para a escolha deste parâmetro como ideal para o CLO.

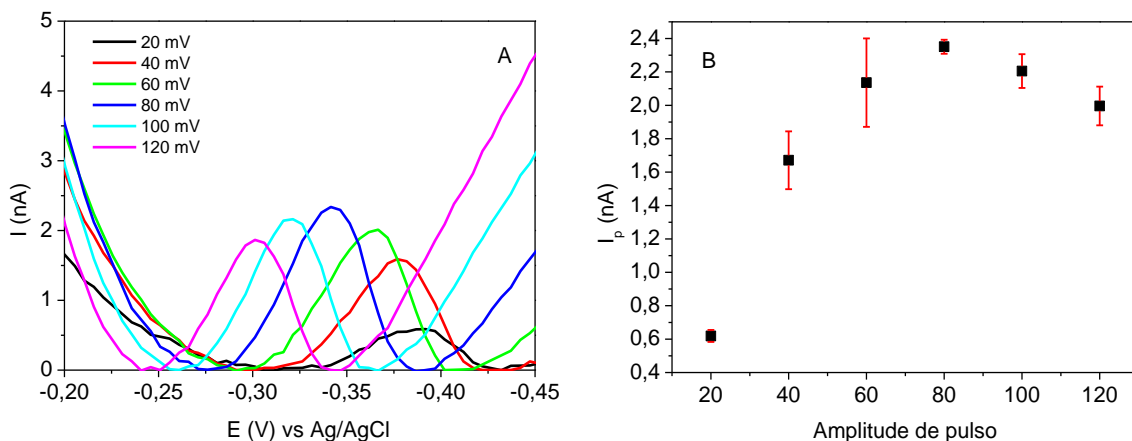


Figura 31. Estudo da amplitude de pulso utilizando VRC PD em meio de eletrólito suporte tampão fosfato pH 8,0. (A) Voltamogramas obtidos na determinação de $9,98 \mu\text{g L}^{-1}$ de CLO. (B) Relação entre a intensidade de corrente de pico (I_p) e a amplitude de pulso. Parâmetros empregados: E_{ac} , -0,3 V; velocidade de varredura 25 mV s^{-1} ; t_{ac} 120 s; tempo de pulso, 40 ms.

O tempo de pulso aplicado também foi estudado em um intervalo entre 20 e 140 ms. Foi observado que o aumento deste parâmetro proporcionou um deslocamento do potencial de pico do fármaco para potências levemente mais anódicos (Figura 32A). Além disso, pode-se notar que a I_p diminuiu para tempos mais elevados. Na Figura 32B, este comportamento fica mais claro. Como intensidade mais elevada do sinal voltamétrico foi observada para 20 ms, e sob estas condições uma boa resolução voltamétrica foi obtida, escolheu-se 20 ms como melhor tempo de pulso.

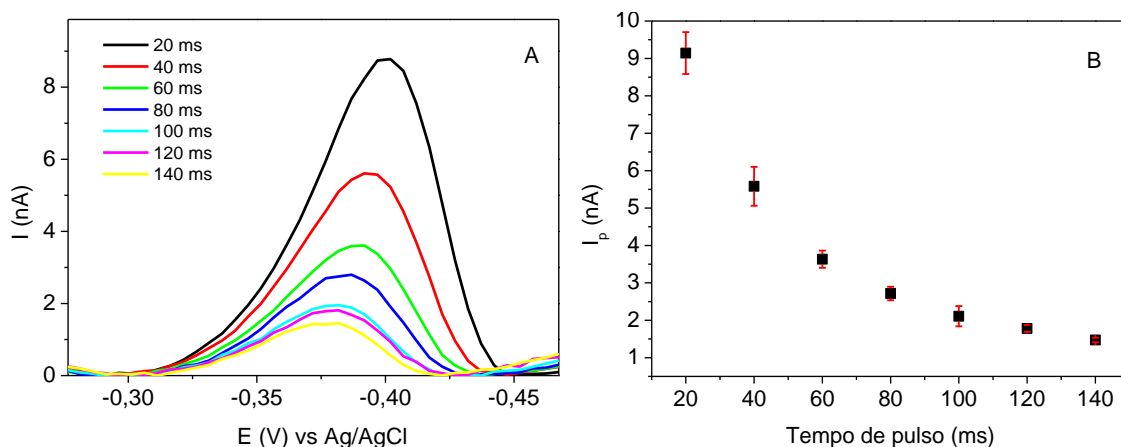


Figura 32. Estudo do tempo de pulso utilizando VRC PD em meio de eletrólito suporte tampão fosfato pH 8,0. (A) Voltamogramas obtidos na determinação de $9,98 \mu\text{g L}^{-1}$ de CLO. (B) Relação entre a intensidade de corrente de pico (I_p) e o tempo de pulso. Parâmetros empregados: E_{ac} , -0,3 V; velocidade de varredura 25 mV s^{-1} ; t_{ac} 120 s; amplitude de pulso, 80 mV.

A velocidade de varredura de potencial foi estudada para obter um escaneamento de potencial rápido, porém com adequada resolução voltamétrica. A velocidade de varredura foi variada de 15 a 50 mV s^{-1} . Foi observado um crescimento proporcional da I_p em função do aumento da velocidade de varredura (Figura 33A). Ainda nesta figura, é possível notar um deslocamento do E_{pico} do fármaco para potenciais mais catódicos com o aumento da vv, bem

como uma diminuição da resolução dos voltamogramas. O aumento da v_v proporcionou um aumento linear da I_p do CLO, entretanto, picos assimétricos e irregulares não são desejados. A resolução não adequada do pico voltamétrico pode causar erros na amostragem de corrente do pico e assim interferir nos cálculos da concentração do analito em determinada amostra. Sendo assim, escolheu-se 25 mV s^{-1} como condição ideal para este parâmetro.

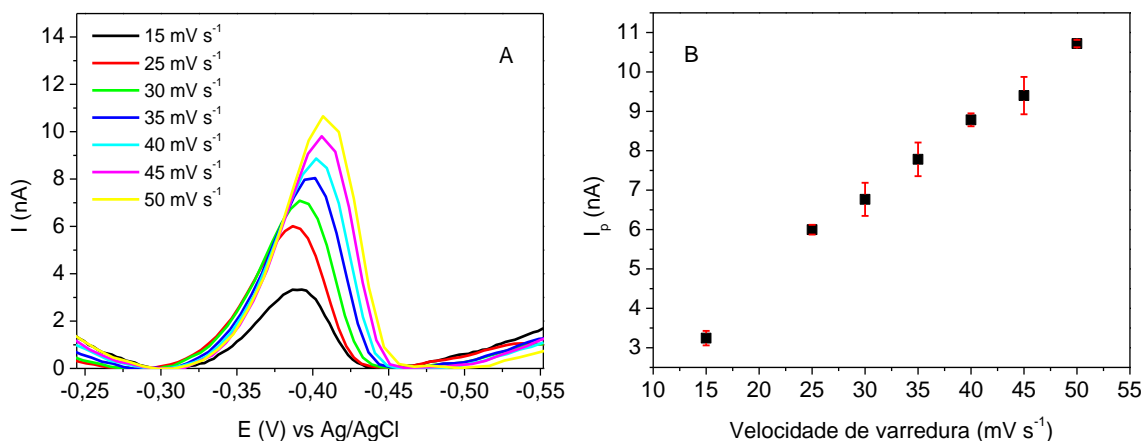


Figura 33. Estudo da velocidade de varredura utilizando VRC PD em meio de eletrólito suporte tampão fosfato pH 8,0. (A) Voltamogramas obtidos na determinação de $9,98 \mu\text{g L}^{-1}$ de CLO. (B) Relação entre a intensidade de corrente de pico (I_p) e a velocidade de varredura. Parâmetros empregados: E_{ac} , -0,3 V; t_{ac} 120 s; amplitude de pulso, 80 mV; tempo de pulso, 40 ms.

Os parâmetros otimizados para o CLO estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Parâmetros analíticos otimizados para a determinação do CLO.

Parâmetro	Condição
Potencial de acumulação	-0,3 V
Tempo de acumulação	120 s
Velocidade de varredura	25 mV s^{-1}
pH	8,0
Amplitude de pulso	80 mV
Tempo de pulso	20 ms
Tempo de purga	10 min
Tempo de equilíbrio	5 s

O parâmetro voltamétrico para o CLO que mais destoa dos outros BDZs foi o potencial de acumulação que para a maioria são empregados E_{ac} próximos a -0,8 V (DE CARVALHO et al., 2010; NUNES et al., 2015), exceto para o bromazepam que tem como condição ótima -0,4 V (HERNANDEZ et al., 1987). Este fato deve-se provavelmente aos diferentes sítios ativos referentes a redução destes fármacos na superfície eletrolítica.

Validação da metodologia

A validação do método foi conduzida através da análise de vários parâmetros de validação. Primeiramente se estudou a seletividade, para avaliar possíveis interferentes. Tal estudo não é frequentemente empregado em desenvolvimento e validação de metodologias voltamétricas, provavelmente, devido à falta de seletividade inerente a técnica. Porém atualmente eletrodos têm sido produzidos de forma a serem mais seletivos, como eletrodos impressos modificados (COUTO; LIMA; QUINAZ, 2016; MOHAMED, 2016; TROJANOWICZ, 2016). Para avaliar a seletividade, estudos com outros BDZs, ácidos húmicos e íons metálicos foram feitos. Os BDZs ALP, DIAZ e LORAZ foram utilizados. A Figura 34 apresenta os resultados obtidos nos estudos de interferência. Pode-se perceber que outros fármacos BDZs não alteraram a intensidade de corrente de pico do CLO de maneira significativa, mesmo utilizando concentrações até quatro vezes mais altas que a do fármaco ($5 \mu\text{g L}^{-1}$) (Figura 34A). Desta forma, pode-se concluir que outros fármacos da classe não exerceram quaisquer interferências sobre o CLO. Deste modo fármacos de outras classes, como analgésicos e anti-inflamatórios não foram avaliados neste estudo. Como o propósito do trabalho é empregar a metodologia desenvolvida em amostras ambientais, estudos de interferência foram realizados também com os íons metálicos Cu^{2+} , Fe^{3+} e Zn^{2+} , os quais podem ser encontrados em ambientes aquáticos. A Figura 34B apresenta os resultados de adições de interferentes que chegam até a $120 \mu\text{g L}^{-1}$ (24 vezes maior que a concentração do analito). Os íons metálicos Fe^{3+} e Zn^{2+} , podem ser possíveis interferentes nas análises voltamétricas, pois a diminuição do sinal analítico é notável. Estas interferências possivelmente são causadas por modificações do comportamento eletroquímico do analito próximo ao eletrodo de trabalho. Os voltamogramas apresentados nas Figura 34 A e B deixam clara a interferência sobre o CLO, uma vez que a diminuição da I_p e deslocamento do potencial de pico para potenciais menos negativos podem ser observados. Entretanto, assim como foi discutido para o DIAZ, estes íons provavelmente não estão livres no ambiente aquático e sim complexados com a matéria orgânica. Além disso pode ser realizada a diluição da amostra para minimizar as interferências intrínsecas de cada matriz ambiental (NUNES et al., 2015). Os voltamogramas obtidos para avaliar a interferência do Cu^{2+} não foram apresentados em razão de não terem sido observadas interferências causadas por este íon.

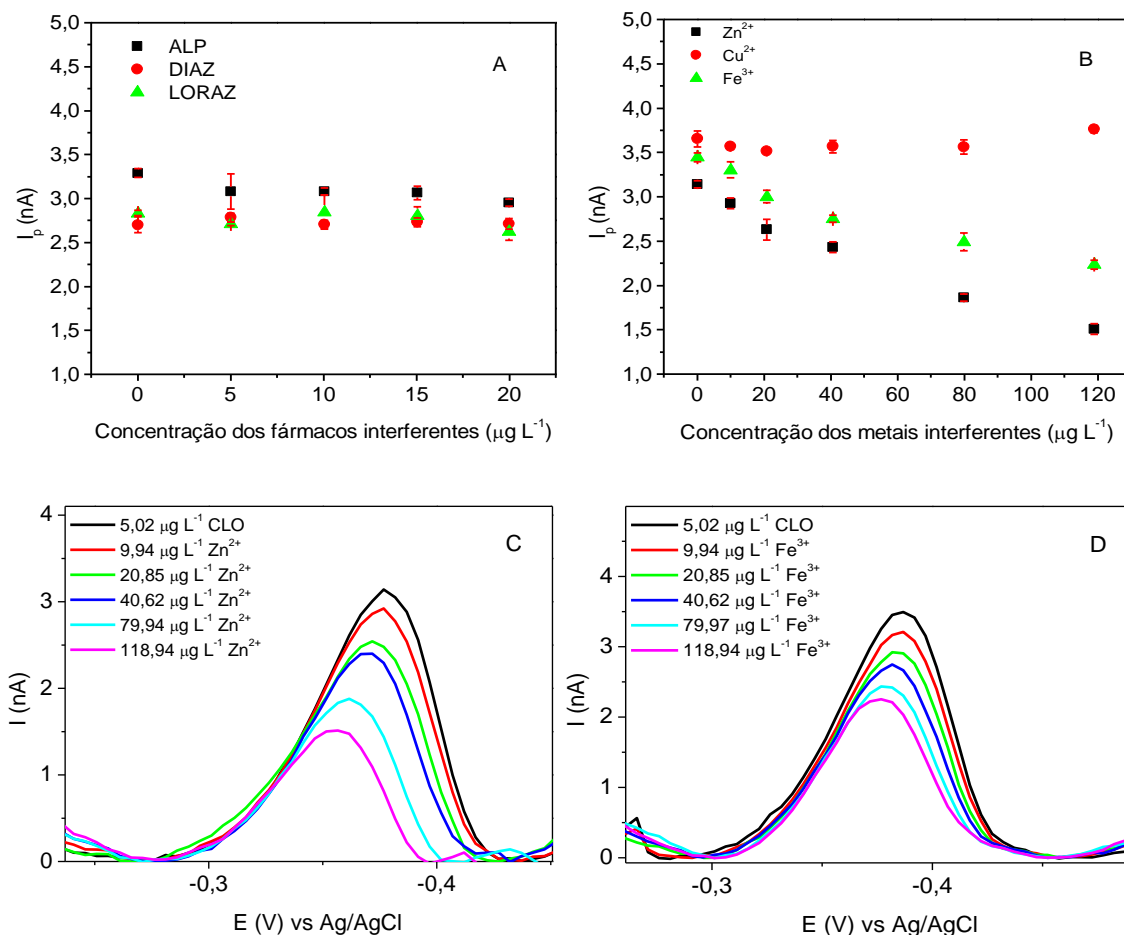


Figura 34. Estudos de seletividade para 5,02 µg L⁻¹ de CLO utilizando VRC PD em meio de eletrólito suporte tampão fosfato pH 8,0. (A) Relação entre I_p e concentração dos fármacos interferentes. (B) Relação entre I_p e concentração dos íons metálicos interferentes. (C) Voltamogramas obtidos na avaliação da interferência causada pelo Zn²⁺. (D) Voltamogramas obtidos na avaliação da interferência causada pelo Fe³⁺. Parâmetros empregados: E_{ac} , -0,3 V; t_{ac} 120 s; amplitude de pulso, 80 mV; tempo de pulso, 40 ms; vv, 25 mV s⁻¹.

A interferência causada pela presença de matéria orgânica dissolvida sobre o sinal voltamétrico do CLO também foi avaliada para 10 µg L⁻¹ de CLO em cela voltamétrica. Concentrações de até 3,0 mg L⁻¹ de COD (35% em ácido húmico) foram adicionados na cela. Pode-se notar na Figura 35 A e B que a adição de COD provocou a redução da I_p do fármaco. Nas concentrações mais altas o pico voltamétrico foi suprimido completamente, mostrando alta interferência causada pela matéria orgânica. Desta forma, amostras com concentrações de COD superiores a média podem ser mais difíceis de serem analisadas. Diluições e procedimentos de *cleanup* poderiam ser empregados nestas amostras.

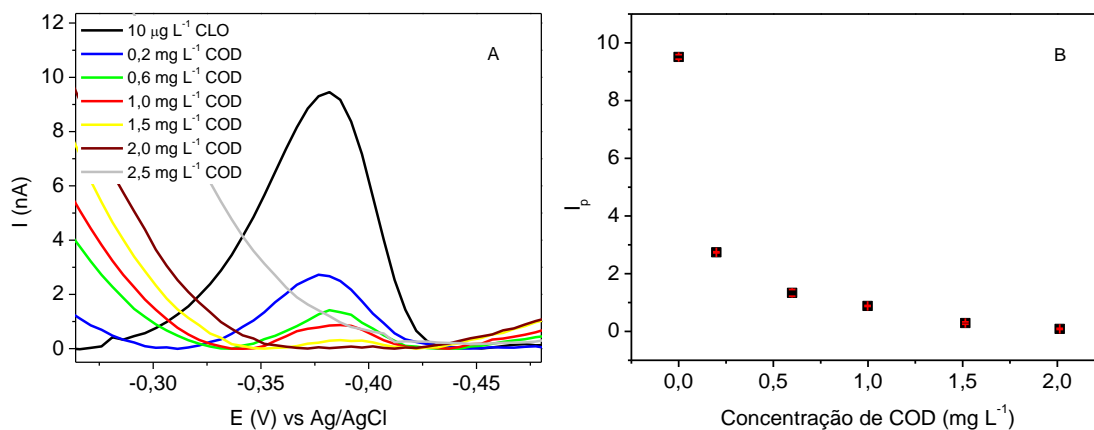


Figura 35. Estudos de interferência de ácidos húmicos sobre o sinal voltamétrico de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de DIAZ.

A avaliação da linearidade do método consistiu na construção de uma curva de calibração em um intervalo de concentração compreendido entre $0,49$ a $96,12 \mu\text{g L}^{-1}$ de CLO empregando 120 s de acumulação (Figura 36). Com a avaliação estatística da linearidade, a faixa linear de trabalho ficou compreendida no intervalo de $0,49$ a $15,09 \mu\text{g L}^{-1}$ de CLO, empregando 120 s de tempo de acumulação. Para esta faixa de concentração a regressão foi significativa ($p < 0,05$) e o modelo linear se ajustou perfeitamente ($p > 0,05$). A equação da reta obtida foi $Y = 0,143 + 1,027 * X$ com $r = 0,999$, mostrando uma adequada sensibilidade para o método desenvolvido. A avaliação da linearidade garante a confiabilidade nas determinações realizadas dentro da faixa linear de trabalho.

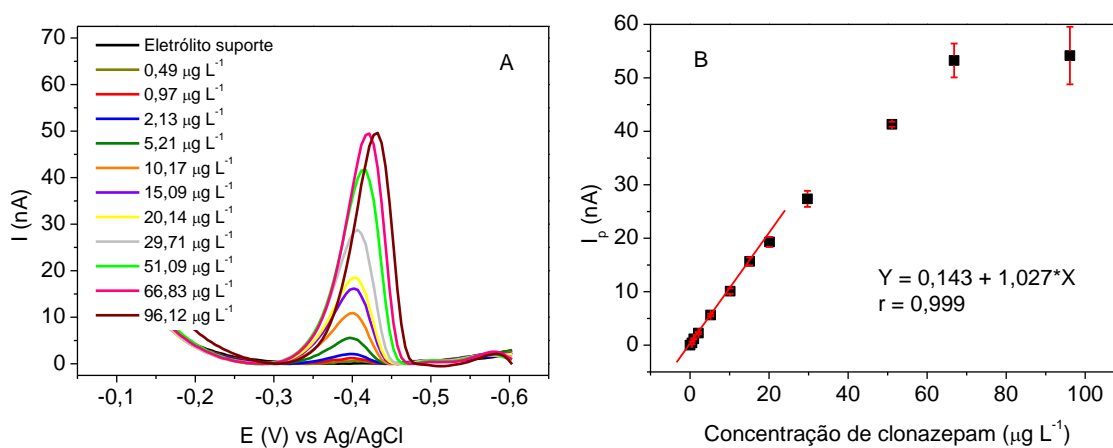


Figura 36. Estudo da linearidade utilizando VRC PD em meio de eletrólito suporte tampão fosfato pH 8,0 (A) Voltamogramas obtidos para a curva de calibração do CLO. (B) Curva de calibração do CLO. Parâmetros empregados: E_{ac} , $-0,3 \text{ V}$; t_{ac} , 120 s; velocidade de varredura 25 mV s^{-1} ; amplitude de pulso, 80 mV; tempo de pulso, 20 ms.

Os limites de detecção e de quantificação foram calculados utilizando as equações 1 e 2. Sendo assim, a inclinação da curva foi utilizada para a determinação destes parâmetros de validação. O desvio padrão das réplicas do branco no potencial de pico do CLO foi de 0,066, obtendo-se $LD = 0,194 \mu\text{g L}^{-1}$ e $LQ = 0,646 \mu\text{g L}^{-1}$, valores considerados adequados para a concentração estudada (ANVISA, 2003). Como o LQ teórico obtido foi de $0,646 \mu\text{g L}^{-1}$ para

120 s de acumulação, mais alto que o primeiro ponto testado para a linearidade, a faixa linear de trabalho adequada para o CLO fica restrita ao intervalo compreendido entre o LQ e 96,12 $\mu\text{g L}^{-1}$ para este tempo de acumulação. A exatidão do método desenvolvido foi avaliada com ensaios de adição e recuperação. Este estudo, por vez, visa avaliar a proximidade dos valores determinados em relação ao valor verdadeiro (ANVISA, 2003). Soluções aquosas contendo 2,5; 5,0 e 7,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de CLO e amostras de águas naturais enriquecidas com 2,5 e 7,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de CLO foram utilizadas nestes estudos. Os estudos de exatidão realizados estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Estudos de adição e recuperação em água ultrapura e águas naturais para o CLO.

Amostra	Concentração adicionada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentração determinada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)
Água ultrapura	2,5	$2,9 \pm 0,2$	116 ± 7
	5,0	$4,4 \pm 0,3$	87 ± 6
	7,5	9 ± 1	120 ± 13
Água natural	2,5	$2,4 \pm 0,4$	96 ± 16
	7,5	$8,02 \pm 0,09$	107 ± 1

Como pode ser visto na Tabela 9, em todas as concentrações estudadas as recuperações foram consideradas aceitáveis para a faixa avaliada (ANVISA, 2003; AOAC, 2002). Mesmo as determinações realizadas em amostras naturais fortificadas com o analito resultaram em boas recuperações, comprovando a exatidão e a aplicabilidade do método para amostras aquosas sintéticas e naturais.

Para avaliar a precisão do método desenvolvido, uma concentração localizada no meio da curva analítica foi escolhida (7,5 $\mu\text{g L}^{-1}$). Dois níveis de precisão foram analisados: a repetitividade e a precisão intermediária. Os resultados destes estudos encontram-se apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Estudos de precisão para o CLO.

Precisão	Recuperação (%)	RSD (%)
Repetitividade	87 ± 11	13,02
Precisão intermediária	97 ± 13	13,75

Os estudos de repetitividade e precisão intermediária apresentados na Tabela 10, resultaram em RSD menores que 15%, apontando para uma adequada precisão do método

analítico desenvolvido. Valores inferiores a 15%, ou até pouco a cima deste, são tidos como adequados para compostos orgânicos pela maioria dos guias de validação, considerando a faixa de concentração do analito empregada no estudo em questão (ANVISA, 2003; AOAC, 2002; APVMA, 2004).

Vários parâmetros de validação foram avaliados para ambos os métodos e baixos LQ de quantificação foram obtidos, assim como exatidão e precisão em determinações para cada um dos fármacos. Os ensaios foram feitos com cada analito na ausência de outros BDZs e falta de seletividade foi observada para o DIAZ. No entanto, os métodos mostraram-se adequados para a determinação do K_d (sedimento/água) e avaliação da distribuição destes BDZs em amostras reais.

5.3 Extração e determinação de BDZs em sedimentos

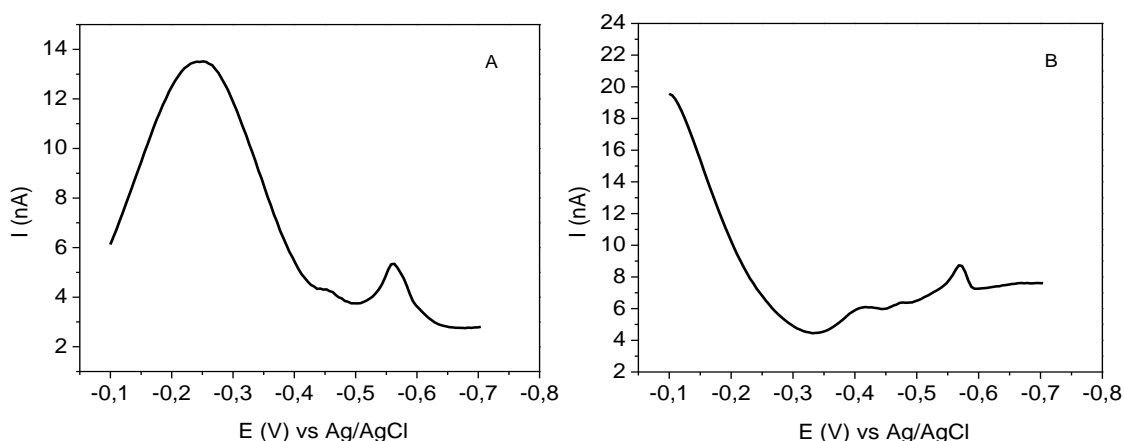
Para os ensaios de extração dos BDZs, um sedimento de nascente (amostra número 1) foi empregado como modelo por ser isento de contaminação por BDZs. O sedimento modelo foi caracterizado quanto a sua granulometria e apresentou proporções de areia, silte e argila de 43,4; 5,4 e 51,2%, respectivamente. Sabe-se que a argila pode ser um poderoso adsorvente, sendo assim, as características do sedimento poderão influenciar a força de adsorção dos BDZs nesta matriz e conseqüentemente na extração dos BDZs (DUARTE-NETO et al., 2014).

O processo de extração dos fármacos (CLO, ALP e DIAZ) de sedimentos enriquecidos foi otimizado por meio de planejamentos fatoriais e ensaios univariados. Estas duas abordagens foram utilizadas devido ao grande número de fatores a serem avaliados e por estudos univariados terem se mostrado mais interessantes para a avaliação dos solventes extratores, uma vez que onze diferentes solventes foram testados até a determinação da melhor fase extratora.

O solvente extrator escolhido para os primeiros testes qualitativos foi o metanol, uma vez que este solvente é frequentemente utilizado em extrações de fármacos de sedimentos (DA SILVA et al., 2011; ZHOU; BROODBANK, 2014). 1 g de sedimento enriquecido com $0,4 \mu\text{g g}^{-1}$ de cada fármaco foi extraído com 5 mL de solvente após 30 minutos de repouso da dopagem. Testes foram realizados utilizando metanol puro e uma mistura de metanol/água (1:1). As determinações dos fármacos foram realizadas com as condições otimizadas para cada droga. O método para a determinação do ALP foi otimizado em trabalho anterior (NUNES et al., 2015). Os voltamogramas resultantes destes primeiros testes podem ser vistos na Figura 37. Pode-se notar nos voltamogramas das Figuras A, C e E, extraídos com metanol (100%), que elevada interferência está presente, ou que a extração não foi eficiente, uma vez que os sinais analíticos dos BDZs não podem ser adequadamente identificados. Na Figura

37A, possivelmente o pico em aproximadamente -0,45 V é referente ao CLO, sendo assim, um deslocamento do E_{pico} pode ser observado, já que usualmente este é de -0,4 V aproximadamente. Esse deslocamento pode ser devido a efeito de matriz. Para a Figura 37C, um pico em aproximadamente -0,9 V pode ser visto, sendo este o potencial de pico aproximado do DIAZ. Entretanto neste voltamograma, as condições de análise do ALP foram empregadas (E_{ac} , -0,8 V; vv, 25 $mV s^{-1}$; amplitude de pulso, 80 mV; tempo de pulso, 40 ms; pH 7,0) (NUNES et al., 2015). Na Figura 37E nenhum pico voltamétrico está presente. As condições utilizadas para a obtenção deste voltamograma foram as otimizadas para o método do DIAZ. Por outro lado, nas Figuras B, D e F, voltamogramas obtidos com os extratos utilizando metanol/água (1:1), foi possível observar os picos voltamétricos para os três BDZs. Na Figura 37B, o pico em -0,4 V é característico do CLO, confirmando a extração deste BDZ do sedimento. Na Figura 37D, nota-se três picos voltamétricos, sendo o primeiro referente ao ALP (-0,89 V) e o segundo ao DIAZ (-0,95 V), o terceiro pico não foi identificado, sendo possivelmente algum componente extraído ou do próprio eletrólito suporte. Este voltamograma foi obtido com as condições otimizadas para o ALP, no entanto, é possível detectar o DIAZ nas mesmas condições. Na Figura 37F, novamente é possível identificar os picos do ALP e do DIAZ, em -0,85 e -0,92 V respectivamente. Para a obtenção deste voltamograma, as condições otimizadas para o DIAZ foram utilizadas.

De modo geral, a extração com metanol puro não foi eficiente, pois os picos voltamétricos dos BDZs não puderam ser satisfatoriamente identificados e quantificados em termos de I_p . Por outro lado, a extração realizada com metanol/água (1:1) resultou em adequados picos voltamétricos para os BDZs estudados. Sendo assim, este solvente extrator foi utilizado nos estudos seguintes, até a avaliação de outros solventes de extração.



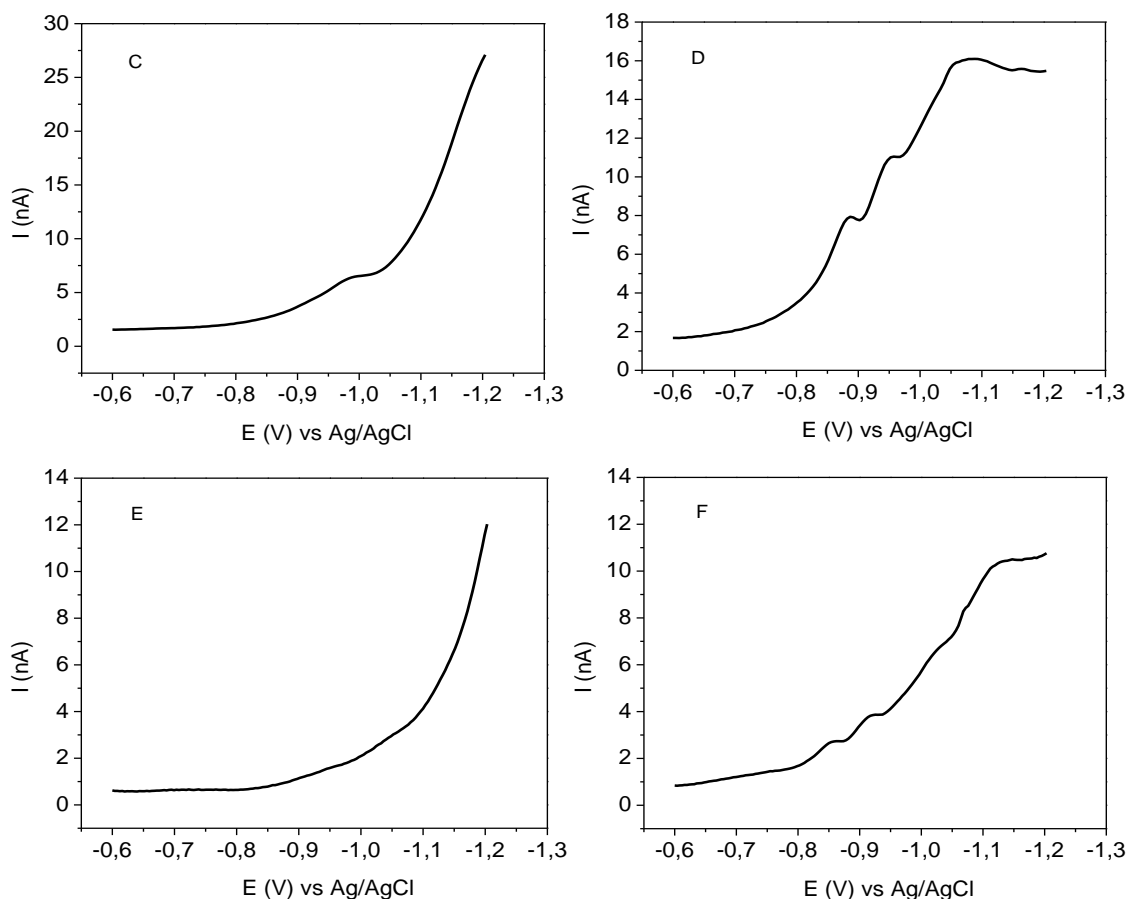


Figura 37. Voltamogramas sem tratamento de linha base obtidos na avaliação do metanol como solvente extrator. (A) Determinação do CLO em extrato obtido com metanol 100%. (B) Determinação do CLO em extrato obtido com metanol/água (1:1). (C) Determinação do ALP em extrato obtido com metanol 100%. (D) Determinação do ALP em extrato obtido com metanol/água (1:1). (E) Determinação do DIAZ em extrato obtido com metanol 100%. (F) Determinação do DIAZ em extrato obtido com metanol/água (1:1). As condições experimentais otimizadas para cada BDZ foram empregadas neste estudo.

Estudos prévios com sedimentos foram realizados empregando-se um planejamento fatorial 2^3 para avaliar a extração sólido-líquido de BDZs nesta matriz ambiental. Para esta primeira rodada de experimentos, os sedimentos foram enriquecidos com $1 \mu\text{g g}^{-1}$ dos padrões dos fármacos isoladamente e após 30 minutos iniciou-se a extração com uma solução metanol/água 1:1. Os fatores volume do solvente, forma de agitação para extração e tempo de agitação para extração foram avaliados em um nível superior, inferior e também em um ponto central (o ponto central foi analisado em duplicata). O volume do solvente extrator foi avaliado em uma condição superior (9 mL) e inferior (3 mL) visando reduzir o volume utilizado. Uma das formas de extração avaliada foi o banho ultrassônico, este é amplamente empregado em extrações de fármacos e íons metálicos em sedimentos, sua utilização deve-se ao fato de ele proporcionar uma extração mais eficiente do analito da matriz (BOSSIO; HARRY; KINNEY, 2008; MATONGO et al., 2015; WANG et al., 2015). O shaker também foi avaliado como forma de agitação para extração, pois o equipamento permite a extração de várias amostras simultaneamente. Tempos de extração de 5, 10 e 15 min foram avaliados para tentar diminuir o tempo gasto nas extrações.

Dentre os fatores avaliados neste planejamento, o que apresentou maior significância foi o volume de solvente para todos os analitos estudados. Como esperado, um maior volume de solvente extrator, propicia uma maior concentração dos analito no sobrenadante durante o equilíbrio. As recuperações obtidas nos ensaios do planejamento variaram de 18 a 93% para os três analitos estudados, alcançando recuperações de 93, 47 e 66% na melhor condição do experimento para o CLO, ALP e DIAZ, respectivamente. Este primeiro planejamento experimental (resultados não apresentados) direcionou os estudos em função do volume do solvente extrator. As melhores condições do planejamento foram 9 mL de solvente extrator, por cinco minutos em agitação na incubadora (shaker) a temperatura ambiente. No entanto, uma elaboração mais detalhada e execução mais rigorosa de novos experimentos foi necessária.

Com o volume de solvente extrator definido, novos ensaios foram realizados para avaliar o número de ciclos de extração necessários. Dois ensaios foram realizados, um deles foi executado com uma única extração com 9 mL de solvente extrator e outro ensaio prosseguiu com 3 extrações de 3 mL cada. Como esperado, as recuperações alcançadas com três extrações foram melhores (ALP = 43%, DIAZ = 57% e CLO = 61%). Para extração única, as porcentagens de extração foram menores, com valores de 32%, 51% e 48% para ALP, DIAZ, CLO, respectivamente. Desta forma, foi definido que 3 extrações com 3 mL de solvente extrator (metanol/água 50% v/v) como condição ideal de extração.

Visando melhorar as extrações dos BDZ, um novo planejamento fatorial 2^3 com ponto central foi executado. Para estes novos estudos foi escolhido apenas o ALP como fármaco modelo. Estes estudos não foram realizados com os demais BDZs devido ao grande número de experimentos necessários. Diferentemente do planejamento anterior, com o objetivo de simular condições mais próximas do real, o tempo entre o enriquecimento e a extração da amostra foi estendido para 15 horas, visando as condições de equilíbrio do sistema. O planejamento fatorial executado e seus resultados estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Planejamento fatorial 2^3 para as condições de extração do ALP do sedimento.

Fator	Nível	Superior	Inferior	Ponto central
1-massa de amostra (g)		1,0	0,5	0,75
2-forma de extração		ultrassom	Shaker	Ultrassom
3-Tempo (min)		15	5	10
Ensaio	Fatores			Recuperação (%)
	1	2	3	ALP
1	-	-	-	62,9 ± 0,9
2	+	-	-	52 ± 4
3	-	-	+	59 ± 7,6
4	0	-	0	67,5 ± 0,2
5	+	+	-	60 ± 7,2
6	+	-	+	63 ± 5
7	+	+	+	63,7 ± 0,2
8	-	+	+	69 ± 9
9	0	+	0	73 ± 8
10	-	+	-	72 ± 5

Como pode ser visto na Tabela 11, de modo geral, as recuperações foram superiores a 50% em todos os ensaios propostos. Entretanto, melhores recuperações foram alcançadas para os ensaios 9 e 10 que apresentaram como fator comum, a forma de extração, ambos por ultrassom. Este resultado, referente a forma de extração, diverge do definido pelo planejamento anterior, que mostrou que as melhores recuperações eram alcançadas utilizando o shaker e não o ultrassom. Porém, possivelmente, a explicação deste desacordo encontra-se no fato de os sedimentos terem sido enriquecidos com o fármaco 15 h antes da extração e não apenas 30 minutos, necessitando assim uma extração mais energética. Para avaliar a importância dos fatores isoladamente e do efeito sinérgico entre os fatores estudados neste planejamento, foi plotado um gráfico de Pareto que ordena os fatores estudados em função da sua significância (Figura 38).

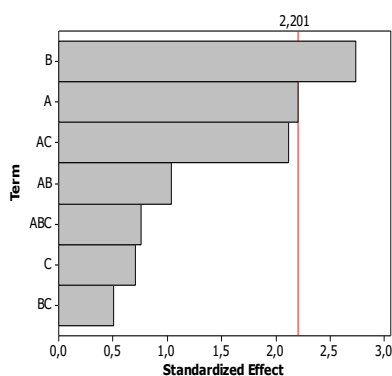


Figura 38. Gráfico de Pareto referente ao estudo de extração do ALP de sedimentos realizados com o planejamento fatorial 2^3 ($\alpha=0,05$). Onde o fator A é a massa de amostra, B é a forma de extração e C corresponde ao tempo de extração empregado.

Como pode ser visto na Figura 38, o parâmetro mais significativo foi a forma de extração, pois o valor do efeito foi maior que o T crítico de 2,201, representado pela linha vertical vermelha que define um limite para 95% de confiança. Observa-se ainda na Figura 36 que o parâmetro A (massa de amostra) ficou no limite do T crítico, podendo também ser considerado um fator importante para a extração. Para melhor compreender as interações entre os fatores, foram também plotados gráficos de interações que estão apresentados na Figura 39.

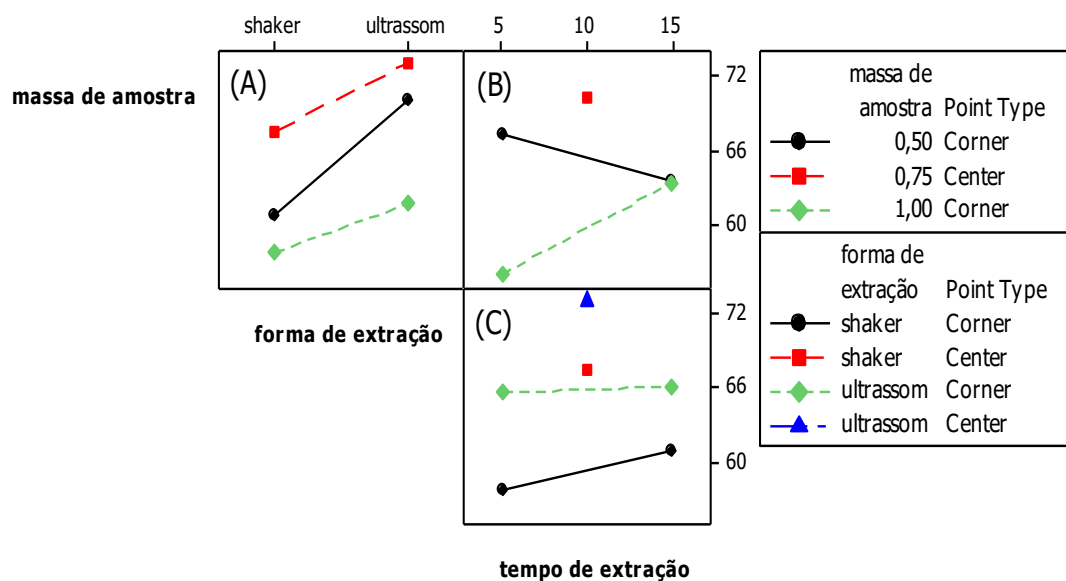


Figura 39. Gráficos de interações dos fatores utilizados no planejamento fatorial 2^3 . (A) Relação entre massa da amostra, forma de extração e recuperação (%). (B) Relação entre massa da amostra, tempo de extração e recuperação (%). (C) Relação entre tempo de extração, forma de extração e recuperação (%)

A análise da Figura 39A, que relaciona a recuperação do ALP em função da forma de extração empregada para as três massas de amostra, deixa claro que o ultrassom foi a melhor forma de extração, pois recuperações mais altas foram alcançadas em todas as condições de massa utilizadas neste estudo, porém mais significativa para a menor massa de amostra. Pode-se notar ainda que as menores recuperações foram para a maior massa de amostra, fato este, condizente com o raciocínio que uma massa maior de sedimento dentro do tubo de ensaio não proporciona uma adequada área superficial para que ocorra uma extração eficiente. A condição de ponto central para a massa de sedimento mostrou-se mais eficiente. A Figura 39B relaciona o tempo de extração com a recuperação obtida para as diferentes massas de amostra. Comportamentos diferentes podem ser observados entre a menor e a maior massa de amostra. Para a massa de 0,5 g de sedimento, quando o tempo de extração passou de 5 para 15 minutos, ocorreu uma diminuição da recuperação para o ALP, no entanto, a mesma alteração temporal proporcionou um ganho de 13,3% na recuperação do fármaco quando utilizado 1 g de sedimento. Possivelmente, o maior tempo de sonicação aumentou a agitação e assim a área

superficial do sedimento, melhorando assim a extração do fármaco. Para este fator, assim como para a forma de extração, o ponto central de 10 minutos também apresentou uma maior eficiência de extração. A interação entre a forma e o tempo de extração (Figura 39C) mostrou não haver diferenças entre as extrações obtidas com 5 ou 15 minutos realizados com o ultrassom. Já para as extrações obtidas com 10 minutos (ponto central), ambas formas de extração resultaram em melhores recuperações.

Fica claro, baseado nestes dados, que a extração assistida por ultrassom de uma pequena massa de amostra resulta em melhores resultados para a extração de ALP do sedimento. Desta maneira, para os seguintes estudos, as condições escolhidas para a extração foram: 9 mL de solvente extrator, uma pequena massa de sedimento (0,5 ou 0,75 g), e sonicação durante 10 minutos, além de 3 ou mais ciclos de extração.

Mesmo que diversas condições de extração tenham sido avaliadas, as recuperações ainda foram consideradas insatisfatórias. Assim, os estudos de otimização da extração prosseguiram com as condições já definidas visando melhorar as recuperações alcançadas até o momento. Assim, como para o último planejamento, o ALP continuou sendo empregado como fármaco modelo dos BDZs para a extração. A Tabela 12 apresenta diferentes condições de extração testadas e as respectivas recuperações obtidas. Estes estudos, assim como os planejamentos fatoriais anteriormente mostrados, serviram para direcionar as melhores condições de extração. Assim, alguns ensaios não foram realizados em duplicatas. Diversos solventes extratores foram avaliados visando melhorar as extrações dos BDZs do sedimento, explorando diferentes polaridades da fase extratora. Todas as condições testadas estão respaldadas pela literatura, uma vez que estes solventes são frequentemente utilizados em extrações de fármacos e outros compostos orgânicos em diferentes matrizes (ANTONICÍ; HEATH, 2007; BUCHBERGER, 2007; GHOBADI; YAMINI; EBRAHIMPOUR, 2014; LÖFFLER et al., 2005; SUNDELIN, 2013). As condições avaliadas foram de alguma forma modificadas para atender as necessidades da metodologia voltamétrica e o volume total de solvente extrator não excedeu 10 mL.

Tabela 12. Experimentos com diferentes solventes extratores para o ALP.

Ensaio	Massa de sedimento (g)	Solvente utilizado	Recuperação (%)
A	0,75	Acetato de etila / metanol (1:1)	n.d.
B	0,75	Acetato de etila / metanol / água (1:1:2)	n.d.
C	0,75	Propanona / metanol (1:1)	53,3
D	0,75	Propanona / metanol / água (1:1:2)	61,5
E	0,75	Água / acetonitrila / metanol (2:2:1)	50 ± 7,35
F	0,75	Água / acetonitrila / metanol (1:2:2)	55 ± 3,26
G	0,75	1° ciclo: metanol / água (1:1)	52,8
		2° ciclo: metanol / acetonitrila (1:1)	
		3° ciclo: acetonitrila / água (1:1)	
H	0,5	Metanol / água (1:1), pH 12	98 ± 2,98
I	0,5	Metanol / água (1:1), pH 3,8	64 ± 7,5
J	0,5	Metanol / água (1:1) + NaCl _(aq) (11,1 g L ⁻¹)	84,9 ± 0,5
K	0,5	Metanol – acetonitrila (1:1) evaporado e reconstituído	77,1

n.d. = não detectado

Os ensaios A e B empregaram ACN e metanol como solventes orgânicos para a extração. Estes solventes foram usados por Löffler et al. (2005) para a extração de diversos fármacos de sedimentos, incluindo DIAZ e CLO. Entretanto, no presente trabalho a ausência de um sinal voltamétrico do analito e diferenças no perfil voltamétrico dos voltamogramas (voltamogramas não apresentados) indicam uma interferência do solvente na medida voltamétrica, mesmo fazendo a diluição da amostra. Desta forma, este solvente extrator não foi utilizado nos estudos subsequentes. Os ensaios de C a F foram feitos com diferentes solventes ou diferentes proporções entre os solventes, explorando a mudança de polaridade do meio extrator para então remover o analito da matriz. As recuperações obtidas variaram de 50 ± 7,35 a 61,5%, sendo o melhor resultado atingido pelo experimento D. Entretanto, a recuperação obtida foi ainda muito inferior aos 80% considerados adequados para a concentração estudada. Assim, estes solventes extratores não foram utilizados nos próximos estudos. O ensaio G, foi conduzido com extrações sequenciais com combinações diferentes entre três solventes, água, metanol e acetonitrila. Extrações sequenciais são utilizadas por explorar diferenças na polaridade do solvente extrator e assim extrair mais facilmente um ou mais compostos concomitantemente ou de forma seletiva (LÖFFLER et al., 2005). Embora diferentes polaridades tenham sido atingidas e um processo de extração cuidadoso tenha sido realizado, a condição ideal de extração não foi encontrada e bons resultados não foram

alcançados neste ensaio, dispensando assim a utilização de extrações sequenciais para os BDZs, pelo menos com estes solventes.

Como os ensaios anteriores não surtiram resultados expressivos com diferentes solventes orgânicos, novos estudos foram realizados alterando o pH da solução ou adicionando $\text{NaCl}_{(\text{aq})}$ no meio. Os experimentos de H a K foram também conduzidos com uma massa menor de sedimento (0,5 g) na tentativa de melhorar a extração dos BDZs. Para os experimentos H e I, a mistura de metanol/água (1:1) sofreu alterações de pH visando favorecer a extração dos BDZs por meio de protonações e desprotonações do analito. No ensaio H, pode-se notar que a alteração do pH da solução, para valores mais alcalinos, resultou em uma excelente recuperação do analito nos sedimentos. Possivelmente, esta melhora na recuperação deve-se ao fato do analito ter características básicas e, desta forma, em pH alcalinos tanto o ALP assim como os outros BDZs estudados, permanecem em suas formas neutras, facilitando assim a extração destes fármacos dos sedimentos (FERNÁNDEZ et al., 2013; GHOBADI; YAMINI; EBRAHIMPOUR, 2014; RACAMONDE et al., 2015). O ajuste do pH do meio também foi feito para uma condição ácida (ensaio I) utilizando ácido acético. Este estudo, também apresentou melhores resultados que os estudos anteriores ao H. No entanto, comparativamente, a recuperação foi inferior a obtida em condições de meio alcalino. O pH ácido do solvente extrator é frequentemente empregado em extrações, entretanto, possivelmente ele resulte em melhores extrações de compostos ácidos, não sendo tão interessante para compostos orgânicos com caráter não ácido.

Outro fator avaliado foi a força iônica (ensaio J). Para estes estudos, o mesmo solvente extrator constituído de metanol/água (1:1) foi utilizado, entretanto, foi adicionado ao solvente $\text{NaCl}_{(\text{aq})}$ em uma concentração de $11,1 \text{ g L}^{-1}$. A adição de $\text{NaCl}_{(\text{aq})}$ para a extração de compostos orgânicos aumenta a solubilidade do analito, mantendo-o em solução (efeito *salting in*) (QUEIROZ, 2009; QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001), tal prática é frequente utilizada (GHOBADI; YAMINI; EBRAHIMPOUR, 2014). Como pode ser visto na Tabela 12, a recuperação obtida para o ALP ($84,9 \pm 0,5\%$) foi considerada adequada para concentrações na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ (ANVISA, 2003; AOAC. 2002), porém inferior ao resultado obtido com o meio alcalinizado. O último experimento (experimento K) foi conduzido seguindo protocolos usualmente empregados na extração de compostos orgânicos em sedimentos. Sendo assim, 0,5 g de sedimento enriquecido foi extraído com 9 mL de solventes orgânicos. Após a extração, seguindo a metodologia definida no presente trabalho, o solvente foi então levado a secura em um copo de béquer com o auxílio de um ventilador em uma capela por cerca de duas horas. O resíduo foi então reconstituído em água e analisado. Embora este procedimento tenha resultado em uma recuperação de 77,1% para o ALP, tal

recuperação ficou aquém do recomendado e inferior ao resultado obtido em extração com o meio alcalinizado (ensaio H). Sendo assim, em conclusão a estes estudos de extração, definiu-se como condições ótimas 3 extrações consecutivas utilizando 3 mL (total 9 mL) do solvente extrator metanol – água (1:1) em pH 12 por 10 minutos usando banho de ultrassom. Estas condições foram utilizadas para a validação da forma de extração por meio de estudos de adição e recuperação para os BDZs de interesse do presente trabalho.

Após a otimização das condições de extração empregando o ALP como modelo, o método de extração foi empregado para a validação dos três BDZs. 0,5 g de sedimentos foram enriquecidos com 0,5 µg de cada fármaco isoladamente. Após 15 horas de repouso, os fármacos foram então extraídos com as condições otimizadas. A Figura 40 apresenta os voltamogramas obtidos na determinação de cada um dos fármacos após as extrações.

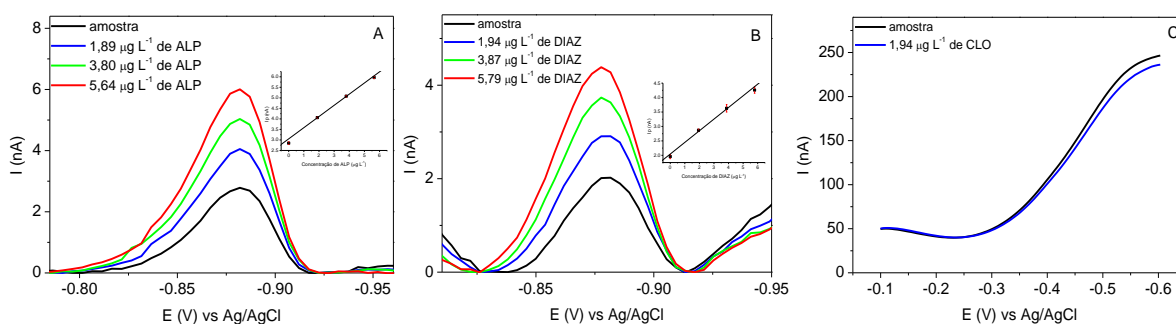


Figura 40. Voltamogramas obtidos a partir das extrações dos BDZs de sedimentos enriquecidos com 1 µg g⁻¹ de cada BDZ empregando 3 extrações consecutivas com 3 mL do solvente extrator metanol/água (1:1) pH 12 em banho ultrassônico por 15 minutos. (A) Voltamogramas referentes a determinação de 5,07 µg L⁻¹ de ALP em cela voltamétrica pH 7 e condições voltamétricas otimizadas. (B) Voltamogramas referentes a determinação de 5,01 µg L⁻¹ de DIAZ em cela voltamétrica pH 6 e condições voltamétricas otimizadas. (c) Voltamogramas referentes a determinação de 2,51 µg L⁻¹ de CLO em cela voltamétrica pH 8 e condições voltamétricas otimizadas.

Na Figura 40A estão apresentados os voltamogramas obtidos na determinação do ALP extraído do sedimento empregando as condições de extração previamente otimizadas. Tais estudos foram realizados em triplicatas. Pode-se observar que não ocorreu interferências provenientes da matriz durante a determinação do ALP, demonstrando a alta capacidade da metodologia desenvolvida em determinar concentrações traço do analito em amostras complexas como o sedimento. Para estes estudos, foram obtidas recuperações de 102 ± 8% de ALP. A Figura 40B apresenta os voltamogramas resultantes da determinação voltamétrica do DIAZ extraído do sedimento enriquecido. Nota-se nestes voltamogramas, a presença de um único pico voltamétrico intenso e bem definido no potencial de -0,88 V referente a redução voltamétrica do DIAZ. Para este analito, também não foi observado interferências da matriz no potencial de determinação do mesmo. As recuperações alcançadas neste estudo foram de 91 ± 11%, consideradas adequadas.

Os estudos de extração para o CLO resultaram nos voltamogramas apresentados na Figura 40C. É possível notar nesta figura a ausência de um sinal voltamétrico no E_{pico} do CLO (-0,39 V) mesmo após a adição de $1,94 \mu\text{g L}^{-1}$ do fármaco. Além disso, uma elevada corrente de fundo pode ser notada. Estes resultados revelam alta interferência de matriz, capaz de suprimir por completo o sinal voltamétrico do analito. Provavelmente, a interferência observada deve-se à resposta voltamétrica de espécies interferentes na faixa de potencial de estudo do CLO. Sendo assim, formas de reduzir a interferência foram avaliadas.

Primeiramente, o tempo de centrifugação foi aumentado de 15 para 30 min em 2200 rpm, tentando decantar ao máximo o material particulado e reduzir assim a interferência. Entretanto, mesmo após 30 minutos de centrifugação em rotação máxima, o material em suspensão não decantou. Sendo assim, foi realizada uma busca na literatura por agentes flocculantes, os quais permitiriam a separação do material particulado do sobrenadante. Sais de Al e Fe são usualmente empregados para tal objetivo (BIANCHETTI, 2008; MANGRICH et al., 2014; MAXWELL, 2017). Desta forma, Sulfato de Ferro e Amônio ($\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) foi testado para esta finalidade. A solução resultante da mistura apresentou-se límpida (devido a decantação do material particulado), porém o sinal analítico do CLO permaneceu ausente devido a interferências provocadas possivelmente pela adição do sal. Observando os resultados obtidos nos experimentos H, I e J da Tabela 12, notou-se que o extrato obtido em pH 12 (ensaio H) manteve grande quantidade de material em suspensão, diferentemente dos demais, que resultaram em soluções límpidas após a centrifugação como pode ser visto na Figura 41.

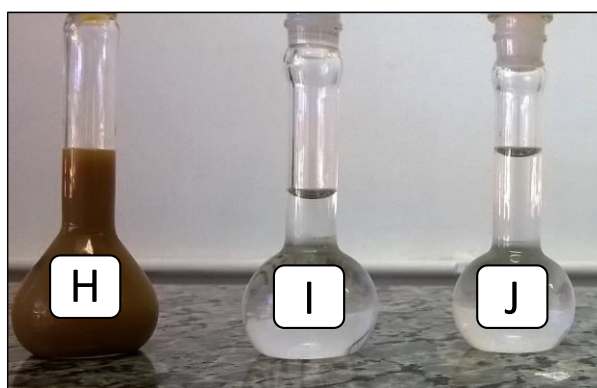


Figura 41. Extratos de sedimento em diferentes condições de extração. (H) Metanol/água (1:1) pH 12. (I) Metanol/água (1:1) pH 3,8. (J) Metanol/água (1:1) + 0,11g de NaCl.

Devido às diferenças observadas no aspecto dos sobrenadantes obtidos em três condições distintas de extração, estudou-se então a possibilidade de adicionar NaCl ao solvente extrator metanol / água (1:1) pH 12 após cada ciclo de extração do CLO, seguida por agitação e centrifugação. Com a adição de $10 \mu\text{L}$ de uma solução de NaCl ($3,056 \text{ mol L}^{-1}$) foi possível a decantação do material particulado e a obtenção de um sobrenadante translúcido, tal qual o

representado pela solução J da Figura 41. O extrato foi então analisado e os voltamogramas referentes a esta análise estão apresentados na Figura 42.

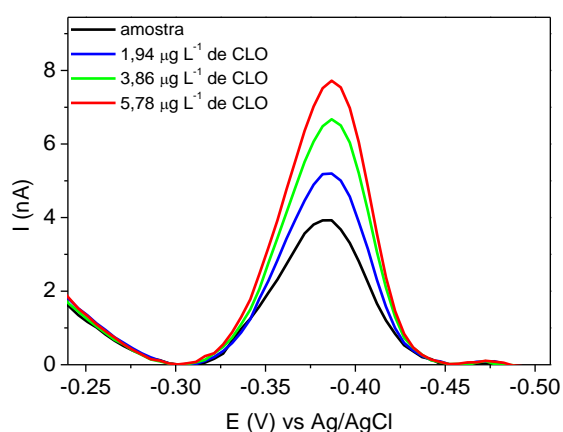


Figura 42. Voltamogramas obtidos na determinação voltamétrica de $2,51 \mu\text{g L}^{-1}$ de CLO resultantes da extração de 0,5 g de sedimento com metanol/água (1:1) pH 12 com adição de NaCl. As condições de análise foram: volume da cela, 10 mL; volume de amostra, 0,5 mL; pH 8 e condições voltamétricas otimizadas.

Pode-se notar na Figura 42 que a redução eletroquímica do CLO no eletrodo de trabalho apresentou ótima resposta com um pico voltamétrico intenso e bem definido. As interferências apresentadas sem a adição de NaCl (Figura 40C) não foram mais observadas neste estudo, possibilitando assim a quantificação do analito. A recuperação alcançada para o CLO sob estas condições de extração foi de $80 \pm 4\%$. Desta forma, as recuperações alcançadas pela extração dos três BDZs de sedimentos foram todas consideradas adequadas, mostrando a possibilidade de extração destes analitos de matrizes complexas. Os resultados estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Resultados obtidos na extração dos BDZs dos sedimentos.

Fármaco	Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Recuperação sem NaCl (%)	Recuperação com NaCl (%)
CLO	1,00	--	80 ± 4
ALP	1,04	102 ± 8	85 ± 8
DIAZ	1,04	91 ± 11	80 ± 6

Os resultados de recuperação apresentados na Tabela 13 foram adequados para os três BDZs estudados ficando entre 80 e 102%. As determinações do DIAZ e do ALP dispensam o tratamento da amostra com NaCl, no entanto, para o CLO esta etapa foi imprescindível. É possível notar que as recuperações dos fármacos ALP e DIAZ obtidas com a adição de NaCl foram mais baixas que as respectivas recuperações obtidas sem a adição dos NaCl. No entanto, visando realizar um único procedimento de extração, a técnica utilizando a adição do sal foi empregada em todos os estudos subsequentes.

5.4 Caracterização das amostras de água e sedimentos

Amostras de água e sedimentos foram caracterizadas com o principal objetivo de relacionar suas características físico-químicas com os valores do K_d para cada BDZ. Sendo assim, as amostras dos sítios de 1 e 7 a 12, utilizadas no estudo do K_d , tiveram seus sedimentos e água caracterizados (Tabela 14). A Tabela 14 apresenta ainda dados da caracterização das amostras 4, 5 e 6, analisadas por voltametria. Para as amostras de água, temperatura, pH e oxigênio dissolvido foram medidos (Tabela 14). As amostras de sedimentos foram caracterizadas quanto a granulometria, teor de matéria orgânica, carbono orgânico total e pH (Tabela 14). No que se refere a granulometria, as partículas são classificadas em areia (0,05 a 2 mm), silte (0,02 a 0,05 mm) e argila (< 0,02 mm).

Tabela 14. Características físico-químicas das amostras de água e sedimentos.

Ponto	Descrição	Água					Sedimentos			pH
		T (°C)	pH	O ₂ (mg L ⁻¹)	MO (g dm ⁻³)	C (g dm ⁻³)	Areia (%)	Silte (%)	Argila (%)	
1	Nascente de rio	--	--	--	--	--	43,4	5,4	-	6,73
4	Nascente	21,3	4,75	10,1	--	--	--	--	--	--
5	R. Carro Quebrado	24,0	7,47	9,2	--	--	--	--	--	--
6	Lago do CEDETEG	25,5	7,86	10,0	--	--	--	--	--	--
7	Rio Cascavel (M)	28,4	7,22	8,9	19,49	11,31	88,87	6,55	4,58	6,82
8	Rio Cascavel (J)	26,1	6,54	8,6	123,93	71,88	30,74	49,04	20,22	6,13
9	Parque do Lago	26,2	7,46	9,3	9,75	5,65	96,71	0,95	2,34	7,11
10	Rio Jordão (M)	26,8	7,32	8,3	18,10	10,50	3,74	60,64	35,62	5,00
11	Rio Jordão (J)	26,8	7,32	8,3	22,28	12,92	63,48	27,92	8,59	7,10
12	Red River	20,6	8,22	13,8	90,2	52,3	6,7	69,8	23,5	7,94

(--) amostra não coletada; (T) temperatura; (O₂) oxigênio dissolvido; (MO) matéria orgânica; (C) carbono orgânico total.

No sítio de amostragem de número 1, apenas sedimentos foram coletados e analisados (Tabela 14). Os sedimentos deste ponto de coleta foram utilizados nos estudos de otimização das condições de extração para as análises voltamétricas e por MALDI-TOF. A amostra coletada apresentou quase 50% de sua constituição em argila. Os teores de matéria orgânica e de carbono foram insignificantes.

Dos sítios de 4, 5 e 6, apenas amostras de água foram coletadas e analisadas. A amostra de água do ponto de coleta nº 4, se diferenciou das outras tanto no pH quanto no teor de oxigênio dissolvido, bem como na sua temperatura. Como esta é uma amostra de água subterrânea, uma temperatura mais baixa que para as demais amostras foi registrada. Além disso, o teor de oxigênio dissolvido foi mais alto que das amostras 5 e 6, este resultado está condizente com a temperatura da água, uma vez que a concentração de gases dissolvidos na água aumenta com a diminuição da temperatura da mesma (GRASSI, 2001). Entretanto, o parâmetro que mais se destacou foi o pH, bem mais ácido que as demais amostras. Este pH ácido pode ser devido à dissolução de compostos do solo, e pode influenciar no

comportamento e destino dos fármacos no ambiente. Para a amostra de água coletada no rio Carro Quebrado (5), a temperatura e o pH não se diferenciaram das condições apresentadas nas demais amostras de água e análises foram realizadas com o objetivo de determinar a presença ou não dos BDZs. O oxigênio dissolvido não foi medido na água deste rio por falta de instrumentação na data da coleta. A amostra de água coletada no ponto 6, no lago do CEDETEG, foi utilizada nos primeiros estudos em amostras reais. A água deste lago foi enriquecida com $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada BDZ para avaliar a resposta voltamétrica dos BDZs frente a matriz complexa. Como este ponto de coleta é isento de contaminação e os BDZs não foram detectados na amostra não enriquecida, mais estudos com amostras deste local não foram realizados.

As amostras de água e sedimentos coletadas nos pontos de 7 a 12 foram caracterizadas em função de todos os parâmetros físico-químicos descritos na Tabela 14. Estes parâmetros foram escolhidos conforme a disponibilidade de instrumentação para as análises e a possível relevância de cada parâmetro no comportamento de fármacos no ambiente. A água e os sedimentos coletados nestes sítios de amostragem foram analisados para a presença de BDZs e também utilizados nos estudos do K_d em sistemas enriquecidos com os BDZs. No que se refere às amostras de água, os parâmetros temperatura, pH e oxigênio dissolvido, não apresentaram diferenças entre as amostras, com exceção à amostra de água do ponto 12, a qual teve um pH alcalino, como maior valor dentre todas as amostras coletadas e também alto teor de oxigênio dissolvido.

Em relação aos sedimentos coletados, a caracterização quanto matéria orgânica e granulometria revelou diferenças expressivas na composição das amostras. As amostras de 7 a 11 foram todas coletadas em um mesmo município, sendo esperada uma semelhança na composição dos sedimentos, entretanto, isso não foi observado. Até mesmo amostras coletadas em um mesmo rio, com alguns metros de distância entre cada ponto, apresentaram variações expressivas nas suas características físico-químicas. Em relação à matéria orgânica e carbono total, a amostra coletada a jusante da ETE (8) foi a que mais se destacou. Elevados teores de matéria orgânica foram encontrados nestes sedimentos, resultado possivelmente do aporte de matéria orgânica e nutrientes pela ETE. Outra amostra que também apresentou elevado teor de MO e C foi a amostra de sedimento de número 12 coletada no Canadá. O valor elevado destes parâmetros pode estar relacionado com as estações do ano e características topográficas. Durante o outono, ocorre uma queda natural da folhagem de praticamente todas as árvores em um curto período, podendo ocorrer assim o acúmulo maciço de matéria orgânica. Em relação à topografia, a região é um antigo fundo de lago, plano, e portanto, pode naturalmente acumular matéria orgânica. Além disso, para a amostra 8, os

teores de silte e argila, assim como para a amostra de sedimentos dos pontos 10 e 12 foram mais elevados que para as demais amostras utilizadas nos estudos do K_d , sendo silte o principal constituinte mineral destas três amostras. As amostras 7, 9 e 11 se destacaram pelo elevado teor de areia. Os níveis de MO e C não foram muito elevados para estas amostras. As amostras de sedimentos dos pontos 10 e 12 se diferenciaram também das demais quanto ao pH. A amostra de número 10 apresentou um pH mais baixo que as demais amostras de sedimentos, enquanto a amostra de sedimento do ponto 12 teve o maior valor de pH, concordando com o elevado teor de pH da amostra de água coletada no mesmo ponto.

Todas estas características elencadas na Tabela 14 para os sedimentos, puderam ser notadas através do aspecto visual e da textura dos sedimentos durante o preparo de amostra. A Figura 43 apresenta fotografias das amostras coletadas secas, maceradas e peneiradas. É possível notar diferenças na granulometria dos sedimentos e na sua coloração. A amostra de número 1 foi majoritariamente argilosa. Para as amostras 7 e 8, por exemplo, embora sejam do mesmo rio e tenham sido coletadas em distância de menos de 500 m entre elas, estas são completamente distintas entre si em coloração e granulometria, concordando com os resultados apresentados na Tabela 14. A mesma diferenciação nos aspectos visuais pode ser observada para as amostras 10 e 11, coletadas em uma distância de cerca de 100 metros. Os sedimentos coletados a montante da ponte do rio Jordão foram mais argilosos e com principal constituição de silte, enquanto a jusante da ponte mostrou-se mais arenoso. Estas diferenças podem estar relacionadas com a presença de uma represa sob a ponte, a qual diminui não só a velocidade da correnteza, mas também permite o acúmulo de sedimentos. A amostra 9 apresentou elevada granulometria (areia) em sua constituição, enquanto a amostra 12, trazida do Canadá, aparentava ser bem fina e de coloração acinzentada, assim como o solo da região.

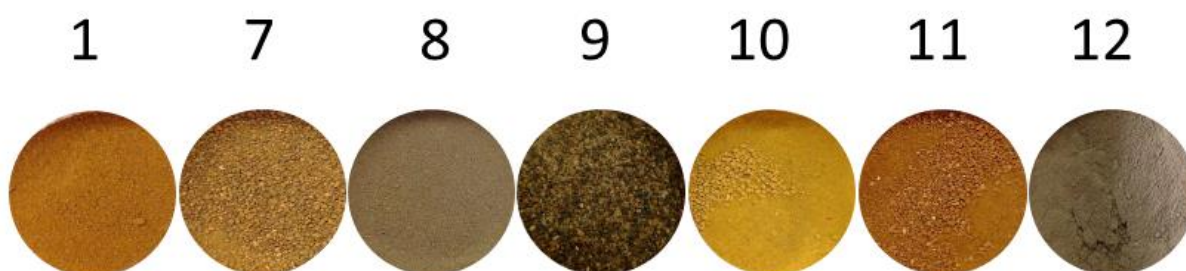


Figura 43. Sedimentos coletados para os estudos de K_d .

5.5 Análise das amostras coletadas para a detecção de BDZs

Após a otimização e validação dos métodos analíticos e otimização das condições de extração, amostras de águas naturais e sedimentos foram coletados e analisados. As amostras

de água e sedimentos foram preparadas, como descrito na seção 4.3, e analisadas por voltametria (amostras de 1 a 12) e MALDI-TOF (amostras de 12 a 16). Embora pontos estratégicos, como após o efluente da ETE, tenham sido escolhidos para a amostragem, todas as amostras de águas e sedimentos foram negativas para os BDZs CLO, ALP e DIAZ. Provavelmente, os métodos não tiveram limites de detecção baixos o suficiente para a possível presença e concentração destes BDZs nas amostras analisadas. Em trabalho anterior, águas superficiais foram coletadas no município de Guarapuava e analisadas. Das amostras analisadas, uma foi positiva para a presença de ALP e $5,9 \pm 0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ do fármaco foi determinado (NUNES et al., 2015). Embora os limites de detecção alcançados para os métodos voltamétricos para o DIAZ e CLO tenham sido baixos, $0,081$ e $0,19 \mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente, assim como para o ALP ($0,1 \mu\text{g L}^{-1}$) (NUNES et al., 2015), estas drogas podem estar presentes no ambiente em concentrações ainda inferiores.

Da Silva e colaboradores encontraram LORAZ e DIAZ em amostras naturais. O LORAZ foi detectado em concentrações de $3,03$ a $3,35 \text{ ng g}^{-1}$ em sedimentos e $11,6$ a $46,1 \text{ ng L}^{-1}$ em águas. O DIAZ foi determinado em uma concentração de $2,68 \text{ ng L}^{-1}$ em água (DA SILVA et al., 2011). Mendoza e colaboradores determinaram ALP, LORAZ e DIAZ em água de rio em concentrações que variaram de $2,9$ a $9,1 \text{ ng L}^{-1}$ para ALP, $3,3$ a $55,7 \text{ ng L}^{-1}$ para DIAZ e $34,1$ a $167,0 \text{ ng L}^{-1}$ para LORAZ (MENDOZA et al., 2014). Kosjek e colaboradores determinaram os BDZs DIAZ (111 ng L^{-1}), BROMAZ (158 ng L^{-1}) e OXAZ (72 ng L^{-1}) em efluentes hospitalares Kosjek et al. (2012). Brodin e colaboradores afirmam ter detectado o BDZ OXAZ em concentrações de $0,73 \mu\text{g L}^{-1}$ em efluente de ETE e $0,58 \mu\text{g L}^{-1}$ em água superficial de um rio que recebe esgoto tratado. Os valores determinados foram comparáveis às concentrações de BDZs reportadas em outras águas americanas e europeias (BRODIN et al., 2013). Entretanto, embora valores na ordem de ng L^{-1} tenham sido previamente apresentados, concentrações de fármacos em geral em ambientes aquáticos, podem ser muito mais altas que os limites de detecção reportados no presente trabalho. Matongo e colaboradores determinaram fármacos de diferentes classes em efluentes de ETE, águas superficiais e sedimentos. O ibuprofeno foi detectado em concentrações de $117 \mu\text{g L}^{-1}$, $84,6 \mu\text{g L}^{-1}$ e 659 ng g^{-1} em águas residuais, águas superficiais e sedimentos, respectivamente. Antibióticos foram geralmente detectados em concentrações inferiores a $10 \mu\text{g L}^{-1}$ em águas superficiais e até $34,5 \mu\text{g L}^{-1}$ em águas residuais. Como pode ser visto, a concentração de fármacos em ambientes aquáticos apresenta grande variabilidade, sendo a classe, o consumo, sistemas de coleta e tratamento de esgoto e fatores de diluição no ambiente, variáveis que podem interferir na concentração destas drogas em águas e sedimentos. Vale ressaltar que nenhuma outra forma de pré-concentração dos fármacos, se não a acumulação no eletrodo de

trabalho, foi utilizada nos estudos com soluções sintéticas e/ou naturais no presente trabalho. Sendo assim, muito provavelmente, técnicas de extração, pré-concentração e *cleanup* das amostras de água e sedimentos, melhorariam consideravelmente os limites de detecção dos métodos voltamétricos propostos.

5.6 Determinação do coeficiente de distribuição (K_d) empregando voltametria

Como CLO, ALP e DIAZ não foram detectados nas amostras analisadas, sistemas contendo água e sedimentos foram enriquecidos com os BDZs. Estudos iniciais, com a argila comercial ARGEL, água deionizada e ALP como fármaco modelo, foram realizados a fim de entender a importância destes adsorventes (argilas) no comportamento de fármacos em ambientes naturais. No mesmo sentido, sedimentos de nascente (ponto 1) e a água coletada na nascente do bairro Batel em Guarapuava (ponto 4) foram misturados em sistema e utilizados para avaliar o K_d dos três BDZs neste meio, em caráter de testes iniciais. As amostras de sedimentos e água coletadas nos sítios de 7 a 12 foram também utilizadas nos estudos do K_d . A Tabela 15 apresenta os resultados obtidos no estudo do K_d .

Tabela 15. Coeficientes de distribuição sedimento/água dos BDZs em amostras naturais enriquecidas.

BDZ	Coeficiente de distribuição (K_d) (L Kg ⁻¹)							
	Argila Argel	Sítios 1 e 4	Sítio 7	Sítio 8	Sítio 9	Sítio 10	Sítio 11	Sítio 12
CLO	--	6,27	3,34	9,19	1,41	4,87	2,53	*
ALP	16,27	7,38	1,78	11,48	1,94	6,51	2,78	15,05
DIAZ	--	9,92	2,80	11,78	2,30	9,03	4,95	21,99

(--) Estudo não realizado. (*) Não foi possível determinar o K_d .

De modo geral, os coeficientes de distribuição determinados em cada sistema não apresentaram grandes diferenças entre os fármacos em uma mesma amostra. Entretanto, um padrão pode ser observado. Em quase todos os experimentos, o DIAZ foi a droga com maior valor de K_d , mostrando maior afinidade com os sedimentos que as demais drogas. Já o CLO, com exceção da amostra de número 7, apresentou os menores K_d , sendo o BDZ com menor afinidade com os sedimentos. Estes resultados podem ser relacionados com as características físico-químicas de cada BDZ (Tabela 1). Por exemplo, o CLO que apresentou maior afinidade com a fase aquosa, possui também a maior solubilidade em água (100 mg L⁻¹), já a solubilidade do ALP e do DIAZ é bem mais baixa e estes fármacos tiveram K_d menores. O K_d para o DIAZ em todas as amostras foi maior que para o ALP, porém a solubilidade para esta droga não é menor que a do ALP (ALP = 40 mg L⁻¹; DIAZ = 50 mg L⁻¹), como seria esperado.

Portanto, a solubilidade próxima destes fármacos não permite explicar seu comportamento no sistema (K_d). Por outro lado, a sequência decrescente dos K_d para cada BDZ (DIAZ > ALP > CLO), coincide perfeitamente com o pKa dos fármacos (DIAZ = 3,4, ALP = 2,4 e CLO = 1,5), com exceção a amostra de número 7. Os valores de pH das amostras de água analisadas variaram de 6,54 a 7,46, com valor médio de $7,2 \pm 0,4$. Como estes BDZs possuem características básicas, nas condições de meio mais alcalinas eles permanecem preferencialmente em sua forma neutra e, conseqüentemente, possuem maior interação com os sedimentos (GHOBADI; YAMINI; EBRAHIMPOUR, 2014). Desta forma, as interações dos fármacos com a água e sedimentos parecem ter relação com as características dos fármacos.

Outro fator avaliado nos estudos do K_d , foi a composição dos sedimentos. Sendo assim, sedimentos de diferentes pontos foram coletados objetivando obter amostras com variadas características físico-químicas. Avaliando a Tabela 14, os sistemas naturais que mais se destacaram foram para as amostras coletadas a jusante da ETE (ponto 8) e do Red River (ponto 12). A análise da composição destes sedimentos revelou principalmente, altos teores de MO e C, além disso, considerável porcentagem de silte e argila foram determinados para ambas amostras. (Tabela 14). Sendo assim, provavelmente o alto teor de matéria orgânica para as duas amostras foi o principal fator responsável pela adsorção dos BDZs nos sedimentos e conseqüentemente alto K_d (WILKINSON et al., 2017). Em especial para os sistemas montados com amostras do Red River (ponto 12), os elevados K_d determinados para o ALP e DIAZ são consequência também de interferências de matriz. Tais interferências dificultaram a determinação da I_p para os três BDZs nas amostras de água, em especial para o CLO, que teve sua determinação em sedimentos também prejudicada impossibilitando o cálculo do K_d para este fármaco. Para o ALP e DIAZ, determinações nos sedimentos foram possíveis sem interferências consideráveis da matriz e 50 e 60% da massa de ALP e DIAZ, respectivamente adicionada, foi recuperada nos sedimentos. Entretanto, as determinações do ALP e do DIAZ em amostras de água foram comprometidas devido à supressão quase que total dos sinais analíticos destes dois fármacos por interferentes da matriz. Sendo assim, os picos voltamétricos obtidos para o ALP e o DIAZ foram de baixa intensidade e resultaram, conseqüentemente, em recuperações de 10 e 3%, respectivamente, na água. Desta forma, a recuperação total da massa de cada BDZ adicionada no sistema água/sedimento foi de 60% para o ALP e 63% para o DIAZ. Portanto, pode-se deduzir que as extrações não foram 100% eficientes e as interferências de matriz nas amostras de água podem ter induzido a uma subestimação da concentração dos BDZs. Sendo assim, o K_d , que nada mais é que uma razão entre a concentração determinada nos sedimentos pela concentração determinada na água,

resultou em um valor elevado. De qualquer forma, os resultados obtidos para o DIAZ e o ALP indicam que estes BDZs preferencialmente ligam-se aos sedimentos e o DIAZ possui maior afinidade com os sedimentos que o ALP, concordando com os resultados de K_d destes fármacos em outros sistemas apresentados na Tabela 15.

Além das amostras 8 e 12, os experimentos realizados com os sedimentos do ponto 1 com a água do ponto 4 e os sedimentos e água do ponto 10 também resultaram em valores de K_d relativamente altos. As análises físico-químicas dos sedimentos coletados nos pontos 1 e 10 mostraram teores de MO bem mais baixos que os apresentados pelas amostras de número 8 e 12. No entanto, a análise granulométrica mostrou altos teores de argila nestes sedimentos, sendo mais que 50% da composição no sedimento de nascente e cerca de 36% para os sedimentos a montante da ponte do rio Jordão. Para esta última amostra (10), a composição principal foi de silte, com tamanho de partícula entre areia e argila (0,02 a 0,05 mm), a qual também poderia adsorver os fármacos. Os resultados obtidos para os sistemas contendo os sedimentos de 1 e 10, que possuíam consideráveis teores de argila, foram respaldados pelo ensaio realizado com a argila comercial Argel e água deionizada, que apresentou alto K_d (16,27), confirmando a interação dos fármacos com argilas. Neste sentido, a amostra 9, majoritariamente arenosa (96,71%), com baixos teores de silte e argila, 0,95 e 2,34% respectivamente, apresentou os menores K_d para os BDZs estudados, sendo 1,41, 1,94 e 2,30 L Kg⁻¹ para CLO, ALP e DIAZ, respectivamente.

Para confirmar a interação entre as características das amostras e os K_d determinados para cada BDZ, uma análise de componentes principais, do inglês: *principal components analysis* (PCA), foi realizada. Os nove parâmetros físico-químicos determinados para as amostras de água e sedimentos (Tabela 14), assim como o K_d obtido para cada BDZ (Tabela 15) foram as 12 variáveis avaliadas nos sistemas das amostras 1 e 4, 7, 8, 9, 10 e 11. Os sistemas mostrados com as amostras coletadas no ponto 12 não foram utilizados na construção da PCA. Através do gráfico de PCA pode-se notar que 82,64% da variância dos dados foram explicados pela 1ª e 2ª componentes principais. A primeira componente foi capaz de explicar 51,31% da relação existente entre as variáveis, e a segunda componente foi capaz de explicar 31,33% das relações. Observando o eixo x positivo da Figura 44A, é possível notar que os fatores temperatura, pH da água, % de areia, pH dos sedimentos e O₂ se correlacionaram entre si através do Fator 1. Por outro lado, observando o eixo x negativo, fica clara a correlação entre % de silte, MO, C, % de argila e o K_d para os três BDZs estudados. Sendo assim, os fatores que mais influenciam na distribuição destes fármacos entre a água e os sedimentos são os localizados nos quadrantes esquerdos do gráfico (PC1). Sendo a porcentagem de argila, o fator mais importante, uma vez que todos os K_d e este parâmetro da

granulometria ficaram agrupados no quadrante esquerdo inferior do gráfico. Seguindo este raciocínio, os parâmetros localizados nos quadrantes do lado direito, foram inversamente proporcionais aos K_d . Avaliando o Fator 2 (eixo y), apenas 31,32% dos resultados podem ser explicados. Nos quadrantes superiores, eixo y positivo, ocorreu uma correlação entre a porcentagem de silte, MO, C, temperatura da água e pH da água. Já no eixo y negativo, os K_d determinados, a porcentagem de argila, O_2 , o pH dos sedimentos e a porcentagem de areia se correlacionaram entre si.

Analisando a Figura 44B, é possível afirmar que as amostras foram bem diferentes entre si, ocorrendo algumas semelhanças entre as amostras 8 e 10, no quadrante superior esquerdo, e entre as amostras 7 e 11, quadrante superior direito. As amostras 8 e 10, possuem em comum alto teor de silte, 49,04 e 60,64% respectivamente (Tabela 14). Este resultado é condizente com a Figura 44A, uma vez que a porcentagem de silte esteve presente no mesmo quadrante. Para as amostras 7 e 11, a semelhança que uniu estas duas amostras em um mesmo quadrante, foi o alto teor de areia, de 88,87% para a amostra 7 e 63,48% para a amostra 11 (Tabela 14). Entretanto, a % de areia, foi a variável presente no quadrante inferior direito do gráfico da Figura 44A, porém quase no limite. Ainda entre a Figura 44 A e B , é possível relacionar a amostra 9 (parque do lago) com a % de areia, já que esta amostra foi a que apresentou maior proporção deste nível de granulometria (96,71%) (Tabela 14). Da mesma forma, a amostra de nascente, apresentou o maior teor de argila (51,2%) (Tabela 14). Estas duas últimas amostras citadas encontram-se diretamente relacionadas, em seus respectivos quadrantes, com suas principais características.

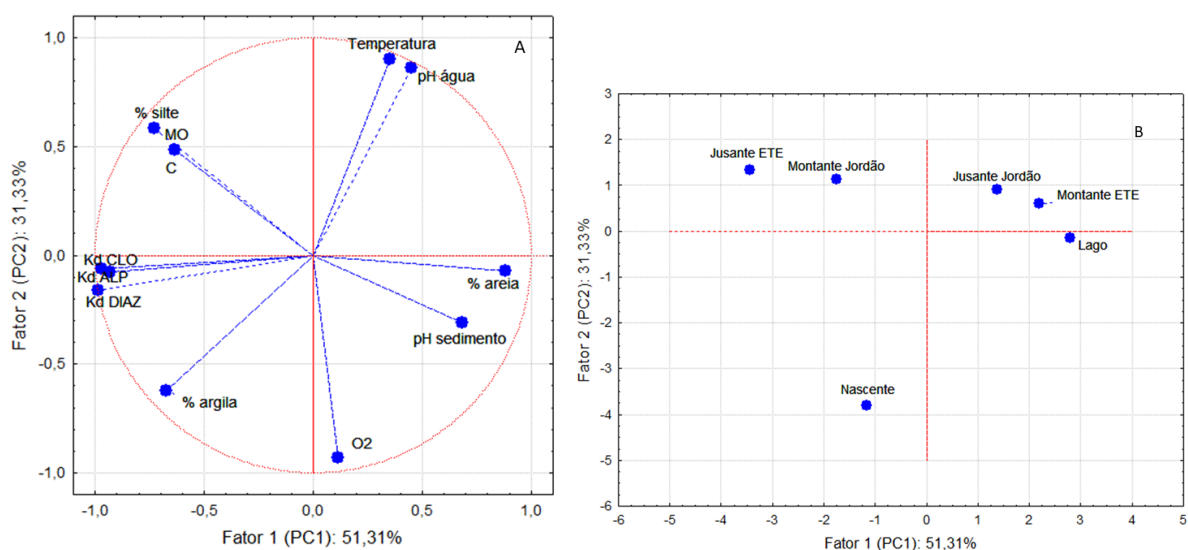


Figura 44. Análise de componentes principais. (A) Gráfico de pesos para PC1 e PC2 (B) Gráfico de escores para as componentes principais 1 e 2.

Além dos gráficos para a análise das variáveis e dos casos, foram também plotados gráficos das coordenadas de cada Fator (1 e 2) para as variáveis avaliadas. A Tabela 16

apresenta os escores das variáveis para o Fator 1 (PC1) e Fator 2 (PC2). Com base nos escores apresentados na Tabela 16, gráficos das coordenadas dos Fatores 1 e 2 foram plotados (Figura 45).

Tabela 16. Escores das variáveis analisadas para PC1 e PC2.

Variáveis	PC1	PC2
1	0,35376	0,90202
2	0,45177	0,86072
3	0,1158	-0,93015
4	-0,63245	0,48671
5	-0,63247	0,48672
6	0,88392	-0,06974
7	-0,72597	0,58288
8	-0,67511	-0,62526
9	-0,93312	-0,07744
10	-0,97152	-0,06092
11	-0,98362	-0,16035
12	0,68462	-0,30832

Observando a Figura 45A, para o Fator 1, é possível notar que as variáveis temperatura da água, pH da água, % de areia e pH dos sedimentos se relacionaram entre si. Da mesma forma, é possível notar que as variáveis MO, C, % de silte, % de argila e K_d para para os três BDZs também tiveram relação entre si. Sendo assim, estes últimos são os fatores que influenciaram no K_d dos fármacos nos sistemas água/sedimentos. Da mesma forma, a Figura 45B, apresenta as variáveis que se relacionaram em termos do Fator 2, avaliado no eixo Y. Pode-se notar que T da água, pH da água, MO, C e % de silte tiveram relação entre si. Por outro lado, as variáveis O_2 , % de argila, % de areia, pH dos sedimentos e o K_d para os BDZs tiveram correlações entre si.

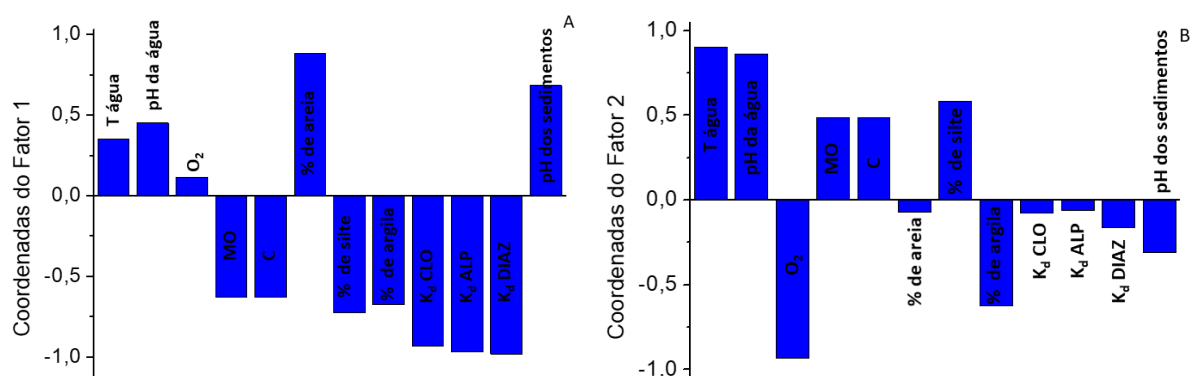


Figura 45. Coordenadas dos Fatores 1 (A) e 2 (B) para as variáveis analisadas na PCA para o estudo do K_d dos BDZs.

De forma geral, observando os resultados de todos os experimentos realizados para a obtenção dos K_d , é possível notar que tanto as características físico-químicas dos fármacos, quanto do ambiente, exercem influência no destino e comportamento dos BDZs no ambiente

aquático. As características dos sedimentos, principalmente o teor de argila e MO, mostraram-se ser extremamente importantes na partição dos fármacos, e, como sedimentos diferentes foram encontrados em um mesmo rio, é possível afirmar que distintos equilíbrios acontecerão no ambiente aquático. Desta forma, diferentes concentrações podem ser determinadas em cada ponto de coleta destas amostras ambientais, sendo necessário uma amostragem adequada e cuidados nos estudos de monitoramento ambiental. Além disso, no que se refere aos aspectos ambientais, os sedimentos contaminados podem se tornar posteriormente uma possível fonte de contaminação para a água e biota, liberando lentamente os fármacos previamente adsorvidos (ROBLES-MOLINA et al., 2014). Pode-se esperar que fatores como alterações da temperatura na água, nos índices pluviométricos, do pH, entre outros possam interferir no equilíbrio de fármacos em sistemas naturais, causando alterações no K_d . De qualquer forma, a exposição dos organismos aquáticos à água e sedimentos contaminados, representa um risco ambiental com extensão ainda não dimensionada.

No que diz respeito aos valores dos K_d obtidos para estes BDZs, apresentados na Tabela 15, estes se aproximaram dos relatados por outros pesquisadores para fármacos em sedimentos. Löffler et al. (2005) avaliaram os K_d para diferentes fármacos, entre eles, o DIAZ e o OXAZ. Os valores encontrados pelos autores foram de 3,0 e 2,2 L Kg⁻¹ para DIAZ e OXAZ, respectivamente. Da mesma forma, outras referências apresentadas por Löffler, relataram K_d em sedimentos que variaram de 4,6 a 6,2 L Kg⁻¹ para o DIAZ e 1,0 a 2,2 L Kg⁻¹ para o OXAZ (LÖFFLER et al., 2005). É importante salientar que os estudos realizados para determinar os K_d no presente trabalho, foram conduzidos com extrações após 15 horas de dopagem dos sistemas água/sedimentos, uma vez que o objetivo era relacionar os K_d com as características físico-químicas dos fármacos, água e sedimentos de diferentes amostras. Por outro lado, Löffler, realizou os estudos de K_d após 30 dias, quando foi atingido o equilíbrio de distribuição para a maioria das drogas. Desta forma, a comparação entre os valores determinados neste trabalho com os apresentados pela literatura, deve levar em consideração que condições experimentais diferentes foram adotadas.

5.7 Análises espectrométricas

A espectrometria de massas é reconhecidamente ideal para detecção, identificação e quantificação de compostos orgânicos em diferentes matrizes. Uma vez que análises voltamétricas utilizando o HMDE possuem seletividade limitada e a confirmação estrutural dos analitos em amostras reais não é possível, um método utilizando MALDI-TOF foi desenvolvido para a detecção de CLO, ALP e DIAZ em amostras de água e sedimentos naturais. Os parâmetros instrumentais foram otimizados. As voltagens das fontes de íon 1 e 2

foram ajustadas para 20 kV e 17,8 kV, respectivamente. A voltagem da lente foi regulada para 7 kV, o tempo de extração do íon de pulso foi de 140 ns e a tensão do detector foi otimizada para 2,4 kV. A potência do laser foi variável, ajustada entre 29 - 40%, dependendo da complexidade da matriz e demanda energética para a ionização.

A otimização da metodologia por MALDI-TOF se iniciou pela avaliação de diferentes matrizes de ionização. O ácido sinapínico (SA), ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB), DHB mais ácido 2-hidroxi-5-metoxibenzoico (SDHB), 2',4',6'-Trihidroxiacetofenona monohidratada (THAP) e ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) foram estudados. A escolha da matriz se deu pela avaliação do sinal de fundo (branco) de cada matriz e a capacidade de promover a ionização dos BDZs, observando a intensidade e resolução dos picos, bem como, a manutenção do padrão isotópico de cada fármaco (Figura 46). Na Figura 46 pode-se observar que os padrões isotópicos esperados para cada BDZ são muito semelhantes entre si. Os três primeiros picos são os principais e foram usados na otimização da metodologia e identificação dos analitos. É possível notar que a intensidade relativa do terceiro pico é cerca de um terço da intensidade do pico principal, sendo este padrão, característico para compostos que contenham cloro.

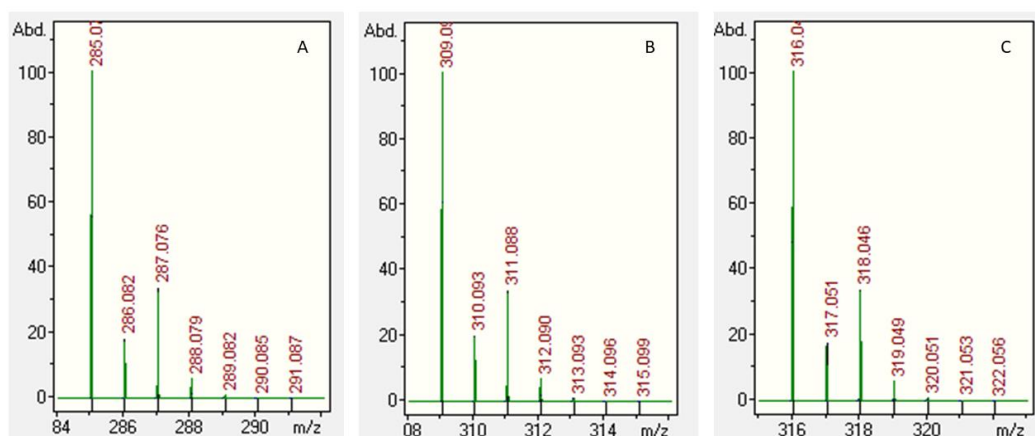


Figura 46. Padrão isotópico dos BDZs (A) DIAZ, (B) ALP e (C) CLO.

As soluções das matrizes foram preparadas conforme procedimentos padrão e 0,5 μL da matriz foram misturados sobre o *target* com 0,5 μL de soluções individuais contendo 1 mg L^{-1} de cada BDZ. Soluções individuais dos BDZs foram usadas nestes estudos para evitar interferências e registrar os espectros de cada fármaco individualmente. Espectros da matriz sem adição dos fármacos também foram adquiridos para fim de comparação. A Figura 47 mostra os espectros obtidos para cada BDZ nas diferentes matrizes.

A Figura 47A mostra os espectros obtidos para o DIAZ nas diferentes matrizes. A intensidade dos picos obtidos variou de 6×10^3 a 1×10^5 . O espectro obtido com SA foi o que apresentou menor intensidade de pico para o DIAZ, além disso, o segundo pico para este

fármaco foi praticamente inexistente. O padrão isotópico foi respeitado. SDHB resultou em picos intensos para o DIAZ, no entanto, o padrão isotópico foi diferente do esperado. Provavelmente o terceiro pico teve colaboração de algum componente da matriz, sendo esta matriz não adequada para determinação do DIAZ. As matrizes DHB, CHCA e THAP foram adequadas. Para o ALP (Figura 47B) o AS também não foi eficiente para auxiliar a ionização do fármaco, e as intensidades de corrente foram as mais baixas embora um pico estreito tenha sido obtido. SDHB interferiu no padrão isotópico do ALP e, portanto, não pode ser utilizado como matriz. Da mesma forma que para o DIAZ, DHB, CHCA e THAP foram adequados, sendo provavelmente o DHB a melhor matriz para o fármaco nestas concentrações. Os espectros apresentados na Figura 47C foram obtidos para o CLO em diferentes matrizes. O SA resultou nas mais baixas intensidades de pico para o fármaco, com inadequada razão sinal/ruído. As matrizes DHB, THAP e SDHB, não foram adequadas para o CLO pois as intensidades de pico foram baixas e o padrão isotópico não foi respeitado. Por outro lado, o espectro obtido com CHCA resultou em picos bem definidos com intensidades adequadas para o CLO. Sendo assim, como a utilização do CHCA como matriz proporcionou a aquisição de espectros adequados, com satisfatória intensidade e resolução de pico para os três BDZs, esta matriz foi escolhida para os próximos estudos. O CHCA vem sendo utilizado como matriz para análises por MALDI-TOF por vários pesquisadores (NOZAWA et al., 2015, 2016; SALA-COMORERA et al., 2016). Esta preferência, deve-se a melhor homogeneidade da fina camada de matriz recristalizada sobre o *target* (Figura 7A) e aos bons resultados obtidos com o CHCA, inclusive para analitos de baixa massa molecular.

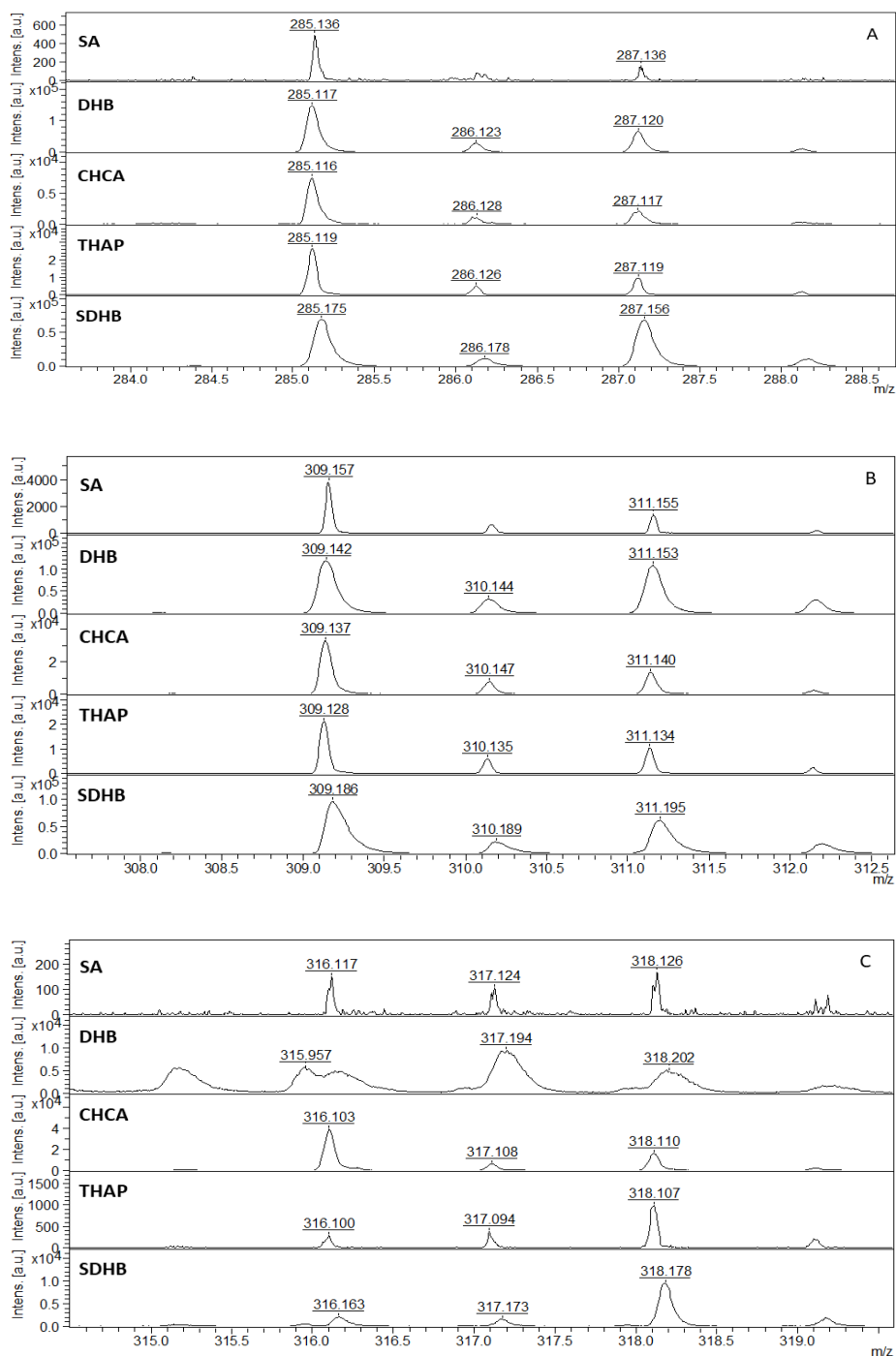


Figura 47. Espectros obtidos nos estudos de escolha de matriz para a determinação do (A) DIAZ, (B) ALP e (C) CLO.

Após determinada a melhor matriz para os estudos com BDZs, a concentração da solução de CHCA foi avaliada em duas concentrações, 1,0 e 20 mg mL⁻¹. Como os analitos podem estar em baixas concentrações nas amostras ambientais, a concentração da matriz foi avaliada para tentar diminuir interferências provenientes da própria matriz. Os espectros apresentados a seguir foram obtidos em altas (20 mg mL⁻¹) e baixas concentrações (1,0 mg mL⁻¹) de matriz para 1 mg L⁻¹ de DIAZ, ALP e CLO. A Figura 48A apresenta os picos referentes à determinação do DIAZ empregando solução saturada da matriz. Os picos

apresentaram boa resolução, com adequada intensidade e pequena largura de pico, além de padrão isotópico característico. O espectro obtido com solução mais diluída da matriz (Figura 48B) apresenta também o padrão isotópico característico e pico estreito e agudo, entretanto, a intensidade relativa é consideravelmente menor. Comportamento semelhante pode também ser observado para o ALP e CLO. Os espectros obtidos com a solução saturada da matriz (Figura 48C e E) tiveram melhor sinal analítico que os espectros obtidos com a solução de 1,0 mg mL⁻¹ (Figura 48 D e F). Para o CLO na Figura 48F, o sinal analítico está praticamente na mesma intensidade que o sinal de fundo. Sendo assim, a solução saturada de 20 mg mL⁻¹ foi escolhida para seguir com os estudos devido à adequada resolução e intensidade de pico proporcionada aos fármacos. Posteriormente, a concentração da matriz foi novamente avaliada em uma faixa de concentração de 0,5 a 2,0 mg mL⁻¹ utilizando uma concentração mais baixa de BDZs (100 µg L⁻¹) (espectros não apresentados). Os resultados obtidos no estudo novamente apontaram para o uso de soluções saturadas da matriz. A concentração da matriz, é frequentemente estudada, com o objetivo de se obter espectros mais “limpos”.

Nozawa et al. (2016) avaliaram diferentes concentrações da matriz e do solvente no qual foi preparada. As concentrações de 0, 0,4, 0,7, 1, 1,5 e 2 mg mL⁻¹ em 50 a 100% de ACN foram estudadas para a determinação de fármacos antidepressivos e drogas relacionadas em fluidos biológicos. A melhor condição determinada pelos autores foi a concentração de 0,7 mg de CHCA mL⁻¹ em ACN/etanol/H₂O (85:5:10) (NOZAWA et al., 2016). Nozawa et al. (2015) também escolheu o CHCA como matriz para a determinação de oito benzodiazepínicos e dois metabolitos em sangue. Concentrações de 0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,7, 1,0 1,5 e 2 mg mL⁻¹ em 50 a 100% de solução de ACN foram testadas. As condições consideradas ideais foram 0,7 mg mL⁻¹ de CHCA em solução de ACN/etanol/H₂O (90:5:5) (NOZAWA et al., 2015). Pérez-Sancho et al. (2017), por outro lado, utilizaram solução saturada de CHCA preparada em ACN/TFA (2,5%) (1:1) para a diferenciação de bactérias empregando MALDI-TOF.

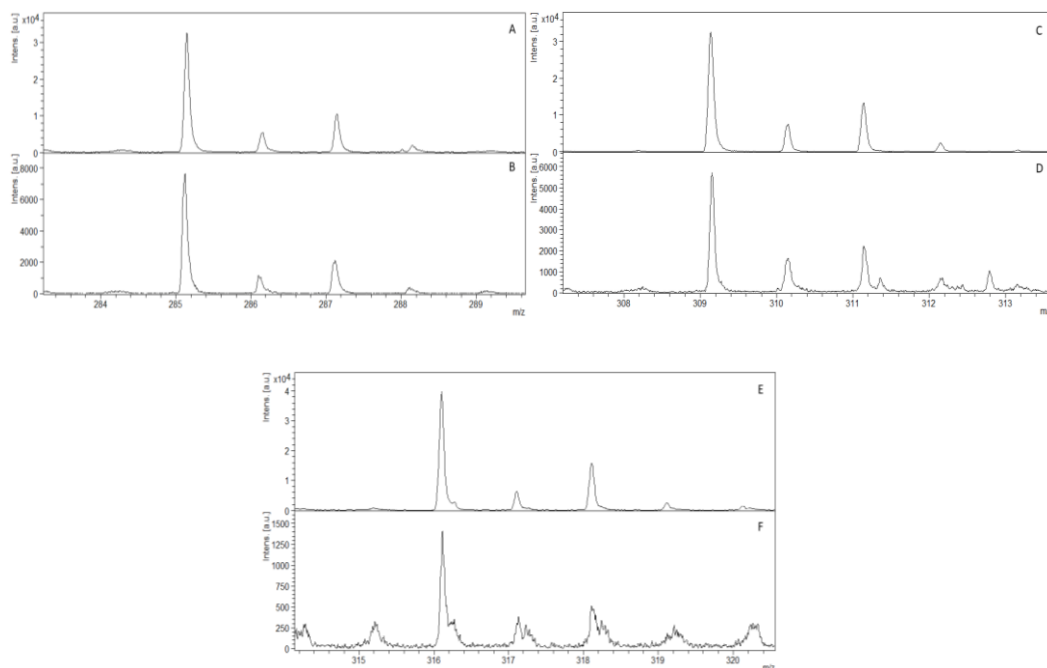


Figura 48. Espectros obtidos para a determinação de 1 mg L⁻¹ de DIAZ, ALP e CLO em altas (A, C e E) e baixas (B, D e F) concentrações da matriz respectivamente.

Após a otimização da matriz e sua concentração, o método desenvolvido foi empregado em amostras naturais de água e sedimentos. Análises diretas das amostras de água não foram possíveis, devido ao pobre limite de detecção da técnica e às interferências de matriz (amostra). No geral, o preparo de amostra é uma etapa determinante para o sucesso das análises espectrométricas por MALDI. Sendo assim, duas formas de extração e pré-concentração para as amostras de água foram avaliadas, a SPE (*Solid Phase Extraction*) e a QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*). Uma coluna de fase reversa Stracta - X C18 da Phenomenex foi utilizada nas extrações. Primeiramente ensaios foram realizados com água ultrapura, para avaliar as condições de eluição e capacidade de extração e pré-concentração do SPE. 0,5 mL de uma solução contendo 200 μ L⁻¹ dos BDZs foi passada através da coluna SPE, a qual foi eluída com diferentes composições de fase extratora: H₂O; H₂O/ACN (9:1); H₂O/ACN (7:3); H₂O/ACN (1:1); H₂O/ACN (2:8) e ACN (espectros não apresentados). Este estudo revelou que os BDZs foram extraídos na condição de H₂O/ACN (7:3), sendo, portanto, esta a melhor condição de eluição em SPE. Definidas as condições de *cleanup* (lavagem da coluna sem remover os analitos) e eluição, um novo estudo foi conduzido com 20 mL de água ultrapura enriquecida com 0,5 μg L⁻¹ dos três BDZs para determinar o LD do método. Toda a solução preparada foi passada através da coluna previamente condicionada e equilibrada com 1 mL de acetonitrila e água respectivamente, em um fluxo de 1 mL min⁻¹. Após a passagem da amostra, o cartucho foi lavado com 1 ml de H₂O/ACN (9:1) e eluído com 1 mL de H₂O/ACN (7:3) durante um minuto. O espectro obtido revelou a recuperação do DIAZ (m/z, 285,020) e do ALP (m/z, 309,027), com picos

característicos, além de outros picos (m/z , 294, 296, 304, 312 e 313), provavelmente provenientes da matriz, entretanto, o CLO (m/z , 316) não foi detectado (Figura 49). Os espectros anteriormente apresentados revelaram que o CLO não possui uma boa resposta analítica e, como neste estudo foi utilizada uma concentração mais baixa, este fármaco não foi detectado. Os limites de detecção do método foram determinados pela análise de soluções cada vez mais diluídas. Sendo assim, o LD para ALP e DIAZ foi a concentração utilizada neste estudo, já que em concentrações inferiores à $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ estes fármacos foram indetectáveis. O limite de detecção para o CLO em água ultrapura não foi determinado.

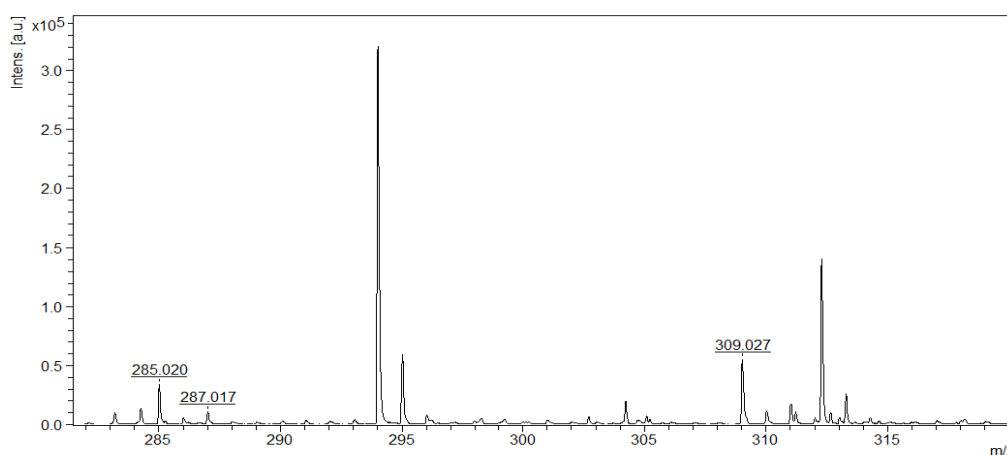


Figura 49. Espectro obtido no estudo de extração e pré-concentração de BDZs de água ultrapura utilizando coluna SPE. Estudo conduzido com solução contendo $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ dos BDZs.

Amostras de água do Red River (amostra 12) foram também enriquecidas para determinar o LD para os BDZs em amostras reais empregando SPE como forma de pré-concentração e extração. Soluções contendo 10, 5 e $2 \mu\text{g L}^{-1}$ dos BDZs foram preparadas em 10 mL e extraídas. Os extratos foram evaporados, reconstituídos em $10 \mu\text{L}$ de ACN/ H_2O (7:3) e analisados. O espectro da solução contendo $2 \mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos mostrou ausência dos picos dos fármacos, sendo a concentração utilizada neste ensaio inferior ao LD. DIAZ e ALP foram detectados na solução enriquecida com $5 \mu\text{g L}^{-1}$ dos BDZs e o espectro obtido neste ensaio está apresentado na Figura 50. É possível notar nesta figura, uma linha de base com mais ruídos, devido provavelmente aos componentes presentes na água analisada. Porém, os picos do DIAZ e ALP podem ser perfeitamente visualizados e, apresentam boa resolução e característico padrão isotópico apesar da baixa intensidade. O CLO não foi detectado em nenhuma das soluções analisadas. Como a concentração destas drogas no ambiente dificilmente será maior que $10 \mu\text{g L}^{-1}$, não se fez relevante a avaliação do LD para o CLO por MALDI.

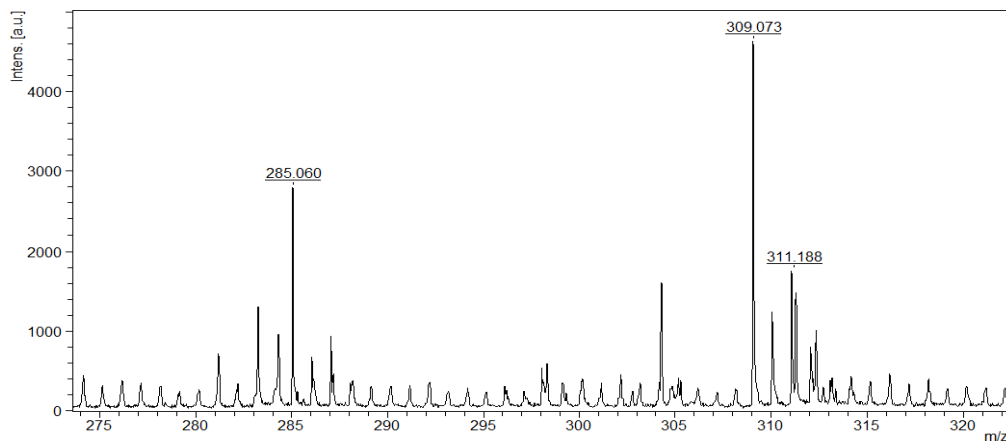


Figura 50. Espectro obtido no estudo de extração e pré-concentração de BDZs de água superficial do Red River utilizando coluna SPE. Estudo conduzido com solução contendo $5 \mu\text{g L}^{-1}$ dos BDZs.

A outra forma de extração avaliada para as amostras aquosas, QuEChERS, como o próprio nome diz, é rápida, fácil, barata e eficiente. O método empregado foi adaptado de Westland e Dorman (2013). Para estes estudos, 0,5 mL de amostra foram adicionados a um tubo Eppendorf de 1,5 mL com 0,5 mL de ACN. A solução foi agitada por 1 minuto em vortex. Em seguida, foram adicionados 0,2 g de MgSO_4 e 0,05 g de NaCl, a mistura foi novamente agitada em vortex por mais 1 minuto. O sobrenadante foi removido e evaporado sobre fluxo de ar, reconstituído com 10 μL de uma solução de acetonitrila/água (7:3) e analisado. Soluções contendo 10,0, 5,0 e 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ dos BDZs foram preparadas com água do Red River, extraídas e analisadas. Os limites de detecção para o DIAZ, ALP e CLO em amostra real empregando QuEChERS como forma de extração foram de 2,5, 5,0 e 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Os resultados deste estudo estão apresentados na Figura 51. Na Figura 51A está apresentado o espectro obtido para a amostra real na ausência dos BDZs. É possível notar a presença de alguns picos em aproximadamente 288, 294, 295, 303 e 320, entretanto, os picos dos fármacos não estão presentes. Na Figura 51B está apresentado o espectro obtido com amostra de água do Red River enriquecida com 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de BDZs. Os sinais analíticos do DIAZ (285,078 a 287,078) e do ALP (309,087 a 311,085) apresentaram adequada intensidade e resolução e o padrão isotópico foi respeitado. Por outro lado, os picos referentes ao CLO apresentaram baixa resolução, na ordem de grandeza dos ruídos. Sendo assim, como os LD obtidos para o CLO, com ambas as formas de extração, não foram adequados e este fármaco apresentou baixa sensibilidade às determinações por MALDI-TOF, os estudos seguiram apenas com o DIAZ e o ALP. No que se refere à forma de extração, QuEChERS se mostrou mais adequada, por ser mais rápida, barata e eficiente, resultando em uma adequada extração, pré-concentração e purificação da amostra, uma vez que as interferências foram consideravelmente minimizadas.

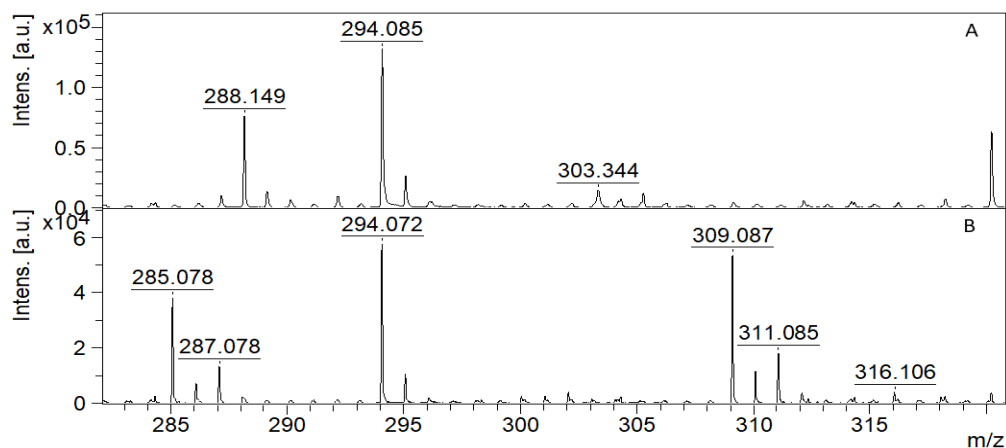


Figura 51. Espectros obtidos nos estudos de extração e pré-concentração de BDZs de água superficial do Red River utilizando método QuEChERS. (A) Amostra sem os BDZs. (B) Amostra contendo $10 \mu\text{g L}^{-1}$ dos BDZs.

No que se refere aos LD, os BDZs puderam ser detectados nas concentrações de $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ (DIAZ), $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ (ALP) e $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (CLO) em água natural empregando QuEChERS. Os valores de LD determinados foram bons, entretanto, podem não ser adequados para amostras ambientais. Embora alguns pesquisadores tenham reportado concentrações de fármacos próximas aos LD alcançados no presente trabalho, estes contaminantes emergentes (CE) podem estar presentes no ambiente em níveis de ultra traço até ng L^{-1} (BRODIN et al., 2013; DA SILVA et al., 2011; NUNES et al., 2015). Da Silva, por exemplo, encontrou resíduos de fármacos em águas superficiais em concentrações que variaram de ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$. Sendo assim, os LD determinados no presente trabalho, tanto por QuEChERS quanto por SPE, podem ser muito altos em alguns casos. No que diz respeito à determinações de fármacos em águas naturais e residuárias, extrações em fase sólida (SPE) têm sido empregadas com sucesso (MONTAGNER; JARDIM, 2011; TERNES; BONERZ; SCHMIDT, 2001). No presente trabalho, uma coluna SPE foi avaliada, porém o desempenho apresentado por este dispositivo foi inferior ao apresentado pelo método QuEChERS de extração. Os limites de detecção foram de $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para DIAZ e ALP em águas naturais. Este resultado pode ser devido a não terem sido alcançadas as condições ótimas para pré-concentração, *cleanup* e eluição das drogas no SPE. Estudos mais aprofundados poderiam resultar em um desempenho melhor para esta forma de extração e pré-concentração. Outro fator relevante, foi o volume de amostra utilizado. Montagner e Jardim (2011), por exemplo, passaram através de um cartucho HLB OASIS 500-mg, 1000 mL de água superficial para pré-concentrar 15 CE. Este volume é 50 vezes maior que o volume de amostra de água superficial usado no presente trabalho para a pré-concentração com o SPE e 2.000 vezes maior que o volume utilizado nas extrações pelo método QuEChERS. Sendo assim, os resultados obtidos com o SPE poderiam ser melhorados, reavaliando as condições para a coluna SPE e

aumentando o volume de amostra. Para a forma QuEChERS de extração, o aumento do volume de amostra também resultaria em melhorias nos LD.

As amostras de sedimentos coletadas no Red River foram também enriquecidas com $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$ dos BDZs e extraídas para otimização do método de extração. Duas diferentes formas de extração foram avaliadas. Primeiramente, utilizou-se a metodologia adaptada de Sundelin (2013), que realizou a extração de BDZ dos sedimentos do lago Ekoln na cidade de Uppsala na Suécia. Os fármacos foram detectados em sedimentos de mais de 20 cm de profundidade, que correspondiam a mais de 20 anos de deposição, em concentrações que variaram de $0,05$ a $5,14 \mu\text{g Kg}^{-1}$. A extração foi realizada em duas etapas, sendo a primeira uma mistura de acetato de etila com metanol (1:1) e a segunda metanol + água (7:3) + 5% de trietilamina. $0,1$ g de sedimentos e 1 mL do solvente de cada etapa foram utilizados. O outro experimento de extração foi conduzido com $0,1$ g de sedimentos extraídos duas vezes com 1 mL de metanol e em seguida duas vezes com 1 mL de acetona. Este método foi adaptado de Ternes et al. (2005), que realizaram a extração e determinação de fármacos, contrastes iodados e fragrâncias de musk de lodo ativo e digerido.

Ambos os métodos de extração resultaram em espectros “poluídos” com muitos picos referentes a compostos extraídos da matriz, sendo assim, a identificação do DIAZ e do ALP não foi possível (espectros não apresentados). Deste modo, foi necessária a otimização de procedimentos de *cleanup* para reduzir estas interferências. Usualmente, colunas de SPE são empregadas para *cleanup*, assim como o HPLC em alguns casos. Como o SPE não se mostrou adequado nas extrações de BDZs de águas naturais, foi necessário primeiramente compreender as interações dos fármacos com a fase móvel e a estacionária e determinar a melhor condição de eluição dos analitos da fase estacionária. Sendo assim, medidas cromatográficas foram realizadas em um HPLC com detector 2998 PDA. O comprimento de onda selecionado foi de λ 250 nm. Uma coluna Synergi $4 \mu\text{m}$ Polar – RP 80 A, $50 \times 4,6$ mm $4 \mu\text{m}$ foi utilizada para a separação dos compostos. As condições de fluxo da fase móvel estão apresentadas na Tabela 17. A fase móvel consistiu de A (H_2O com 0,1% de ácido acético (HAC)) e B (metanol com 0,1% de HAC). As condições cromatográficas foram adaptadas de Racamonde et al. (2014).

Tabela 17. Condições de fluxo da fase móvel para corrida cromatográfica.

Etapa	Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	% A	% B
1		1.0	60	40
2	5	1.0	60	40
3	6	0.5	50	50
4	8	0.5	0	100
5	10	0.5	0	100
6	13	0.5	10	90
7	14	0.5	60	40
8	16	1.0	60	40

A eluição por gradiente, como mostrada na Tabela 17, resultou no cromatograma apresentado a seguir na Figura 52. Os tempos de retenção de 10,2705, 10,6926 e 10,8935 para CLO, ALP e DIAZ respectivamente foram observados, mostrando que uma maior proporção do solvente orgânico é necessária para a remoção dos fármacos. Entretanto, é possível notar que os fármacos foram eluídos entre a etapa 5 e 6, ou seja, quando a proporção A/B estava indo de (0:1) para (1:9). Outros experimentos foram realizados, mantendo 100% de B por mais tempo, porém os BDZs não foram removidos, a eluição só iniciava com a diminuição da proporção de B (experimentos não apresentados). No cromatograma, ainda é possível notar que os picos referentes a 1 mg L^{-1} dos BDZs foram adequadamente separados, tiveram boa intensidade e baixa largura. Embora nas análises por MALDI-TOF o CLO não estivesse mais sendo estudado, este fármaco foi injetado no cromatógrafo somente para avaliar seu comportamento e confirmar que estava sendo retido e eluído corretamente dos materiais adsorventes compostos por C18.

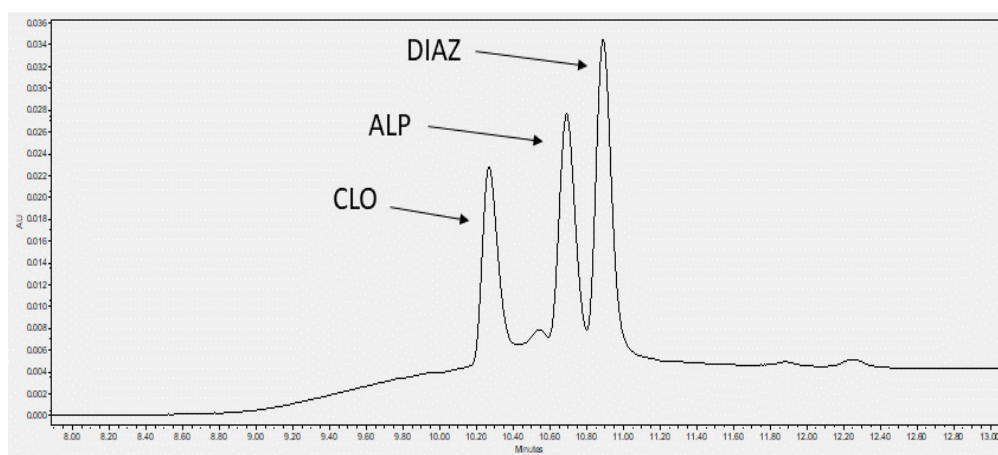


Figura 52. Cromatogramas obtidos para solução de 1 mg L^{-1} de BDZs preparada em água ultrapura. λ 250 nm e coluna Synergi 4 μm Polar – RP 80 A, 50 x 4.6 mm 4 μm . Fase móvel A (H_2O com 0,1% de HAC), B (metanol com 0,1% de HAC), condição de eluição por gradiente.

Após determinada a fase móvel e as condições de eluição, o método otimizado por HPLC foi empregado em uma amostra real de sedimentos do Red River (0,1g) enriquecida com 50 ng dos analitos. Os extratos destes sedimentos foram extraídos usando o

procedimento proposto por Ternes et al. (2005), que empregava duas extrações consecutivas com metanol e acetona, respectivamente. Os cromatogramas obtidos neste estudo estão apresentados na Figura 53. É possível notar a presença de 4 picos nos tempos de retenção aproximados de 10,2, 10,7, 10,9 e 12,7 minutos. O cromatograma em vermelho, corresponde à amostra de sedimento do Red River enriquecida com 50 ng dos BDZs. Quatro picos podem ser observados, entretanto o primeiro, em um tempo de retenção próximo ao do CLO, teve intensidade muito superior aos picos do ALP e DIAZ. Além disso, em comparação com o pico do CLO em solução padrão, cromatograma em preto, este pico se apresenta levemente deslocado para um tempo de retenção menor. Sendo assim, provavelmente ocorreu uma sobreposição do sinal do CLO pelo sinal de outro composto presente na amostra.

Os sinais do ALP e do DIAZ na amostra real coincidiram com os obtidos em solução padrão no que diz respeito ao tempo de retenção. O quarto pico presente na amostra real, foi eluído em aproximadamente 12,7 minutos. Este pico não foi identificado (n.i.), sendo possivelmente algum composto extraído dos sedimentos. No cromatograma em azul, pode ser observado uma diminuição da intensidade do primeiro e quarto pico e um aumento da intensidade dos picos do ALP e DIAZ. Isso ocorreu porque foi realizada uma adição de padrão sobre a amostra para verificar o comportamento dos picos observados no primeiro cromatograma. Esta adição dobrou o volume da solução, dobrando a concentração do ALP e do DIAZ e reduzindo à metade a concentração dos outros compostos presentes na solução. Todos os estudos realizados com HPLC foram de caráter qualitativo, apenas para a compreensão dos processos de pré-concentração, separação e eluição dos compostos, bem como para avaliar a fase móvel usada por Ternes et al. (2005).

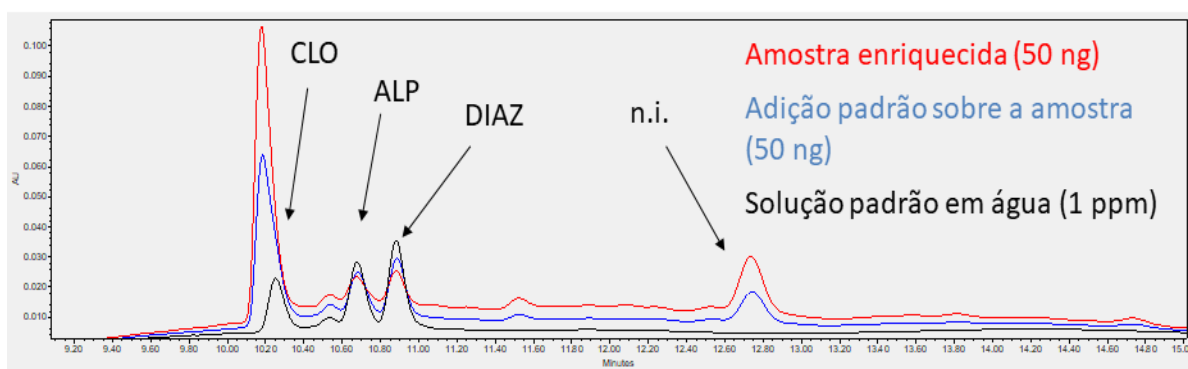


Figura 53 Cromatogramas obtidos com amostra real de sedimentos enriquecida com 50 ng dos BDZs. As condições de eluição descritas na Tabela 17 foram utilizadas.

Os resultados obtidos nos estudos com HPLC apontaram que a eluição por gradiente, usando a fase móvel H₂O com 0,1% de HAC (A) e metanol com 0,1% de HAC (B), foi adequada para a remoção dos BDZs. Sendo assim, estes solventes foram utilizados para a realização do *cleanup* da amostra. Tanto o HPLC quanto colunas de SPE são relativamente

custosas e consomem grandes quantidades de solventes. Desta forma, a miniaturização do sistema foi proposta para acelerar o processo e diminuir custos e resíduos, sendo escolhida a realização do *cleanup* através de uma microextração em fase sólida, chamada StageTip, previamente à determinação por MALDI-TOF.

Para o *cleanup* empregando StageTips, os extratos obtidos com o método adaptado de Ternes et al. (2005), foram completamente evaporados e então reconstituídos com 200 μL de solução 2% de metanol em água. Foi escolhido trabalhar com solução contendo apenas 2% de metanol para não interferir na interação dos analitos com a fase estacionária. Os extratos reconstituídos foram então passados por uma microcoluna de ponteira artesanal (StageTip, com 5 camadas de disco Empore SPE 2215 – C18 (octadecil) 47 mm, 3M) previamente condicionada e equilibrada com 100 μL de metanol e água, respectivamente. Um fluxo de 1 mL min^{-1} foi respeitado para favorecer a adsorção dos analitos no C18. A fase móvel utilizada na eluição foi a mesma utilizada nas medidas cromatográficas, composta por água (A) e metanol (B), ambas soluções com 0,1% de ácido acético.

As condições de eluição foram otimizadas visando aumentar o sinal analítico dos BDZ através da remoção dos interferentes da matriz sem perder o analito. Em testes iniciais empregando a microcoluna, por MALDI TOF, se percebeu que os analitos foram eluídos na proporção de A/B (4:6), no entanto, uma grande quantidade de interferentes foram eluídos simultaneamente (espectros não apresentados). Em seguida, foram avaliadas condições com menor proporção de B para a remoção dos interferentes da matriz sem que ocorresse a eluição dos BDZs. A proporção A/B (6:4) foi então testada para a etapa de lavagem (Figura 54A). É possível notar nesta figura que, embora de baixa intensidade, os sinais do DIAZ e do ALP podem ser visualizados, indicando que estes fármacos começaram a ser eluídos nestas condições de fase móvel. Além dos picos dos fármacos, podem ser vistos ainda, outros picos provenientes da matriz (CHCA) e da amostra extraída. A coluna de microextração foi então eluída com A/B (4:6) (Figura 54B), onde observou-se a presença dos analitos no espectro. A condição A/B (4:6) foi capaz de remover completamente os fármacos, pois, estes não foram detectados na eluição seguinte, composta por 100% de B (Figura 54C). Deste modo, foi necessária a avaliação de solventes de lavagem com proporção de B menor que 40%.

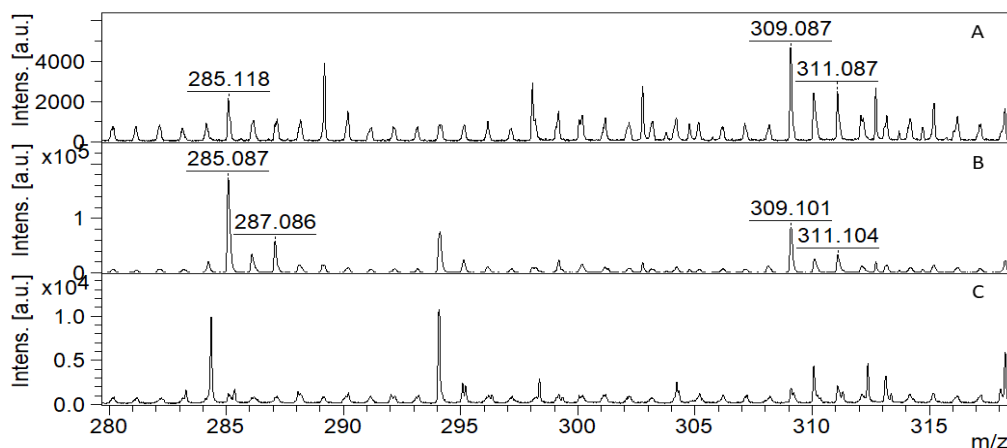


Figura 54. Espectros obtidos na otimização do procedimento de *cleanup* em extrato de sedimentos do Red River enriquecidos com $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$ de DIA e ALP. (A) Proporção A/B (6:4). (B) Proporção A/B (4:6). 100% B.

Um novo teste para a otimização da etapa de *cleanup* da amostra foi realizado com soluções mais diluídas do solvente orgânico (B). Nestes novos testes, a microcoluna com os BDZs foi lavada com $100 \mu\text{L}$ da solução A/B (9:1) e em seguida mais $100 \mu\text{L}$ de A/B (7:3) para remover os interferentes. Em nenhuma destas condições os BDZs foram eluídos, sendo assim, apenas impurezas da amostra foram removidas (espectros não apresentados). Após a limpeza, a microcoluna foi eluída com $100 \mu\text{L}$ da solução A/B (4:6), que se mostrou eficiente para a remoção dos fármacos. O extrato foi então evaporado usando um fluxo de ar e reconstituído com $10 \mu\text{L}$ de ACN/ H_2O (7:3). $0,5 \mu\text{L}$ da amostra foram depositados sobre o *target*, misturados com o mesmo volume da solução da matriz, secos e em seguida analisados. Como pode ser visto na Figura 55, as condições de *cleanup* otimizadas foram eficientes na remoção da maior parte dos interferentes, caracterizado pela diminuição da presença de picos. Além disso, ótimos sinais foram obtidos para o DIAZ, m/z 285,09 $[\text{M} + \text{H}]^+$ e ALP, m/z 309,09 $[\text{M} + \text{H}]^+$, com adequada intensidade e resolução, além da manutenção do padrão isotópico.

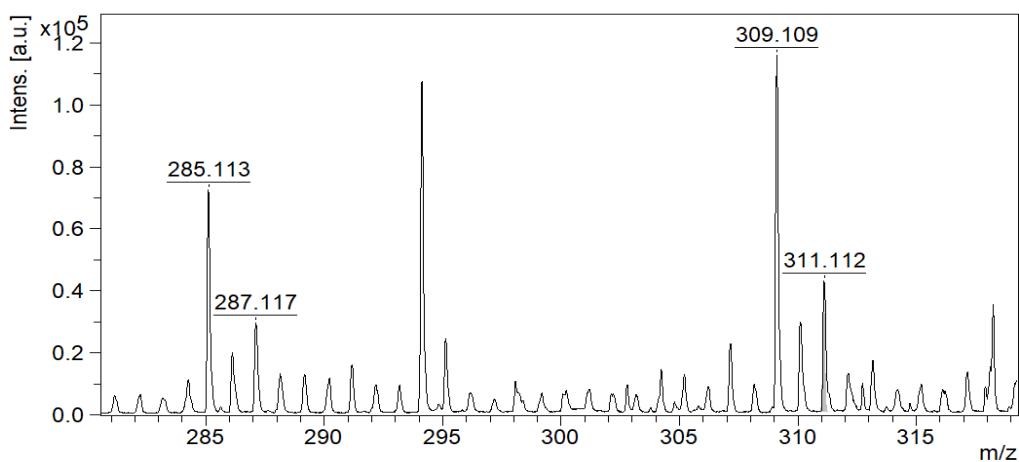


Figura 55. Espectros obtidos com as condições otimizadas de extração e cleanup para a detecção de $0,4 \mu\text{g g}^{-1}$ de DIAZ e ALP em sedimentos do Red River.

Após a otimização das condições de extração dos BDZs dos sedimentos e etapa de *cleanup*, o método desenvolvido foi aplicado em amostras contendo baixas concentrações de DIAZ e ALP para avaliar o LD alcançado para estes fármacos. Nestes estudos, $0,2$ e $0,4$ g de sedimentos foram enriquecidos com 80 e 40 ng g^{-1} dos fármacos, respectivamente. Os sedimentos foram extraídos e analisados. Os espectros obtidos para os dois experimentos apresentaram os sinais analíticos do DIAZ e ALP com boa resolução e intensidade de pico. Portanto, o limite de detecção alcançado para o método desenvolvido na determinação destes fármacos em sedimentos foi de 40 ng g^{-1} para ambos os fármacos. No que diz respeito à concentração de fármacos em sedimentos, foram relatadas concentrações ligeiramente menores ou maiores que o LD alcançado neste trabalho (CARMONA; ANDREU; PICÓ, 2014; HONEYCHURCH; HART, 2014; MARTI, 2010). Entretanto, é importante notar que $0,4$ g de sedimentos foram utilizados e, desta forma, assim como para as amostras de água, a massa de amostra poderia ser aumentada, alcançando LD mais baixos.

As metodologias desenvolvidas foram aplicadas em amostras naturais de água e sedimentos coletadas no Canadá e no Brasil. Sedimentos coletados nos sítios de amostragem de número 1 e 8 e sedimentos e águas naturais coletados nos pontos de 12 a 16 foram analisados. Embora os sedimentos coletados no ponto 8, após a estação de tratamento de esgoto, fossem propícios à contaminação por fármacos, assim como as amostras coletadas no Seine River, próximo a um hospital na cidade de Montreal, os BDZs não foram determinados nestas amostras, bem como em todas as outras amostras analisadas. Sendo assim, a concentração destes BDZs nas amostras analisadas foi abaixo dos limites de detecção alcançados pelo método.

6 CONCLUSÕES

As metodologias voltamétricas otimizadas e validadas resultaram em adequados sinais para ambos os fármacos (DIAZ e CLO). Interferências para o DIAZ foram observadas na presença de outros BDZs, como o LORAZ e CLO, indicando que o método não é seletivo para o DIAZ, detectando DIAZ, LORAZ e CLO no mesmo potencial. Entretanto, as interferências ao DIAZ causadas pelo CLO puderam ser satisfatoriamente resolvidas através da subtração da corrente referente ao CLO no potencial de pico do DIAZ. A interferência causada pelo LORAZ não foi muito significativa. De qualquer forma, vale destacar que os três fármacos são potencialmente tóxicos à biota, não se fazendo distinção entre eles. Fármacos de outras classes não apresentaram quaisquer interferências na determinação do DIAZ. No que diz respeito ao CLO, interferências causadas por outros fármacos ao método desenvolvido não foram observadas. Adequados limites de quantificação, precisão e exatidão também foram obtidos para ambos os métodos. Análises voltamétricas de sedimentos e águas naturais foram realizadas, entretanto, o CLO, ALP e DIAZ não foram detectados em nenhuma amostra. A literatura apresenta concentrações de BDZs em amostras naturais próximas aos LD obtidos, entretanto, em algumas amostras, estes fármacos podem estar presentes em concentrações na ordem de ng L^{-1} . Sendo assim, formas de pré-concentração e *cleanup* como SPE poderiam ser empregadas para diminuir consideravelmente os limites de detecção da técnica. Além disso, possíveis interferências de matriz poderiam ser minimizadas. No sentido da confirmação estrutural dos analitos, um método de análise por MALDI-TOF também foi desenvolvido para os BDZs. O método espectrométrico otimizado mostrou-se ideal para a identificação dos BDZ, com exceção para o CLO. Entretanto, os limites de detecção obtidos por MALDI-TOF foram superiores aos encontrados por voltametria devido às limitações da própria técnica. Melhorias nas formas de pré-concentração poderiam fazer desta técnica, uma excelente ferramenta de detecção de compostos orgânicos em amostras ambientais, devido ao seu detector de massas. O método espectrométrico desenvolvido foi empregado em amostras de água e sedimentos do Canadá e em duas amostras do Brasil. Para todas as amostras analisadas, a concentração dos BDZs foi abaixo dos LD. Além dos estudos de monitoramento, os métodos voltamétricos desenvolvidos para o CLO, ALP e DIAZ foram empregados na avaliação do K_d destas drogas em sistemas enriquecidos com os BDZs. Os estudos revelaram que as características físico-químicas dos fármacos e dos sistemas, podem afetar o comportamento e destino destas drogas no ambiente. A composição dos sedimentos mostrou exercer forte influência sobre o K_d , uma vez que os fármacos interagiram mais fortemente

com os sedimentos com maior teor de argila e matéria orgânica. Diferentes composições de sedimentos e conseqüentemente diferentes K_d foram observados em um mesmo rio. Estes resultados revelam que amostragens em um único ponto, com a finalidade de monitoramento ambiental, podem resultar em um levantamento de dados equivocados, já que diferentes equilíbrios entre sedimentos e água podem existir. Além disso, em um pico de baixa concentração de fármacos na água, os sedimentos podem funcionar como fontes de contaminação desorvendo as drogas previamente acumuladas, pois o K_d consiste em um equilíbrio dinâmico. Sendo assim, os organismos aquáticos podem estar constantemente expostos à baixas concentrações de diversos fármacos. Usualmente, águas superficiais são foco de estudo quando se trata de análises ambientais, entretanto, fica claro que os sedimentos são tão importantes quanto a água e este sistema água/sedimentos deveria ser avaliado como um todo.

ARTIGOS PUBLICADOS RESULTANTES DA PESQUISA DE MESTRADO E DOUTORADO

Anal Bioanal Chem (2015) 407:6171–6179
DOI 10.1007/s00216-015-8792-1

RESEARCH PAPER

New approach to the determination of contaminants of emerging concern in natural water: study of alprazolam employing adsorptive cathodic stripping voltammetry

Chalder Nogueira Nunes¹ · Lucas Ely Pauluk¹ ·
Vanessa Egéa dos Anjos² · Mauro Chierici Lopes¹ ·
Sueli Pércio Quináia¹

I

Hindawi Publishing Corporation
Journal of Analytical Methods in Chemistry
Volume 2016, Article ID 3217080, 7 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2016/3217080>



Research Article

Rapid Screening Method for Detecting Ethinyl Estradiol in Natural Water Employing Voltammetry

Chalder Nogueira Nunes,¹ Lucas Ely Pauluk,¹ Maria Lurdes Felsner,¹
Vanessa Egéa dos Anjos,² and Sueli Pércio Quináia¹

Full Paper

Wiley Online Library

ELECTROANALYSIS

DOI: 10.1002/elan.201700566

Determination of Diazepam and Clonazepam in Natural Water – a Voltammetric Study

Chalder Nogueira Nunes,^{*,[a]} Vanessa Egéa dos Anjos,^[b] and Sueli Pércio Quináia^[a]

Quim. Nova, Vol. 41, No. 2, 189-201, 2018

<http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170154>

A VERSATILIDADE DO ELETRODO DE GOTA PENDENTE DE MERCÚRIO EM QUÍMICA ANALÍTICA – UMA REVISÃO SOBRE RECENTES APLICAÇÕES

Chalder Nogueira Nunes^a, Vanessa Egéa dos Anjos^b e Sueli Pércio Quináia^{*,*}

^aDepartamento de Química, Universidade Estadual do Centro-Oeste, 85040-080 Guarapuava – PR, Brasil

^bDepartamento de Química, Universidade Estadual de Ponta Grossa, 84030-900 Ponta Grossa – PR, Brasil

Recebido em 30/05/2017; aceito em 20/09/2017; publicado na web em 13/11/2017

Revisão

7 REFERÊNCIAS

- ABREU, E. T. et al. Avaliação da resistência a antibióticos de bactérias isoladas de efluente hospitalar. **Acta Scientiarum - Technology**, v. 32, p. 1–5, 2010.
- ALEIXO, L. M. Voltametria : Conceitos E Técnicas. **Chemkeys**, p. 1–40, 2003.
- ALLEN, H. E.; FU, G.; DENG, B. Analysis of acid-volatile sulfide (AVS) and simultaneously extracted metals (SEM) for the estimation of potential toxicity in aquatic sediments. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 12, n. 8, p. 1441–1453, 1993.
- ÁLVAREZ-RUIZ, R. et al. Simultaneous determination of traditional and emerging illicit drugs in sediments, sludges and particulate matter. **Journal of Chromatography A**, v. 1405, p. 103–115, 2015.
- ANTONIĆ, J.; HEATH, E. Determination of NSAIDs in river sediment samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, n. 4, p. 1337–42, 2007.
- ANVISA. Resolução - RE nº 899. p. 1–12, 2003.
- ANVISA et al. **Medicamentos veterinários utilizados na avicultura de postura no estado do paraná medicamentos veterinários Utilizados na avicultura de postura no estado do Paraná**PAMvet-PR, , 2005.
- ANVISA. Tarnstornos de ansiedade. **Saúde & Economia**, v. 10, 2013.
- ARSLAN, E. Y.; ÇAKIR, S. An investigation of the interaction between resazurin and Cd 2+ and Zn 2+ ions in aqueous medium. **South African Journal of Chemistry**, v. 63, p. 152–157, 2010.
- ASSIS, D. M.; JULIANO, L.; JULIANO, M. A. A espectrometria de massas aplicada na classificação e identificação de microorganismos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 9, n. 2, p. 344–355, 2011.
- BAKER, D. R.; KASPRZYK-HORDERN, B. Spatial and temporal occurrence of pharmaceuticals and illicit drugs in the aqueous environment and during wastewater treatment: new developments. **The Science of The Total Environment**, v. 454–455, p. 442–56, 2013.
- BARBOSA, A. M. J. et al. A simple method for electroanalytical determination of ceftiofur in UHT milk samples using square-wave voltammetry technique. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 41, n. 2, p. 249–255, 2011.
- BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods - Fundamentals and applications**. 2nd. ed. p. 864, 2001.
- BERNIK, M. A.; SOARES, M. B.; SOARES, C. N. Benzodiazepínicos: padrões de uso, tolerância e dependência. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 48, n. 1, p. 131–137, 1990.
- BIANCHETTI, F. J. **Remoção do agente hormonalmente ativo etinilestradiol por pré-oxidação e coagulação: Estudo em escala de bancada**. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2008.
- BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 523–530, 2003.
- BLACK, P. et al. Assessing occupational mercury exposures and behaviours of artisanal and small-scale gold miners in Burkina Faso using passive mercury vapour badges. **Environmental Research**, v. 152, p. 462–469, 2017.
- BOSSIO, J. P.; HARRY, J.; KINNEY, C. A. Application of ultrasonic assisted extraction of chemically diverse organic compounds from soils and sediments. **Chemosphere**, v. 70, n. 5, p. 858–64, 2008.

BRAHIM, M. BEN et al. Electrochemical behavior and analytical detection of Imidacloprid insecticide on a BDD electrode using square-wave voltammetric method. **Chinese Chemical Letters**, v. 27, n. 5, p. 666–672, 2016.

BRANDÃO, F. P. et al. Short-term effects of neuroactive pharmaceutical drugs on a fish species: Biochemical and behavioural effects. **Aquatic Toxicology**, v. 144–145, p. 218–229, 2013.

BRODIN, T. et al. Dilute concentrations of a psychiatric drug alter behavior of fish from natural populations. **Science**, v. 339, p. 814–815, 2013.

BRODIN, T. et al. Ecological effects of pharmaceuticals in aquatic systems--impacts through behavioural alterations. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 369, n. 1656, p. 20130580–20130580, 13 out. 2014.

BUCHBERGER, W. W. Novel analytical procedures for screening of drug residues in water , waste water , sediment and sludge. **Analytica Chimica Acta**, v. 593, p. 129–139, 2007.

BUKKITGAR, S. D. et al. Electro-sensing base for mefenamic acid on a 5% barium-doped zinc oxide nanoparticle modified electrode and its analytical application. **The Royal Society of Chemistry**, v. 5, n. 127, p. 104891–104899, 2013.

BUKKITGAR, S. D. et al. Electro-oxidation of nimesulide at 5% barium-doped zinc oxide nanoparticle modified glassy carbon electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 762, p. 37–42, 2016.

CARMONA, E.; ANDREU, V.; PICÓ, Y. Occurrence of acidic pharmaceuticals and personal care products in Turia River Basin: From waste to drinking water. **Science of the Total Environment**, v. 484, n. 1, p. 53–63, 2014.

COSTANTI, M.; MENEZES, E. **Laudo comprova alta concentração de metais pesados em lama de barragens** Belo Horizonte R7, , 2015. Disponível em: <<https://noticias.r7.com/minas-gerais/laudo-comprova-alta-concentracao-de-metais-pesados-em-lama-de-barragens-13112015>>

COTTICA, S. M. et al. Voltammetric determination of pyridoxine (Vitamin B6) in drugs using a glassy carbon electrode modified with chromium(III) hexacyanoferrate(II). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 3, p. 496–501, 2009.

COUTO, R. A. S.; LIMA, J. L. F. C.; QUINAZ, M. B. Recent developments, characteristics and potential applications of screen-printed electrodes in pharmaceutical and biological analysis. **Talanta**, v. 146, n. 228, p. 801–814, 2016.

CVRKOVIC-KARLOCI, Ž. et al. Simple electrochemical determination of surface-active substances in natural waters. **International Journal of Electrochemistry**, v. 2011, p. 1–7, 2011.

DA SILVA, B. F. et al. Occurrence and distribution of pharmaceuticals in surface water, suspended solids and sediments of the Ebro river basin, Spain. **Chemosphere**, v. 85, n. 8, p. 1331–1339, 2011.

DA SILVA, C. G. A.; COLLINS, C. H. Applications of high performance liquid chromatography for the study of emerging organic pollutants. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 665–676, 2011.

DE CARVALHO, L. M. et al. Simultaneous determination of cadmium, lead, copper, and thallium in highly saline samples by anodic stripping voltammetry (ASV) using mercury-film and bismuth-film electrodes. **Electroanalysis**, v. 19, n. 16, p. 1719–1726, 2007.

DE CARVALHO, L. M. et al. A new method for the simultaneous determination of 1,4-benzodiazepines and amfepramone as adulterants in phytotherapeutic formulations by

voltammetry. **Forensic Science International**, v. 202, n. 1–3, p. 75–81, 2010.

DE FIGUEIREDO-FILHO, L. C. S. et al. A disposable and inexpensive bismuth film minisensor for a voltammetric determination of diquat and paraquat pesticides in natural water samples. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 240, p. 749–756, 2017.

DE SOUZA, D. et al. Determination of triazine herbicides: Development of an electroanalytical method utilizing a solid amalgam electrode that minimizes toxic waste residues, and a comparative study between voltammetric and chromatographic techniques. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, n. 6, p. 2245–2253, 2007.

DE SOUZA, D. et al. Utilização de eletrodos sólidos de amálgama para a determinação analítica de compostos orgânicos e inorgânicos. **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 487–496, 2011.

DE SOUZA, D.; MASCARO, L. H.; FATIBELLO-FILHO, O. A comparative electrochemical behaviour study and analytical detection of the p-Nitrophenol using silver solid amalgam, mercury, and silver electrodes. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2011, p. 1–8, 2011.

DE TOLEDO, R. A. et al. Estudo eletroquímico e químico-quântico da oxidação do antidepressivo tricíclico amitriptilina. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 456–461, 2005.

DÍAZ-CRUZ, M. S.; LÓPEZ DE ALDA, M. J.; BARCELÓ, D. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 6, p. 340–351, 2003.

DOS SANTOS, L. B. O.; ABATE, G.; MASINI, J. C. Determination of atrazine using square wave voltammetry with the Hanging Mercury Drop Electrode (HMDE). **Talanta**, v. 62, n. 4, p. 667–674, 2004.

DOS SANTOS, V. S. **Impactos ambientais do acidente em Mariana (MG)- Brasil Escola**, 2017. Disponível em: <<http://brasilecola.uol.com.br/biologia/impactos-ambientais-acidente-mariana-mg.htm>>

DRUGBANK. **Drugbank**. Disponível em: <<https://www.drugbank.ca/drugs>>. Acesso em: 1 jan. 2017.

DRUGINFOSYS. **Online Drug Information System**. Disponível em: <<http://www.druginfosys.com/>>.

DUARTE-NETO, J. F. et al. Processos de adsorção de corantes em argilas esmectíticas: uma revisão. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 9, p. 51–59, 2014.

EL-SHAHAWI, M. S. et al. Analysis of some selected persistent organic chlorinated pesticides in marine water and food stuffs by differential pulse-cathodic stripping voltammetry. **Electroanalysis**, v. 23, n. 5, p. 1175–1185, 2011.

EMBRAPA. **Manual de métodos de análise de solo**. 2. ed. Rio de Janeiro. p. 225. 1997.

EMÍDIO, E. S.; DÓREA, H. S. Comparação entre as extrações ultra-som e Soxhlet para determinação de alcanos em sedimentos ambientais. **Scientia Plena**, v. 6, p. 1–7, 2010.

EPA/625/R-94/004. **Hanbook: Recycling and reuse of material found on superfund sites**. p. 84, 1994.

ERDOĞDU, G.; TITRETIR, S. Voltammetric determination of mesotrione at hanging mercury drop electrode. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 62, n. 8, p. 777–780, 2007.

FERNÁNDEZ, P. et al. A rapid ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction followed by ultra-performance liquid chromatography for the simultaneous determination of seven benzodiazepines in human plasma samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 767, n. 1, p. 88–96, 2013.

- GAFFNEY, V. DE J. et al. Occurrence of pharmaceuticals in a water supply system and related human health risk assessment. **Water Research**, v. 72, p. 199–208, 2015.
- GALLI, A. et al. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 105–112, 2006.
- GALLI, A.; DE SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S. Pendimethalin determination in natural water, baby food and river sediment samples using electroanalytical methods. **Microchemical Journal**, v. 98, n. 1, p. 135–143, 2011.
- GAO, J.; CASSADY, C. J. Negative ion production from peptides and proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid communications in mass spectrometry : RCM**, v. 22, n. 24, p. 4066–72, 2008.
- GEBAUER, D. L. et al. Effects of anxiolytics in zebrafish: Similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 99, n. 3, p. 480–486, 2011.
- GERENT, G. G.; SPINELLI, A. Environmentally-friendly in situ plated bismuth-film electrode for the quantification of the endocrine disruptor parathion in skimmed milk. **Journal of Hazardous Materials**, v. 308, p. 157–163, 2016.
- GHASEMI, J.; NIAZI, A.; GHORBANI, R. Determination of trace amounts of lorazepam by adsorptive cathodic differential pulse stripping method in pharmaceutical formulations and biological fluids. **Analytical Letters**, v. 39, n. 6, p. 1159–1169, 2006.
- GHOBADI, M.; YAMINI, Y.; EBRAHIMPOUR, B. SPE coupled with dispersive liquid-liquid microextraction followed by GC with flame ionization detection for the determination of ultra-trace amounts of benzodiazepines. **Journal of Separation Science**, v. 37, n. 3, p. 287–294, 2014.
- GRASSI, M. T. Algumas propriedades da água. **Cadernos temáticos de Química Nova na Escola**, p. 31–40, 2001.
- GUIMARÃES, G. A.; BASTOS, J. B.; LOPES, E. . **Métodos de análise física, química e instrumental de solos**. Belém. p. 112, 1970. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000108&pid=S0044-5967200700020000300009&lng=pt>.
- GÜRSOY, M. et al. Performance of MALDI-TOF MS for identification of oral Prevotella species. **Anaerobe**, v. 47, p. 89–93, 2017.
- HERNANDEZ, L. et al. Determination of camazepam and bromazepam in human serum by adsorptive stripping voltammetry. **Analyst**, v. 112, n. August, p. 1149–1153, 1987.
- HONEYCHURCH, K. C.; HART, J. P. Electrochemical detection of benzodiazepines, following liquid chromatography, for applications in pharmaceutical, biomedical and forensic investigations. **Insciences Journal**, v. 4, p. 1–18, 2014.
- JAIN, R.; YADAV, R. K. Voltammetric behavior of sedative drug midazolam at glassy carbon electrode in solubilized systems. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 2, n. 2, p. 123–129, 2012.
- JEONG, Y.-D. et al. Rapid determination of benzodiazepines, zolpidem and their metabolites in urine using direct injection liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Forensic Science International**, v. 257, p. 84–92, 2015.
- JUNIOR, J. L. B. **Matrizes iônicas: Detecção e quantificação de cianotoxinas por MALDI-MS**. p. 109 Universidade Estadual Paulista, 2015.
- JURADO, A. et al. Drugs of abuse in urban groundwater. A case study: Barcelona. **The**

Science of The Total Environment, v. 424, p. 280–288, 2012.

KALOGRIA, E.; PISTOS, C.; PANDERI, I. Hydrophilic interaction liquid chromatography / positive ion electrospray ionization mass spectrometry method for the quantification of alprazolam and α -hydroxy-alprazolam in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 942–943, p. 158–164, 2013.

KOSJEK, T. et al. Environmental occurrence, fate and transformation of benzodiazepines in water treatment. **Water Research**, v. 46, n. 2, p. 355–368, 2012.

KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part I. **Chemosphere**, v. 75, n. 4, p. 417–434, 2009a.

KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part II. **Chemosphere**, v. 75, n. 4, p. 435–441, 2009b.

LANÇAS, F. M. Como economizar (ou eliminar o uso de) acetonitrila em tempos de “crise”? **Scientia Chromatographica**, v. 1, p. 51–60, 2009a.

LANÇAS, F. M. Vantagens e limitações da miniaturização em cromatografia líquida. **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. Lc, p. 51–60, 2009b.

LAUGESSEN, S.; ROEPSTORFF, P. Combination of two matrices results in improved performance of MALDI MS for peptide mass mapping and protein analysis. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 14, n. 9, p. 992–1002, 2003.

LEMAINSKI, J.; DA SILVA, J. E. Avaliação Agronômica e Econômica da Aplicação de Biossólido na Produção de Soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 1477–1484, 2006.

LEZI, N. et al. Electroanalysis of organic compounds at bismuth electrodes : A short review. **Sensing in Electroanalysis**, v. 7, p. 71–78, 2012.

LIMA, L. M.; SOUZA, E. L. DE; FIGUEIREDO, R. D. O. Retenção do dimetoato e sua relação com pH e teores de argila e matéria orgânica nos sedimentos da zona não-saturada de uma microbacia no nordeste paraense. **Acta Amazonica**, v. 37, n. 2, p. 187–194, 2007.

LÖFFLER, D. et al. Environmental fate of pharmaceuticals in water/sediment systems. **Environmental Science & Technology**, v. 39, n. 14, p. 5209–5218, 2005.

MAASZ, G. et al. Mayfly and fish species identification and sex determination in bleak (*Alburnus alburnus*) by MALDI-TOF mass spectrometry. **Science of the Total Environment**, v. 601–602, p. 317–325, 2017.

MACHINSKI JUNIOR, M. et al. **Medicamentos Veterinários Utilizados na Avicultura de Postura no Estado do Paraná - PAMvet-PR**, ANVISA, , 2005.

MANGRICH, A. S. et al. Química verde no tratamento de águas: Uso de coagulante derivado de tanino de acacia mearnsii. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 1, p. 2–15, 2014.

MARTI, J. Multi-residue method for the analysis of pharmaceutical compounds in sewage sludge , compost and sediments by sonication-assisted extraction and LC determination. **J. Sep. Sci.**, v. 33, p. 1760–1766, 2010.

MARTÍN, J. et al. Occurrence of pharmaceutical compounds in wastewater and sludge from wastewater treatment plants : Removal and ecotoxicological impact of wastewater discharges and sludge disposal. **Journal of Hazardous Materials**, v. 239–240, p. 40–47, 2012.

MATONGO, S. et al. Pharmaceutical residues in water and sediment of Msunduzi River, KwaZulu-Natal, South Africa. **Chemosphere**, v. 134, p. 133–40, 2015.

MAXWELL. **Coagulação química** Rio de Janeiro PUC, , 2017. Disponível em:

<https://www.maxwell.vrac.puc-rio.br/11608/11608_5.PDF>

MEFFE, R.; DE BUSTAMANTE, I. Emerging organic contaminants in surface water and groundwater: A first overview of the situation in Italy. **Science of the Total Environment**, v. 481, p. 280–295, 2014.

MELLO, R. V. et al. MALDI-TOF MS based discrimination of coccoid green microalgae (Selenastraceae, Chlorophyta). **Algal Research**, v. 28, n. September, p. 151–160, 2017.

MENDIS, L. **How to Choose Your MALDI (Soul) Matrix**. Disponível em: <<https://bitesizebio.com/27800/how-to-choose-your-maldi-soul-matrix/>>.

MENDOZA, A. et al. Occurrence of drugs of abuse and benzodiazepines in river waters from the Madrid Region (Central Spain). **Chemosphere**, v. 95, p. 247–255, 2014.

MERCK. **Matrix Substances for MALDI-MS**. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/analytical-products.html?TablePage=103431784>>.

MOHAMED, H. M. Screen-printed disposable electrodes: Pharmaceutical applications and recent developments. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 82, p. 1–11, 2016.

MONTAGNER, C. C. et al. Trace analysis of pesticides and an assessment of their occurrence in surface and drinking waters from the State of São Paulo (Brazil). **Analytical Methods**, v. 6, n. 17, p. 6668–6677, 2014.

MONTAGNER, C. C.; JARDIM, W. F. Spatial and seasonal variations of pharmaceuticals and endocrine disruptors in the Atibaia River, São Paulo State (Brazil). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 8, p. 1452–1462, ago. 2011.

MORENO-GONZÁLEZ, R. et al. Seasonal distribution of pharmaceuticals in marine water and sediment from a mediterranean coastal lagoon (SE Spain). **Environmental Research**, v. 138, p. 326–344, 2015.

NOZAWA, H. et al. MALDI-TOF mass spectrometric determination of eight benzodiazepines with two of their metabolites in blood. **Legal Medicine**, v. 17, n. 3, p. 150–156, maio 2015.

NOZAWA, H. et al. Simultaneous determination of cyclic antidepressants and their related drugs and the estimation of new metabolites in human whole blood and urine by MALDI-QTOF-mass spectrometry. **Forensic Toxicology**, v. 34, n. 2, p. 244–255, 2016.

NUNES, C. N. et al. New approach to the determination of contaminants of emerging concern in natural water: study of alprazolam employing adsorptive cathodic stripping voltammetry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 20, p. 6171–6179, 2015.

NUNES, C. N. et al. Rapid screening method for detecting ethinyl estradiol in natural water employing voltammetry. **Jornal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2016, p. 1–7, 2016.

NUNES, C. N.; DOS ANJOS, V. E.; QUINÁIA, S. P. A versatilidade do eletrodo de gota pendente de mercúrio em química analítica - Uma revisão sobre recentes aplicações. **Química Nova**, n. 0, p. 1–13, 2018.

OGGIER, D. M. et al. Effects of diazepam on gene expression and link to physiological effects in different life stages in zebrafish *danio rerio*. **Environmental Science and Technology**, v. 44, n. 19, p. 7685–7691, 2010.

OVERTURF, C. L.; OVERTURF, M. D.; HUGGETT, D. B. Bioconcentration and endocrine disruption effects of diazepam in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 183–184, p. 46–52, 2016.

PAGE, D. et al. Environmental monitoring of selected pesticides and organic chemicals in urban stormwater recycling systems using passive sampling techniques. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 158, p. 65–77, 2014.

PANINI, N. V. et al. Modified paramagnetic beads in a microfluidic system for the determination of zearalenone in feedstuffs samples. **Food Chemistry**, v. 125, n. 2, p. 791–796, 2011.

PÉREZ-SANCHO, M. et al. Differentiation of *Flavobacterium psychrophilum* from *Flavobacterium psychrophilum*-like species by MALDI-TOF mass spectrometry. **Research in Veterinary Science**, v. 115, n. December 2016, p. 345–352, 2017.

PETROVIC, M.; GONZALEZ, S.; BARCELÓ, D. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 10, p. 685–696, 2003.

PHAM, M. C. et al. Electrochemical synthesis and study of poly(5-amino 1-naphthol) film in aqueous and organic media. **Synthetic Metals**, v. 63, n. 1, p. 7–15, 1994.

PHARLAB. **Clonazepam**, 2017.

PUBCHEM. **PubChem**.

QUEIROZ, M. E. C. Microextração em fase sólida para análise de fármacos em fluidos biológicos. **Scientia Chromatographica**, v. 1, p. 11–19, 2009.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 68–76, 2001.

RACAMONDE, I. et al. Determination of benzodiazepines, related pharmaceuticals and metabolites in water by solid-phase extraction and liquid-chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1352, p. 69–79, 2014.

RACAMONDE, I. et al. Application of polypropylene tubes as single-use and low-cost sorptive extraction materials for the determination of benzodiazepines and zolpidem in water samples. **Microchemical Journal**, v. 119, p. 58–65, 2015.

RAIJ, B. VAN et al. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. p. 285, 2001.

RICHESTRANDER, H. et al. On the edge: Pharmacological evidence for anxiety-related behavior in zebrafish larvae. **Behavioural Brain Research**, v. 228, n. 1, p. 99–106, 2012.

RIDGE, O. Deaeration ... How and why? **Princeton Applied Research**, p. 3, 2016.

ROBLES-MOLINA, J. et al. Monitoring of selected priority and emerging contaminants in the Guadalquivir River and other related surface waters in the province of Jaén, South East Spain. **Science of the Total Environment**, v. 479–480, n. 1, p. 247–257, 2014.

SALA-COMORERA, L. et al. Use of matrix-assisted laser desorption/ionization–time of flight (MALDI–TOF) mass spectrometry for bacterial monitoring in routine analysis at a drinking water treatment plant. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 219, p. 577–584, 2016.

SANTANA, S. **Determinação de contaminantes emergentes em mananciais de água bruta e na água para consumo humano do Distrito Federal**. [s.l.] Universidade de Brasília, 2013.

SANTOS, V. S. DOS. **Acidente em Mariana (MG) e seus impactos ambientais** Mundo Educação, , 2017. Disponível em: <http://mundoeducacao.bol.uol.com.br/biologia/acidente-mariana-mg-seus-impactos-ambientais.htm#disqus_thread>

SEBRAE. **O valioso mercado de animais de estimação.** Disponível em: <<http://sebraemercados.com.br/o-valioso-mercado-de-pets-de-estimacao/>>. Acesso em: 1 jan. 2017.

SKOOG et al. Fundamentos de química analítica. **Editora Thomson**, v. 8, 2006.

SODRÉ, F. F.; LOCATELLI, M. A. F.; JARDIM, W. F. Occurrence of emerging contaminants in Brazilian drinking waters: A sewage-to-tap issue. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 206, n. 1–4, p. 57–67, 2010.

SPECTROMETRY, C. & FILED UNDER M. M. **Fundamentals of Choosing a MALDI Matrix.** Disponível em: <http://www.covachem.com/blog/fundamentals_of_chosing_a_maldi_matrix/>.

SUNDELIN, A. **Psychotherapeutic drugs in lake sediment. Accumulation and persistence of benzodiazepines in the sediment of Lake Ekoln.** [s.l.] UMEA, 2013.

TERNES, T. A. et al. Determination of pharmaceuticals, iodinated contrast media and musk fragrances in sludge by LC tandem MS and GC/MS. **Journal of Chromatography A**, v. 1067, n. 1–2, p. 213–223, 2005.

TERNES, T.; BONERZ, M.; SCHMIDT, T. Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and rivers by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 938, n. 1–2, p. 175–185, 2001.

TORRES, N. H. et al. Fármacos no ambiente – Revisão. **Revista de Estudos Ambientais**, v. 14, p. 67–75, 2012.

TROJANOWICZ, M. Impact of nanotechnology on design of advanced screen-printed electrodes for different analytical applications. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, 2016.

VAN DER VEN, K. et al. Determination of diazepam in aquatic samples by capillary liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. **Chemosphere**, v. 57, n. 8, p. 967–973, 2004.

VERLICCHI, P.; AUKIDY, M. AL; 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**, v. 429, p. 123–155, 2012.

VOLKE, J. Polarographic and voltammetric methods in pharmaceutical chemistry and pharmacology. **Journal of Electroanalytical chemistry**, v. 155, p. 7–23, 1983.

VRANA, B. et al. Passive sampling: An effective method for monitoring seasonal and spatial variability of dissolved hydrophobic organic contaminants and metals in the Danube river. **Environmental Pollution**, v. 184, p. 101–112, 2014.

WANG, X. et al. Heavy metal chemical extraction from industrial and municipal mixed sludge by ultrasound-assisted citric acid. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 27, p. 368–372, 2015.

WASSERMAN, J.; HACON, S. O ciclo do mercúrio no ambiente amazônico. **Mundo e Vida**, v. 2, p. 46–53, 2001.

WESTLAND, J. L.; DORMAN, F. L. QuEChERS extraction of benzodiazepines in biological matrices. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 3, n. 6, p. 509–517, 2013.

WICKHORST, J. P. et al. Identification of *Arcanobacterium hippocoleae* by MALDI-TOF MS analysis and by various genotypical properties. **Research in Veterinary Science**, v. 115, p. 10–12, 2017.

WILKINSON, J. et al. Occurrence, fate and transformation of emerging contaminants in water: An overarching review of the field. **Environmental Pollution**, v. 231, p. 954–970, 2017.

YANG, M. et al. Mercury emission and speciation from industrial gold production using roasting process. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 170, p. 72–77, 2016.

ZHOU, J.; BROODBANK, N. Sediment-water interactions of pharmaceutical residues in the river environment. **Water research**, v. 48, p. 61–70, 2014.

ZUINI, P. **Mercado pet supera crise com inovação**. Disponível em: <<http://revistapegn.globo.com/Banco-de-ideias/noticia/2015/10/mercado-pet-supera-crise-com-inovacao.html>>. Acesso em: jan. 2017.

ZUMAN, P. Polarography in solution of some problems in organic chemistry: Recent applications. **Microchemical Journal**, v. 72, n. 3, p. 241–250, 2002.