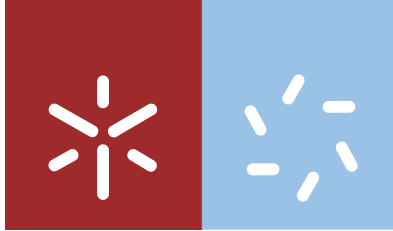


Universidade do Minho
Escola de Ciências

Alexandra Martins Mota

Estudo de resíduos farmacêuticos em lamas de ETARs: uso da extração acelerada por solvente (ASE) seguida de análise por cromatografia líquida de alta eficiência e detecção por espectrometria de massa (UPLC-MS/MS)



Universidade do Minho

Escola de Ciências

Alexandra Martins Mota

Estudo de resíduos farmacêuticos em lamas de ETARs: uso da extração acelerada por solvente (ASE) seguida de análise por cromatografia líquida de alta eficiência e deteção por espectrometria de massa (UPLC-MS/MS)

Dissertação de Mestrado

Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química

Trabalho efectuado sob a orientação da

Professora Doutora Maria de Fátima Alpendurada

e da

Professora Doutora Susana Costa

DECLARAÇÃO

Nome: Alexandra Martins Mota

Endereço Eletrónico: alexandra.mota.90@gmail.com

Número do Bilhete de Identidade: 13727059

Título da Dissertação: Estudo de resíduos farmacêuticos em lamas de ETARs: uso da extração acelerada por solvente (ASE) seguida de análise por cromatografia líquida de alta eficiência e deteção por espetrometria de massa (UPLC-MS/MS)

Orientadores: Professora Doutora Maria de Fátima Alpendurada (IAREN) e Professora Doutora Susana Costa (DQ/UM)

Ano de conclusão: 2014

Designação do Mestrado: Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química

DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA DISSERTAÇÃO

Universidade do Minho, ___/___/_____

Assinatura: _____

“Learn from yesterday, live for today, hope for tomorrow. The important thing is to not stop questioning.”

Albert Einstein

Agradecimentos

Seria impossível concluir esta dissertação de mestrado sem o incondicional apoio de algumas pessoas e instituições às quais estarei eternamente grata.

À Professora Doutora Maria de Fátima Alpendurada, enquanto minha orientadora, presto o meu profundo agradecimento pela partilha de conhecimentos, incentivo, disponibilidade, empenho, acompanhamento, apoio e simpatia. Agradeço-lhe ainda enquanto diretora do IAREN – Instituto da Água da Região Norte, por ter acreditado em mim e por me ter concedido a oportunidade de realizar esta investigação nas suas instalações, com equipamentos da mais elevada tecnologia e com todo o material necessário para a realização do trabalho. Sem dúvida que me proporcionou uma experiência incrível e enriquecedora.

À Professora Doutora Susana Costa pelo incomensurável apoio prestado em todas as situações necessárias, pela simpatia e disponibilidade transmitidas durante este trabalho e durante todo o mestrado.

Ao IAREN – Instituto da Água da Região Norte, e todos os seus colaboradores – Andreia, Cláudia, Juliana, Luís, Lurdes, Maria José, Marta L., Marta T. e Vera – pelo acolhimento, bom ambiente e partilha que demonstraram desde o dia da minha chegada, em especial à Ana Guimarães pela inesgotável paciência e pelo infindável acompanhamento durante este ano.

Aos melhores companheiros do meu percurso académico, Ana, Cátia e Vasco, por todos os momentos partilhados nestes 6 anos, pela enorme amizade e encorajamento transmitidos.

A todos os meus amigos pelos momentos de descontração, pelo apoio e pela amizade, em especial ao Rúben que tanto me ouviu e ajudou e à Tânia pela companhia nas alturas difíceis.

Ao Vítor pelo apoio, ajuda, eterna paciência e por me ouvir em todos os desabafos, desde sempre.

À minha família, em especial aos meus pais, pelo eterno e incondicional amor, apoio e por serem essenciais na concretização de mais uma grande etapa da minha vida, e à minha avó pela ajuda preciosa durante toda a minha vida académica.

Ao Luki e ao Ruca, os mais fiéis companheiros de todas as horas, obrigada por me fazerem sorrir.

Resumo

Portugal está entre os 10 países da União Europeia que mais consome antibióticos o que levanta uma enorme preocupação e necessidade de monitorizar as quantidades de resíduos de antibióticos que vão para o meio ambiente pelos mais diversos meios. Apesar das concentrações de fármacos serem muito inferiores aos níveis dos poluentes orgânicos tradicionalmente conhecidos, os efeitos a longo prazo na população, em plantas e animais não podem ser ignorados. Neste sentido, o objetivo deste estudo focou-se no desenvolvimento de um método que permita verificar se o tratamento de águas residuais é eficiente na remoção de uma classe de antibióticos específica – fluoroquinolonas – já que as lamas que resultam deste tratamento são o principal reservatório deste tipo de compostos. Estas lamas são utilizadas como fertilizantes em solos podendo contaminar as águas subterrâneas ou causar graves consequências nas culturas agrícolas, e não existem valores de referência para estes e outros resíduos farmacêuticos nesta matriz.

O método desenvolvido consistiu na extração de 5 fluoroquinolonas das lamas por ASE, seguido de *clean-up* dos extratos por SPE e posterior análise por UPLC-MS/MS. Efetuou-se uma otimização cuidada de alguns dos parâmetros com o objetivo de validar um método analítico com limites de quantificação e deteção o mais baixo possíveis. Começou-se por realizar a otimização da separação, identificação e quantificação dos compostos alvo no UPLC-MS/MS. De seguida, no sentido de otimizar o processo de extração, fez-se variar os parâmetros que mais afetam a eficiência da mesma e concluiu-se que as condições ótimas eram as obtidas com o solvente H₃PO₄ 50 mM/Acetonitrilo (1:1), a 65 °C, com 6 ciclos de 3 minutos cada, a 1500 psi. Como processo de *clean-up* foi utilizado o SPE recorrendo à utilização de cartuchos HLB.

O método foi posteriormente validado e os limiares analíticos foram determinados sendo possível obter limites de quantificação baixos, entre 10,36 µg/kg e 14,49 µg/kg. A partir da validação pôde-se concluir que o método desenvolvido é seletivo, preciso e robusto.

A partir das amostras reais analisadas verificou-se que a remoção dos compostos em estudo pela ETAR não é eficaz já que estes se encontram nas lamas em quantidades significativas.

Abstract

Portugal is one of the top 10 countries in the European Union that consume more antibiotics which raises a huge concern and need to monitoring antibiotics residues that end up in the environment by several ways. Although the concentration of pharmaceuticals is much lower than the levels of traditionally known organic pollutants the potential long-term effects of these compounds to humans, plants and animals cannot be ignored. Thereby, the purpose of this study lied on the development of a method capable of verifying if the wastewater treatment is effective in removing a specific class of antibiotics – fluoroquinolones – since the sludge resulting from this treatment is the main reservoir of these compounds. This sewage sludge may be used as a fertilizer in soils and therefore contaminate the groundwater or cause serious consequences on crops, and no trigger values exist for fluoroquinolones and other drugs residues in this matrix.

The developed method consisted in the extraction of 5 fluoroquinolones from the sewage sludge by ASE, followed by *clean-up* of the extracts by SPE and subsequent analysis by UPLC-MS/MS. The analytical method was accurately validated by optimizing several parameters to obtain the lowest limits of quantification and detection. This was overcome by performing the optimization of the separation, identification and quantification of the compounds of interest in UPLC-MS/MS system. Thereafter in order to optimize the extraction process, the parameters that most affect its efficiency were tested, and it was concluded that the optimum conditions were obtained using the solvent H₃PO₄ 50 mM/Acetonitrile (1:1) at 65 °C with 6 cycles of 3 minutes each at 1500 psi. The SPE using HLB cartridges was the *clean-up* process employed.

The method was further validated and the analytical threshold limits were determined and it was possible to obtain limits of quantification between 10.36 µg/kg and 14.49 µg/kg. Therefore it can be concluded from the validation performance that the developed method is selective, precise and robust.

From real samples it was found that the removal of these compounds by the wastewater treatment plant shows not to be effective because some compounds were present in significant amounts in sludge.

Índice

| | |
|---|------------|
| AGRADECIMENTOS | V |
| RESUMO | VII |
| ABSTRACT | IX |
| ÍNDICE | XI |
| LISTA DE ABREVIATURAS | XV |
| ÍNDICE DE FIGURAS | XIX |
| ÍNDICE DE TABELAS | XXV |
| | |
| CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| | |
| 1.1 OBJETIVOS DO TRABALHO | 3 |
| 1.2 ORGANIZAÇÃO DA TESE | 3 |
| | |
| CAPÍTULO 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | 5 |
| | |
| 2.1 TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUAIS | 7 |
| 2.2 POLUENTES EMERGENTES | 10 |
| 2.2.1 COMPOSTOS FARMACÊUTICOS | 10 |
| 2.2.2 ANTIBIÓTICOS | 12 |
| 2.2.3 FLUOROQUINOLONAS | 12 |
| 2.2.4 PROPRIEDADES E INDICAÇÕES TERAPÊUTICAS | 15 |
| 2.2.5 RESISTÊNCIA E CONSUMO DE FQS: A NÍVEL MUNDIAL E EM PORTUGAL | 16 |
| 2.2.6 FONTES DE POLUIÇÃO: OCORRÊNCIA E DESTINO AMBIENTAL | 18 |
| 2.2.7 LEGISLAÇÃO | 20 |
| 2.3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO | 20 |
| 2.3.1 MÉTODOS CLÁSSICOS E MÉTODOS MAIS COMUNS | 20 |
| 2.3.2 EXTRAÇÃO ACELERADA POR SOLVENTE (ASE) | 21 |
| 2.3.2.1 Fundamentos e Aplicações | 21 |
| 2.3.2.2 Parâmetros que Influenciam a Eficiência da Extração | 25 |
| 2.4 MÉTODOS DE CLEAN-UP | 26 |
| 2.4.1 IMPORTÂNCIA DO CLEAN-UP | 26 |
| 2.4.2 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE) | 26 |

| | | |
|--|--|-----------|
| 2.4.2.1 | Fundamentos e Aplicações | 26 |
| 2.4.2.2 | Adsorventes | 29 |
| 2.4.2.3 | Parâmetros que Influenciam a Eficiência da Extração | 30 |
| 2.5 | ANÁLISE CROMATOGRÁFICA | 30 |
| 2.5.1 | CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA ACOPLADA À ESPETROMETRIA DE MASSA TANDEM | 30 |
| 2.5.1.1 | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e de Ultra Eficiência (UPLC) | 31 |
| 2.5.1.2 | Deteção por Espectrometria de Massa (MS) | 34 |
| CAPÍTULO 3. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO | | 37 |
| 3.1 | PLANEAMENTO | 39 |
| 3.2 | PREPARAÇÃO DA AMOSTRA | 40 |
| 3.3 | OTIMIZAÇÃO DO UPLC | 40 |
| 3.3.1 | OTIMIZAÇÃO DAS TRANSIÇÕES | 41 |
| 3.3.2 | CALIBRAÇÃO DIRETA | 41 |
| 3.4 | OTIMIZAÇÃO ASE | 42 |
| 3.4.1 | SOLVENTE EXTRATOR | 44 |
| 3.4.2 | TEMPERATURA DE EXTRAÇÃO | 46 |
| 3.4.3 | NÚMERO DE CICLOS ESTÁTICOS | 47 |
| 3.4.4 | TEMPO ESTÁTICO | 49 |
| 3.5 | OTIMIZAÇÃO DO CLEAN-UP | 51 |
| 3.5.1 | CARTUCHOS | 52 |
| 3.5.2 | DILUIÇÃO DA AMOSTRA | 56 |
| 3.5.3 | OUTROS ASPETOS OTIMIZADOS | 58 |
| CAPÍTULO 4. PARTE EXPERIMENTAL | | 61 |
| 4.1 | MATERIAIS | 63 |
| 4.1.1 | REAGENTES E SOLUÇÕES | 63 |
| 4.1.2 | MATERIAL E EQUIPAMENTO | 63 |
| 4.2 | PREPARAÇÃO DA AMOSTRA | 64 |
| 4.3 | ASE – EXTRAÇÃO DAS FQS | 64 |
| 4.3.1 | CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS | 64 |
| 4.3.2 | PROCEDIMENTO | 65 |
| 4.4 | SPE – CLEAN-UP DOS EXTRATOS | 67 |

| | | |
|--|---|-----------|
| 4.4.1 | CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS | 67 |
| 4.4.2 | PROCEDIMENTO | 67 |
| 4.5 | UPLC-MS/MS – SEPARAÇÃO E DETEÇÃO DOS COMPOSTOS | 68 |
| 4.5.1 | CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS | 68 |
| 4.5.2 | PROCEDIMENTO | 68 |
| CAPÍTULO 5. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO | | 71 |
| 5.1 | LINEARIDADE E GAMA DE TRABALHO | 73 |
| 5.2 | LIMIARES ANALÍTICOS | 74 |
| 5.3 | PRECISÃO | 74 |
| 5.3.1 | REPETIBILIDADE | 74 |
| 5.3.2 | PRECISÃO INTERMÉDIA | 75 |
| 5.4 | RECUPERAÇÃO | 75 |
| 5.5 | IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS | 76 |
| 5.6 | QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS | 76 |
| CAPÍTULO 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO | | 77 |
| 6.1 | LINEARIDADE E GAMA DE TRABALHO | 79 |
| 6.2 | LIMIARES ANALÍTICOS | 81 |
| 6.3 | PRECISÃO | 82 |
| 6.3.1 | REPETIBILIDADE | 82 |
| 6.3.2 | PRECISÃO INTERMÉDIA | 83 |
| 6.4 | RECUPERAÇÃO | 83 |
| 6.5 | IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS | 84 |
| 6.6 | QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS | 84 |
| CAPÍTULO 7. CONCLUSÕES | | 87 |
| 7.1 | CONCLUSÕES GERAIS | 89 |
| 7.2 | PERSPETIVAS FUTURAS | 91 |
| CAPÍTULO 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | | 93 |

| | |
|---|------------|
| ANEXO A. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO | 103 |
| A.1 OTIMIZAÇÃO UPLC | 103 |
| A.1.1 Curvas de Calibração | 103 |
| A.1.2 Cromatogramas | 105 |
| A.2 OTIMIZAÇÃO ASE | 108 |
| A.2.1 Solvente Extrator | 108 |
| A.2.2 Temperatura de Extração | 111 |
| A.2.3 Número de Ciclos Estáticos | 113 |
| A.2.4 Tempo Estático | 118 |
| A.3 OTIMIZAÇÃO SPE | 120 |
| A.3.1 Cartuchos | 120 |
| A.3.2 Diluição da Amostra | 120 |
| A.3.3 Outros Aspectos | 123 |
| ANEXO B. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 126 |
| B.1 CROMATOGRAMAS DA CALIBRAÇÃO | 126 |
| B.2 FOLHAS DE VALIDAÇÃO | 129 |
| B.2.1 Enrofloxacin | 129 |
| B.2.2 Norfloxacin | 131 |
| B.2.3 Ciprofloxacina | 133 |
| B.2.4 Difloxacina | 135 |
| B.2.5 Sarafloxacina | 137 |
| B.3 QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS | 139 |

Lista de Abreviaturas

| | |
|----------------------|--|
| ACN | Acetonitrilo |
| ADN | Ácido Desoxirribonucleico |
| ASE | Extração Acelerada por Solvente (do inglês “Accelerated Solvent Extraction”) |
| ASPEC | Sistema de Extração em Fase Sólida Automatizado (do inglês “Automated Solid Phase Extraction Controller”) |
| CBO | Carência Bioquímica de Oxigênio |
| CIP | Ciprofloxacina |
| DIF | Difloxacina |
| DPR | Desvio Padrão Relativo |
| <i>E.coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| ECDC | Centro Europeu de Controlo e Prevenção de Doenças (do inglês “European Centre for Disease Prevention and Control”) |
| ENR | Enrofloxacin |
| ESI | Ionização por Eletrospray (do inglês “Electrospray Ionization”) |
| ETA | Estação de Tratamento de Águas |
| ETAR | Estação de Tratamento de Águas Residuais |
| FLD | Deteção por Fluorescência (do inglês “Fluorescence Detector”) |
| FQ | Fluoroquinolona |
| FUSLE | Extração Ultrasónica Direcionada (do inglês “Focused Ultrasonic Solid-Liquid Extraction”) |
| GC | Cromatografia Gasosa (do inglês “Gas Chromatography”) |
| GPC | Cromatografia de Permeação em Gel (do inglês “Gel Permeation Chromatography”) |
| HLB | Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico (do inglês “Hydrophilic Lipophilic Balanced”) |
| HPLC | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês “High-Performance Liquid Chromatography”) |
| HPSE | Extração com Solvente a Alta Pressão (do inglês “High Pressure Solvent Extraction”) |

| | |
|--------------|--|
| LAS | Alquilobenzenossulfonatos Lineares (do inglês “linear alkylbenzene sulfonate”) |
| LC | Cromatografia Líquida (do inglês “Liquid Chromatography”) |
| LD | Limite de Detecção |
| LQ | Limite de Quantificação |
| MAE | Extração Assistida por Micro-ondas (do inglês “Microwave-assisted extraction”) |
| MAX | Modo misto/Troca Aniônica (do inglês “Mixed-Mode Anion-Exchange”) |
| MCX | Modo misto/Troca Catiônica (do inglês “Mixed-Mode Cation-Exchange”) |
| MeOH | Metanol |
| MS | Espetrometria de Massa (do inglês “Mass Spectrometry”) |
| MSPD | Extração por Dispersão da Matriz em Fase Sólida (do inglês “Matrix Solid Phase Dispersion”) |
| NOR | Norfloxacina |
| NPE | Nonilfenóis Etoxilados (do inglês “Nonylphenol Ethoxylates”) |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| PAH | Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (do inglês “Polycyclic Aromatic Hydrocarbons”) |
| PCB | Bifenilos Policlorados (do inglês “Polychlorinated Biphenyl”) |
| PCDD | Dibenzodioxinas Policloradas (do inglês “Polychlorinated Dibenzo-p-dioxins”) |
| PCDF | Dibenzofuranos Policlorados (do inglês “Polychlorinated Dibenzofurans”) |
| PHSE | Extração com Solvente Aquecido Pressurizado (do inglês “Pressurized Hot Solvent Extraction”) |
| PHWE | Extração com Água Aquecida e Pressurizada (do inglês “Pressurized Hot Water Extraction”) |
| PLE | Extração com Líquido Pressurizado (do inglês “Pressurized Liquid Extraction”) |
| PCCPs | Produtos Farmacêuticos e de Cuidado Pessoal (do inglês “Pharmaceuticals and Personal Care Products”) |
| PSE | Extração de Solvente Pressurizado (do inglês “Pressurized Solvent Extraction”) |
| psi | Unidade de Pressão |
| QN | Quinolona |

| | |
|-------------|---|
| SAR | Sarafloxacina |
| SFE | Extração por Fluido Supercrítico (do inglês “Supercritical Fluid Extraction”) |
| SPE | Extração em Fase-Sólida (do inglês “Solid-Phase Extraction”) |
| SSE | Extração com Solvente Subcrítico (do inglês “Subcritical Solvent Extraction”) |
| TD | Terra de Diatomáceas |
| TR | Tempo de Retenção |
| UE | União Europeia |
| UPLC | Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (do inglês “Ultra Performance Liquid Chromatography”) |
| USE | Extração Assistida por Ultrassons (do inglês “Ultrasound Assisted Extraction”) |
| WAX | Troca Aniônica Fraca (do inglês “Weak Anion-Exchange”) |
| WCX | Troca Catiônica Fraca (do inglês “Weak Cation-Exchange”) |

Índice de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Esquema representativo e generalizado das várias etapas de tratamento numa ETAR | 8 |
| Figura 2. Esquema da ETAR selecionada para o estudo. | 9 |
| Figura 3. Estrutura química do ácido nalidíxico (à esquerda) e estrutura típica das QNs (à direita) | 12 |
| Figura 4. Estrutura geral das FQs. | 13 |
| Figura 5. Estruturas químicas das FQs de interesse para o presente estudo..... | 14 |
| Figura 6. Campanhas de sensibilização relativamente ao consumo excessivo e incorreto de antibióticos..... | 17 |
| Figura 7. "Ciclo" dos poluentes emergentes no meio ambiente. | 19 |
| Figura 8. Técnicas de extração, tradicionais e mais recentes, utilizadas na extração de compostos orgânicos das lamas de ETARs..... | 21 |
| Figura 9. Esboço do processo que ocorre num sistema de ASE. | 23 |
| Figura 10. Esquema do sistema de ASE. | 24 |
| Figura 11. Esquema representativo das etapas mais comuns que constituem um método de SPE. | 27 |
| Figura 12. Etapas genéricas que constituem um método de SPE..... | 28 |
| Figura 13. Vários tipos de cartuchos mais utilizados em SPE. | 29 |
| Figura 14. Esquemática da competição entre as moléculas do solvente e do soluto por locais de ligação na fase estacionária. | 31 |
| Figura 15. Representação de um esquema de HPLC. | 32 |
| Figura 16. Representação gráfica da altura do prato teórico (μm) em função do fluxo (mL/min) para fases estacionárias com um diâmetro de partícula de 10, 5 e 3 μm | 33 |
| Figura 17. Principais componentes de um espectrómetro de massa. | 34 |
| Figura 18. Esquema representativo da formação de iões gasosos por ESI. | 35 |
| Figura 19. Eletrospray de um capilar. | 35 |
| Figura 20. Esquemática de um analisador triplo quadrupolo. | 36 |

| | |
|--|----|
| Figura 21. Diferentes etapas de métodos analíticos desenvolvidos para a determinação de PPCPs em lamas de ETARs, desde a preparação da amostra até à análise cromatográfica, e respetivos parâmetros a otimizados..... | 39 |
| Figura 22. Esquema de uma célula de extração de ASE e respetivo procedimento relativamente ao enchimento da mesma. | 43 |
| Figura 23. Comparação entre os diferentes solventes utilizados na otimização da ASE através da representação gráfica da média das áreas obtidas nas 3 extrações para cada composto pela análise por UPLC..... | 45 |
| Figura 24. Comparação entre as diferentes temperaturas utilizadas na otimização da ASE através da representação gráfica da média das áreas obtidas nas 3 extrações para cada composto pela análise por UPLC..... | 46 |
| Figura 25. Comparação entre o diferente número de ciclos utilizados na otimização da ASE através da representação gráfica da média das áreas obtidas nas 3 extrações para cada composto pela análise por UPLC..... | 48 |
| Figura 26. Comparação entre os diferentes valores de tempo estático utilizados na otimização da ASE através da representação gráfica da média das áreas obtidas nas 3 extrações para cada composto pela análise por UPLC..... | 50 |
| Figura 27. Comparação entre os diferentes cartuchos utilizados na otimização da SPE através da representação gráfica da média das áreas obtidas nas 3 extrações para cada composto pela análise por UPLC..... | 53 |
| Figura 28. Comparação entre a utilização ou não da etapa de SPE realizada ao mesmo extrato através da representação gráfica das áreas obtidas para cada composto pela análise por UPLC. | 55 |
| Figura 29. Cromatogramas obtidos no UPLC após a análise do extrato submetido à etapa de <i>clean-up</i> por SPE para todas as FQs. | 55 |
| Figura 30. Cromatogramas obtidos no UPLC após a análise do extrato sem a utilização da etapa de <i>clean-up</i> por SPE para todas as FQs. | 56 |
| Figura 31. Comparação entre as diferentes diluições dos extratos utilizadas na otimização da SPE através da representação gráfica da média das áreas obtidas nas 3 extrações para cada composto pela análise por UPLC..... | 57 |

| | |
|--|-----|
| Figura 32. Comparação entre os diferentes níveis de concentração dos analitos testados nos extratos após SPE através da representação gráfica da média das áreas obtidas nas 3 extrações para cada composto pela análise por UPLC. | 59 |
| Figura 33. Demonstração da secagem das amostras. | 64 |
| Figura 34. Células de extração (5 mL) do ASE. | 65 |
| Figura 35. Equipamento utilizado na extração das amostras – ASE350. | 66 |
| Figura 36. Aspeto de alguns extratos obtidos no ASE. | 66 |
| Figura 37. Equipamento de extração em fase sólida ASPEC (à esquerda) e sistema de vácuo para a secagem dos cartuchos (à direita). | 67 |
| Figura 38. Evaporação dos extratos sob fluxo de N ₂ (à esquerda) e o equipamento onde se realizou a centrifugação (à direita). | 68 |
| Figura 39. Equipamento utilizado na separação e deteção dos compostos – UPLC-MS/MS.. | 69 |
| Figura 40. Representação gráfica da curva de calibração obtida para a ENR. | 79 |
| Figura 41. Representação gráfica da curva de calibração obtida para a NOR. | 79 |
| Figura 42. Representação gráfica da curva de calibração obtida para a CIP. | 80 |
| Figura 43. Representação gráfica da curva de calibração obtida para a DIF. | 80 |
| Figura 44. Representação gráfica da curva de calibração obtida para a SAR. | 80 |
| Figura 45. Curva de calibração obtida para a ENR a partir da calibração direta efetuada na otimização do UPLC. | 103 |
| Figura 46. Curva de calibração obtida para a NOR a partir da calibração direta efetuada na otimização do UPLC. | 103 |
| Figura 47. Curva de calibração obtida para a CIP a partir da calibração direta efetuada na otimização do UPLC. | 104 |
| Figura 48. Curva de calibração obtida para a DIF a partir da calibração direta efetuada na otimização do UPLC. | 104 |
| Figura 49. Curva de calibração obtida para a SAR a partir da calibração direta efetuada na otimização do UPLC. | 104 |
| Figura 50. Cromatograma obtido para o P1 resultante da calibração direta. | 105 |
| Figura 51. Cromatograma obtido para o P2 resultante da calibração direta. | 105 |
| Figura 52. Cromatograma obtido para o P3 resultante da calibração direta. | 106 |
| Figura 53. Cromatograma obtido para o P4 resultante da calibração direta. | 106 |

| | |
|---|-----|
| Figura 54. Cromatograma obtido para o P5 resultante da calibração direta..... | 107 |
| Figura 55. Cromatograma obtido para o P6 resultante da calibração direta..... | 107 |
| Figura 56. Cromatograma obtido após extração com o solvente I. | 108 |
| Figura 57. Cromatograma obtido após extração com o solvente II. | 109 |
| Figura 58. Cromatograma obtido após extração com o solvente III. | 109 |
| Figura 59. Cromatograma obtido após extração com o solvente IV. | 110 |
| Figura 60. Cromatograma obtido após extração com o solvente V. | 110 |
| Figura 61. Cromatograma obtido após extração a 45 °C..... | 111 |
| Figura 62. Cromatograma obtido após extração a 65 °C..... | 112 |
| Figura 63. Cromatograma obtido após extração a 85 °C..... | 112 |
| Figura 64. Cromatograma obtido após extração a 100 °C..... | 113 |
| Figura 65. Cromatograma obtido após extração com 2 ciclos. | 114 |
| Figura 66. Cromatograma obtido após extração com 3 ciclos. | 114 |
| Figura 67. Cromatograma obtido após extração com 4 ciclos. | 115 |
| Figura 68. Cromatograma obtido após extração com 5 ciclos. | 115 |
| Figura 69. Cromatograma obtido após extração com 6 ciclos. | 116 |
| Figura 70. Cromatograma obtido após extração com 7 ciclos. | 116 |
| Figura 71. Cromatograma obtido após extração com 8 ciclos. | 117 |
| Figura 72. Cromatograma obtido após extração com 9 ciclos. | 117 |
| Figura 73. Cromatograma obtido após extração com tempo estático de 3 min..... | 118 |
| Figura 74. Cromatograma obtido após extração com tempo estático de 5 min..... | 119 |
| Figura 75. Cromatograma obtido após extração com tempo estático de 8 min..... | 119 |
| Figura 76. Cromatograma obtido após <i>clean-up</i> com uma diluição da amostra 5x..... | 121 |
| Figura 77. Cromatograma obtido após <i>clean-up</i> com uma diluição da amostra 10x..... | 121 |
| Figura 78. Cromatograma obtido após <i>clean-up</i> com uma diluição da amostra 25x..... | 122 |
| Figura 79. Cromatograma obtido após <i>clean-up</i> com uma diluição da amostra 50x..... | 122 |
| Figura 80. Cromatograma obtido após concentrar os analitos 2x. | 123 |
| Figura 81. Cromatograma obtido após concentrar os analitos 5x. | 124 |
| Figura 82. Cromatograma obtido após concentrar os analitos 10x. | 124 |
| Figura 83. Cromatograma obtido após concentrar os analitos 100x. | 125 |

| | |
|---|-----|
| Figura 84. Cromatograma obtido para o P1 (12,5 µg/kg) na calibração utilizada para a validação do método..... | 126 |
| Figura 85. Cromatograma obtido para o P2 (25,0 µg/kg) na calibração utilizada para a validação do método..... | 126 |
| Figura 86. Cromatograma obtido para o P3 (50,0 µg/kg) na calibração utilizada para a validação do método..... | 127 |
| Figura 87. Cromatograma obtido para o P4 (100,0 µg/kg) na calibração utilizada para a validação do método..... | 127 |
| Figura 88. Cromatograma obtido para o P5 (150,0 µg/kg) na calibração utilizada para a validação do método..... | 128 |
| Figura 89. Cromatograma obtido para o P6 (250,0 µg/kg) na calibração utilizada para a validação do método..... | 128 |
| Figura 90. Folha de validação do método para a ENR no que diz respeito à regressão linear..... | 129 |
| Figura 91. Folha de validação do método para a ENR no que diz respeito à curva polinomial..... | 130 |
| Figura 92. Folha de validação do método para a ENR no que diz respeito ao cálculo dos limites analíticos. | 130 |
| Figura 93. Folha de validação do método para a NOR no que diz respeito à regressão linear..... | 131 |
| Figura 94. Folha de validação do método para a NOR no que diz respeito à curva polinomial..... | 132 |
| Figura 95. Folha de validação do método para a NOR no que diz respeito ao cálculo dos limites analíticos. | 132 |
| Figura 96. Folha de validação do método para a CIP no que diz respeito à regressão linear..... | 133 |
| Figura 97. Folha de validação do método para a CIP no que diz respeito à curva polinomial..... | 134 |
| Figura 98. Folha de validação do método para a CIP no que diz respeito ao cálculo dos limites analíticos. | 134 |

| | |
|--|-----|
| Figura 99. Folha de validação do método para a DIF no que diz respeito à regressão linear..... | 135 |
| Figura 100. Folha de validação do método para a DIF no que diz respeito à curva polinomial..... | 136 |
| Figura 101. Folha de validação do método para a DIF no que diz respeito ao cálculo dos limites analíticos. | 136 |
| Figura 102. Folha de validação do método para a SAR no que diz respeito à regressão linear..... | 137 |
| Figura 103. Folha de validação do método para a SAR no que diz respeito à curva polinomial..... | 138 |
| Figura 104. Folha de validação do método para a SAR no que diz respeito ao cálculo dos limites analíticos. | 138 |
| Figura 105. Cromatograma obtido após a análise do solo 1. | 139 |
| Figura 106. Cromatograma obtido após a análise do solo 2. | 139 |
| Figura 107. Cromatograma obtido após a análise do solo 3. | 140 |
| Figura 108. Cromatograma obtido (apenas para as FQs quantificáveis nesta amostra) após a análise da lama 1..... | 140 |
| Figura 109. Cromatograma obtido (apenas para as FQs quantificáveis nesta amostra) após a análise da lama 2..... | 140 |
| Figura 110. Cromatograma obtido (apenas para as FQs quantificáveis nesta amostra) após a análise da lama 3..... | 140 |
| Figura 111. Cromatograma obtido após a análise do fertilizante 1. | 140 |
| Figura 112. Cromatograma obtido após a análise do fertilizante 2. | 140 |
| Figura 113. Cromatograma obtido após a análise do fertilizante 3. | 140 |

Índice de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Descrição resumida das quatro principais etapas de tratamento de águas residuais nas ETARs. | 7 |
| Tabela 2. Lista de fármacos considerados poluentes emergentes..... | 11 |
| Tabela 3. Algumas propriedades das FQs de interesse, assim como algumas das bactérias contra as quais são eficazes. | 16 |
| Tabela 4. Compilação das vantagens e desvantagens associadas à utilização do ASE350. | 24 |
| Tabela 5. Condições iniciais definidas no UPLC-MS/MS..... | 40 |
| Tabela 6. Apresentação dos resultados obtidos na otimização das massas para as FQs em estudo no UPLC. | 41 |
| Tabela 7. Parâmetros da equação da reta e coeficientes de correlação obtidos a partir das curvas da calibração direta realizada para cada FQ..... | 42 |
| Tabela 8. Condições definidas no ASE350 utilizadas como ponto de partida para o processo de extração deste estudo..... | 42 |
| Tabela 9. Solventes utilizados na otimização do processo de extração por ASE. | 44 |
| Tabela 10. Resultados obtidos no UPLC relativamente ao solvente definido como o mais apropriado para a extração de FQs no ASE. Apresentação das áreas obtidas em 3 extrações para cada composto, da média das áreas das 3 extrações e do respetivo desvio padrão relativo. | 45 |
| Tabela 11. Resultados obtidos no UPLC relativamente à temperatura definida como a mais apropriada para a extração de FQs no ASE. Apresentação das áreas obtidas em 3 extrações para cada composto, da média das áreas das 3 extrações e do respetivo desvio padrão relativo. | 47 |
| Tabela 12. Resultados obtidos no UPLC relativamente ao número de ciclos definido como o mais apropriado para a extração de FQs no ASE. Apresentação das áreas obtidas em 3 extrações para cada composto, da média das áreas das 3 extrações e do respetivo desvio padrão relativo. | 49 |

| | |
|---|----|
| Tabela 13. Resultados obtidos no UPLC relativamente ao tempo estático definido como o mais apropriado para a extração de FQs no ASE. Apresentação das áreas obtidas em 3 extrações para cada composto, da média das áreas das 3 extrações e do respetivo desvio padrão relativo. | 50 |
| Tabela 14. Compilação das condições de extração finais, definidas no ASE após a otimização cuidada dos parâmetros que mais influenciam a eficiência da extração. | 51 |
| Tabela 15. Condições de condicionamento do cartucho, diluição e quantidade de amostra aspirada, lavagem e secagem do cartucho e eluição dos analitos definidas no ASPEC. | 51 |
| Tabela 16. Resultados obtidos no UPLC relativamente ao cartucho definido como o mais apropriado para o <i>clean-up</i> dos extratos obtidos no ASE. Apresentação das áreas obtidas em 3 extrações para cada composto, da média das áreas das 3 extrações e do respetivo desvio padrão relativo. | 53 |
| Tabela 17. Resultados obtidos no UPLC relativamente ao mesmo extrato submetido aos dois diferentes procedimentos: com e sem SPE. Apresentação das áreas obtidas para cada composto e as perdas associadas. | 54 |
| Tabela 18. Resultados obtidos no UPLC relativamente à diluição dos extratos obtidos no ASE definida como a mais apropriada para o <i>clean-up</i> destes. Apresentação das áreas obtidas em 3 extrações para cada composto, da média das áreas das 3 extrações e do respetivo desvio padrão relativo. | 57 |
| Tabela 19. Resultados obtidos no UPLC relativamente ao nível de concentração testado nos extratos após SPE definido como o mais apropriado. Apresentação das áreas obtidas em 3 extrações para cada composto, da média das áreas das 3 extrações e do respetivo desvio padrão relativo. | 59 |
| Tabela 20. Resultados obtidos após a validação do método para todas as FQs em estudo... | 81 |
| Tabela 21. Limites de deteção (LD) e quantificação (LQ) teóricos obtidos a partir das curvas de calibração. | 82 |
| Tabela 22. Limites de deteção e quantificação (média dos 3 ensaios) obtidos experimentalmente e respetivo DPR. | 82 |
| Tabela 23. Resultados obtidos no teste de repetibilidade ao nível do P2 (25 µg/kg). | 83 |
| Tabela 24. Resultados obtidos para a determinação da precisão intermédia (100 µg/kg). ... | 83 |

| | |
|---|-----|
| Tabela 25. Taxas de recuperação obtidas para cada FQ ao longo de toda a gama de trabalho. | 84 |
| Tabela 26. Critérios de identificação dos compostos. | 84 |
| Tabela 27. Concentração de FQs (em $\mu\text{g}/\text{kg}$) determinada nas amostras de solo, lama e fertilizante analisadas..... | 85 |
| Tabela 28. Apresentação dos valores de TR e <i>ion ratio</i> obtidos para os compostos encontrados nas amostras de lama..... | 85 |
| Tabela 29. Compilação da média das áreas obtidas nas 3 extrações realizadas para os diferentes solventes testados e respetivos DPR. | 108 |
| Tabela 30. Compilação da média das áreas obtidas nas 3 extrações realizadas para as diferentes temperaturas testadas e respetivos DPR. | 111 |
| Tabela 31. Compilação da média das áreas obtidas nas 3 extrações realizadas para o diferente número de ciclos testados e respetivos DPR. | 113 |
| Tabela 32. Compilação da média das áreas obtidas nas 3 extrações realizadas para as diferentes durações de cada ciclo (tempo estático) testadas e respetivos DPR. | 118 |
| Tabela 33. Compilação da média das áreas obtidas nas 3 extrações realizadas para os diferentes cartuchos testados e respetivos DPR. | 120 |
| Tabela 34. Compilação da média das áreas obtidas nas 3 extrações realizadas para as diferentes diluições da amostra testadas e respetivos DPR. | 120 |
| Tabela 35. Compilação da média das áreas obtidas nas 3 extrações realizadas para testar diferentes níveis a que se pode concentrar os analitos e respetivos DPR. | 123 |

CAPÍTULO 1.

Introdução

1.1 Objetivos do Trabalho

Apesar de já terem sido desenvolvidos alguns métodos para a determinação de FQs em solos e sedimentos, poucos estão direcionados para a determinação destes antibióticos em lamas [1]. Esta área continua, portanto, insuficientemente documentada devido, principalmente, à falta de métodos adequados já que a deteção e quantificação de tais poluentes em matrizes sólidas são verdadeiros desafios que se colocam ao analista dada a diversidade dos analitos, a sua presença em quantidades vestigiais e a complexidade das lamas, que tornam a etapa de preparação da amostra difícil e demorada [2].

Posto isto, e tendo em conta a posterior aplicação destas lamas em solos agrícolas, desenvolveu-se um método que consiste numa extração por ASE, seguida de *clean-up* dos extratos por SPE e posterior análise por UPLC-MS/MS. Realizou-se a otimização cuidada de todos os parâmetros que influenciam a extração bem como alguns dos parâmetros que influenciam o processo de *clean-up* e de deteção dos compostos em estudo. Como objetivo final pretende-se que, após validação, o método desenvolvido permita a análise de FQs em matrizes sólidas com elevada sensibilidade e robustez.

1.2 Organização da Tese

Esta tese encontra-se dividida em 8 capítulos. Numa primeira fase começa-se por expor os principais objetivos deste estudo, bem como o estado da arte do tema estudado (capítulo 1).

No capítulo 2 é abordado o conteúdo teórico associado à investigação em causa começando por uma explicação resumida das principais etapas de tratamento de águas residuais nas ETARs. Referem-se também as propriedades, características, consumo e destino ambiental dos compostos em estudo. Os principais métodos de extração e de *clean-up* adequados a este caso são também explicados, bem como o método cromatográfico utilizado.

Posteriormente, faz-se uma descrição cuidada de todos os parâmetros otimizados no desenvolvimento do método analítico (capítulo 3). Este método analítico desenvolvido foi aplicado a amostras reais e todos os pormenores relacionados com o procedimento seguido, equipamentos, material e reagentes utilizados estão descritos no capítulo 4.

Os parâmetros determinados na validação do método analítico, tais como a linearidade, gama de trabalho, limiares analíticos, precisão e recuperação são fundamentados no capítulo 5 e no capítulo 6 são apresentados e discutidos os resultados obtidos na validação e na quantificação das amostras.

As conclusões retiradas deste estudo, bem como a novidade que o mesmo traz à comunidade científica e as perspetivas do que poderia ser melhorado e mais profundamente analisado, encontram-se no capítulo 7.

Por último, o capítulo 8 contém as referências bibliográficas que fundamentaram esta dissertação.

CAPÍTULO 2.

Fundamentação Teórica

2.1 Tratamento de Águas Residuais

A água gasta diariamente pela população, quer nas casas quer nas indústrias, após utilização designa-se por água residual e contém, frequentemente, matéria orgânica, nutrientes, agentes patogénicos, sedimentos, minerais e, por vezes, compostos tóxicos. O seu tratamento é feito através das Estações de Tratamentos de Águas Residuais (ETARs) no sentido de evitar a contaminação dos locais de descarga [3].

De uma forma geral, o tratamento das águas residuais compreende quatro grandes passos – tratamento preliminar, tratamento primário, tratamento secundário e tratamento terciário e avançado – que se encontram descritos na tabela 1 [4]. A figura 1 é um exemplo de como as diferentes etapas de tratamento se encontram distribuídas numa ETAR.

Tabela 1. Descrição resumida das quatro principais etapas de tratamento de águas residuais nas ETARs. (Adaptado da referência 4)

| | | |
|---|------------------------------|--|
| 1 | Tratamento Preliminar | Remoção dos detritos e materiais de maiores dimensões. |
| 2 | Tratamento Primário | Realização de processos físicos tais como tamisação, sedimentação, filtração e transferência de gases. |
| 3 | Tratamento Secundário | Realização de processos biológicos (por exemplo a filtração biológica e o processo das lamas ativadas) para a remoção de CBO e químicos (por exemplo coagulação, precipitação e troca de iões) para a remoção de impurezas. Geralmente ocorre a remoção de nutrientes. |
| 4 | Tratamento Terciário | Realização de processos químicos para a remoção de CBO, nutrientes, patogénicos, parasitas e, por vezes, substâncias tóxicas, através da osmose inversa, ultrafiltração, ozonização, cloragem e bioreatores em membrana (métodos avançados). |

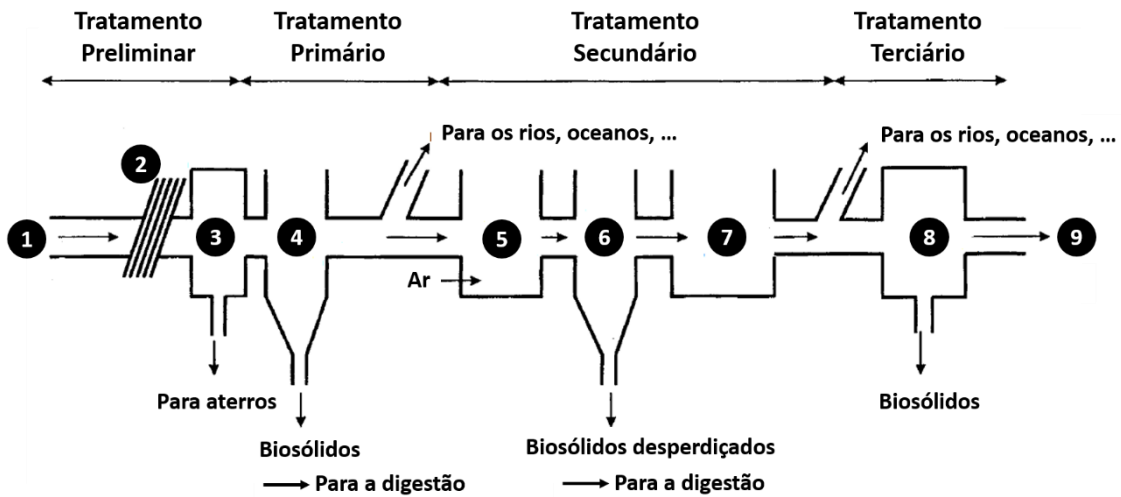


Figura 1. Esquema representativo e generalizado das várias etapas de tratamento numa ETAR. (Adaptado da referência 4) **1-** Entrada das águas residuais; **2-** Grade/peneira; **3-** Desarenação; **4-** Tanque de decantação primária; **5-** Tanque de arejamento; **6-** Tanque de decantação; **7-** Desinfeção (ex.: cloro, ozono, ...); **8-** Tratamento terciário (ex.: floculação, carvão ativado, ...); **9-** Efluente final.

Para este trabalho foi selecionada uma ETAR para recolha das amostras de lamas que tem a particularidade de aproveitar as lamas produzidas na ETAR para a produção de um fertilizante orgânico natural pelo processo de compostagem, no qual se adiciona casca de pinheiro moída ou serrim de pinho às lamas em condições controláveis e reprodutíveis. Esta reciclagem das lamas produzidas no processo de tratamento consiste em submete-las a um processo de transformação por microrganismos sem oxigénio (digestão anaeróbia) após o seu espessamento e, posteriormente, desidratá-las e enviá-las para a estação de compostagem de lamas contígua à ETAR onde é produzido o corretivo orgânico que resulta da compostagem acima descrita. Apresenta-se na figura 2 um esquema da ETAR alvo, este já bem mais detalhado daquilo que acontece especificamente nesta estação de tratamento. A partir deste esquema é também possível verificar que esta ETAR tem ainda desenvolvido um sistema de aproveitamento de biogás para futuramente permitir a autossuficiência energética.

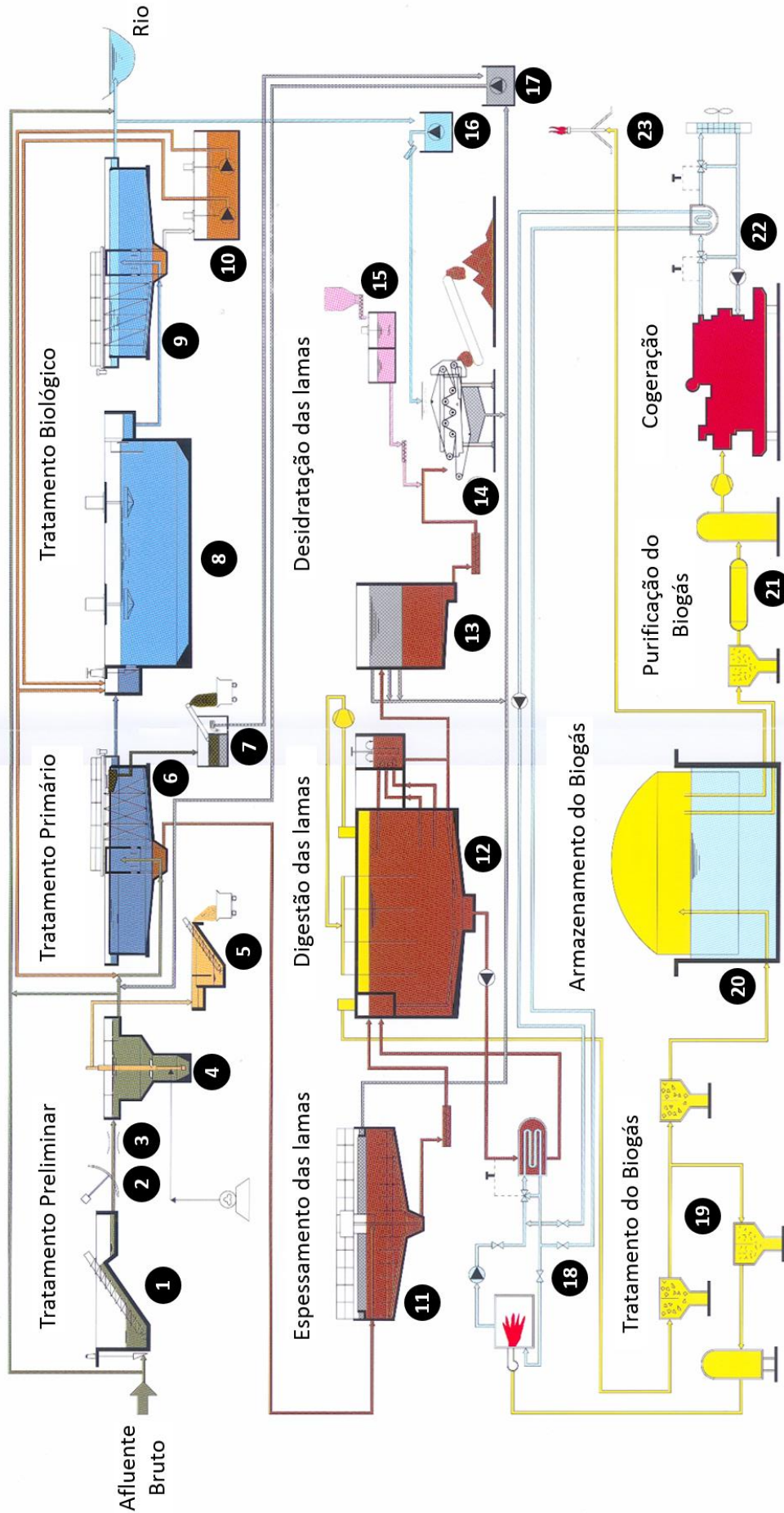


Figura 2. Esquema da ETAR selecionada para o estudo. 1- Elevação de águas residuais; 2- Gradagem; 3- Medição de caudal; 4- Desarenação; 5- Separação de areias; 6- Decantação primária; 7- Remoção de escumas; 8- Arejamento; 9- Decantação secundária; 10- Edifício de exploração de recirculação e excesso de lamas; 11- Espessamento de lamas; 12- Digestão primária anaeróbia; 13- Digestão secundária; 14- Desidratação mecânica das lamas; 15- Sistema de doseamento de polieletrólito; 16- Bombagem de efluente tratado (lavagem dos filtros); 17- Elevação de escorrências; 18- Aquecimento das lamas; 19- Remoção de impurezas do biogás; 20- Armazenamento de biogás a pressão constante (Gasómetro); 21- Tratamento do biogás; 22- Sistema de cogeração; 23- Queimador de gás em excesso.

2.2 Poluentes Emergentes

Está bem definido na literatura que as águas residuais contêm uma gama diversa de compostos antropogénicos e que a sua análise quantitativa coloca inúmeros problemas analíticos, nomeadamente na eficiência da extração para eliminar os interferentes presentes. Um grande número de fármacos é incluído nesta lista de “poluentes emergentes” devido à elevada utilização pela população [5]. Designam-se por “poluentes emergentes” novos produtos ou químicos sem estatuto regulamentar cujos efeitos a médio ou a longo prazo no ambiente e/ou na saúde humana são desconhecidos [6]. A lista de compostos considerados poluentes emergentes é já bastante extensa e, por isso, apresenta-se na tabela 2 apenas a categoria de compostos farmacêuticos dos quais fazem parte as FQs de interesse para o presente estudo que se encontram sublinhadas e destacadas a negrito [7].

2.2.1 Compostos Farmacêuticos

Os fármacos são um grupo amplo e diversificado de compostos concebidos para prevenir, curar e tratar doenças e para melhorar a saúde, utilizados há muito tempo a nível mundial em quantidades significativas [8]. São utilizados quer para fins veterinários quer na medicina humana [9] e pertencem à categoria de poluentes emergentes mais estudada o que origina um aumento nas publicações científicas, comprovando o seu potencial em prejudicar o ambiente [10]. Os compostos farmacêuticos tanto podem ser altamente ativos em humanos e animais como podem ser tóxicos para muitos organismos infeciosos, levando a crer que, após a sua libertação, possam também ter efeitos desconhecidos em animais e microrganismos no meio ambiente [11].

Neste estudo, abordar-se-ão apenas compostos que pertencem ao grupo dos fármacos anti-infeciosos, mais especificamente os antimicrobianos.

Tabela 2. Lista de fármacos considerados poluentes emergentes. (Adaptado da referência 7)

| | | |
|---|---|-----------------------|
| 1,1,1-Tricloro-2,2-dihidroxietano (Hidrato de Cloral) | Daunorrubicina | Mebeverinea |
| 17-alfa-Estradiol | Desmetilnaproxeno (metabolito do NAPROXENO) | Medazepam |
| 17-alfa-Etinilestradiol | Dexametasona | Meprobamato |
| 17-beta-Estradiol | Diatrizoato | Mestranol |
| 1-Hidroxi-Ibuprofeno | Diazepam | Metformina |
| 2-Hidroxi-Ibuprofeno | Diclofenac | Meticilina |
| Acebutolol | Dicloxacilina | Metilfenobarbital |
| Acecarbromal | Dietilstilbestrol | Metoprolol |
| Aceclofenac | Difenidramina | Mevastatina |
| Acemetacina | Difloxacina | Minociclina |
| Acetaminofeno (Paracetamol) | Domperidona | Nadolol |
| Acetazolamida | Doxepina | Nafcilina |
| Aciclovir | Doxiciclina (anidra) | Nandrolona |
| Ácido Acetilsalicílico (Aspirina) | Doxiciclina (monohidratada) | Naproxeno |
| Ácido Clofibrato (metabolito do CLOFIBRATO) | Doxorrubicina | Neomicina B |
| Ácido Fenofibrato (Metabolito do FENOFIBRATO) | Enoxacina | N-Metilfenacetina |
| Ácido Meclofenâmico | Enrofloxacina | Nordiazepam |
| Ácido Mefenâmico | Epirrubicina | Norfloxacina |
| Ácido Oxolinico | Eritromicina | Novobiocina |
| Ácido Tolfenâmico | Escitalopram | Ofloxacina |
| Ácido Valpróico | Esomeprazol | Oleandomicina |
| Albuterol | Espectinomina | Omeprazole |
| Alclofenac | Espiramicina | Oxacilina |
| Alobarbitol | Estreptomina | Oxazepam |
| Alprazolam | Estriol | Oxitetraciclina |
| Amitriptilina | Estrona | Oxprenolol |
| Amobarbital | Etofibrato | Paroxetina |
| Amoxicilina | Etosuximida | Penicilina G |
| Ampicilina | Famotidina | Penicilina V |
| Antraceno-1,4-diona | Fenazona | Pentobarbital |
| Apramicina | Fenfluramina | Pentoxifilina |
| Aprobarbital | Fenilbutazona | Pindolol |
| Atenolol | Fenitoína | Pipamperon |
| Azitromicina | Fenobarbital | Pravastatina |
| Baclofeno | Fenofibrato | Prednisolona |
| Baquiloprim | Fenoprofeno | Primidona |
| Betametasona | Fenoprofeno sal de cálcio di-hidratado | Propifenazona |
| Beta-sitosterol | Fenoterol | Propranolol |
| Betaxolol | Flucloxacilina | Ranitidina |
| Bezafibrato | Flumequina | Roxitromicina |
| Bisoprolol | Fluorouracilo | Salbutamol |
| Bromazepam | Fluoxetina | Sarafloxacina |
| Butalbital | Fluvoxamina | Secobarbital |
| Cafeína | Furosemda | Secobarbital de Sódio |
| Carazolol | Gemfibrozil | Sertralina |
| Carbamazepina | Gentamicina | Sinvastatina |
| Carbonato de Lítio | Glibenclamida (Gliburida) | Sotalol |
| Cefacetril | Hexobarbital | Sulfadiazina |
| Cefalexina | Hidroclorotiazida | Sulfadimetoxina |
| Cefalónio | Hidrocodona | Sulfadoxina |
| Cefapirina | Ibuprofeno | Sulfamerazina |
| Cefazolina | Ifosfamida | Sulfametazina |
| Cefoperazona | Imapramina | Sulfametoxazol |
| Cetoprofeno | Iminoestilbeno | Sulfapiridina |
| Ciclofosfamida | Indometacina | Sulfato de Albuterol |
| Ciprofloxacina | Iohexol | Sulfato de Estrona |
| Citalopram | Iomeprol | Sulfato de Kanamicina |
| Claritromicina | Iopamidol | Taloxa |
| Clenbuterol | Iopromida | Temazepam |
| Cloranfenicol | Ivermectina | Terbutalina |
| Clorobutanol | Josamicina | Tetraciclina |
| Clorotetraciclina | Lamotrigina | Tiamulina |
| Clotrimazol | Lansoprazol | Tilmicosina |
| Cloxacilina | Levetiracetam | Tilosina |
| Codeína | Lidocaína | Timolol |
| Colesterol | Lincomicina | Tramadol |
| Crotamiton | Loratadina | Trimetoprim |
| Danofloxacina | Lorazepam | Valnemulina |
| Dantroleno | Lovastatina | Verapamilo |
| Dapsona | Marbofloxacina | Zolpidem |

2.2.2 Antibióticos

Os antibióticos são compostos químicos que têm sido utilizados desde que foram descobertos por Alexander Fleming em 1928, quando a penicilina foi descoberta e mais tarde publicada como tratamento para infecções, inflamações e doenças [12]. São substâncias produzidas por diversas espécies de microrganismos (bactérias, fungos, entre outros) que suprimem o crescimento de outros microrganismos, ligando-se a eles e interferindo nas suas funções [13].

Uma das maiores famílias de antibióticos é composta por derivados de quinolonas (QNs) e este estudo será, portanto, dirigido a este grupo relativamente recente de antibióticos sintéticos [14, 15].

2.2.3 Fluoroquinolonas

As quinolonas (QNs) e as fluoroquinolonas (FQs) são um grupo de antibióticos bastante utilizados no tratamento de uma grande variedade de infecções bacterianas obtidos por derivação do ácido nalidíxico (figura 3) em 1962 [16]. Estão entre as mais importantes classes de antibióticos sintéticos utilizadas em todo o mundo, tanto na medicina humana como na veterinária, essencialmente devido ao seu amplo espectro de atividade contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e micoplasma e pela sua boa absorção oral [17-19]. A sua atividade bactericida resulta da inibição da ADN girase e da topoisomerase IV, enzimas essenciais para a replicação e transcrição do ADN bacteriano [17, 20].

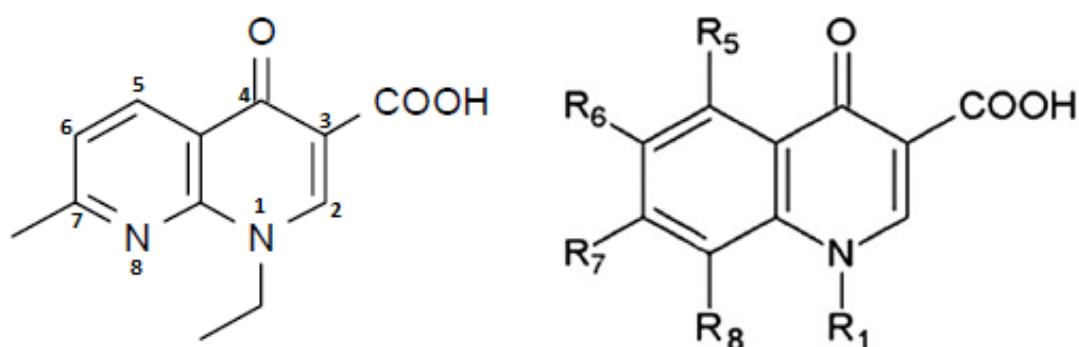


Figura 3. Estrutura química do ácido nalidíxico (à esquerda) e estrutura típica das QNs (à direita).
(Adaptado das referências 25 e 30)

Os diferentes derivados de QNs surgem a partir da substituição do átomo de azoto na posição 8 do ácido nalidíxico por um átomo de carbono como demonstra a figura 3 [21]. As FQs são derivados piperazínicos da QN ácido nalidíxico e representam a segunda geração desta família de antibióticos [22]. Resultam da introdução de um átomo de flúor na posição 6 da estrutura base da QN (figura 4) e na posição 7 encontra-se sempre um derivado piperazínico como se poderá verificar no caso das FQs estudadas [23, 24]. Constatou-se que estas modificações estruturais na estrutura da QN melhoravam significativamente a atividade da mesma, aumentando assim o seu espectro antibacteriano. Isto levou a um aumento dos esforços em síntese orgânica para, através da introdução de diferentes substituintes R1, R2 e R3, aperfeiçoar este tipo de compostos no sentido de otimizar a farmacocinética e reduzir a toxicidade, criando assim FQs novas e mais eficazes com um espectro de atividade mais amplo [25].

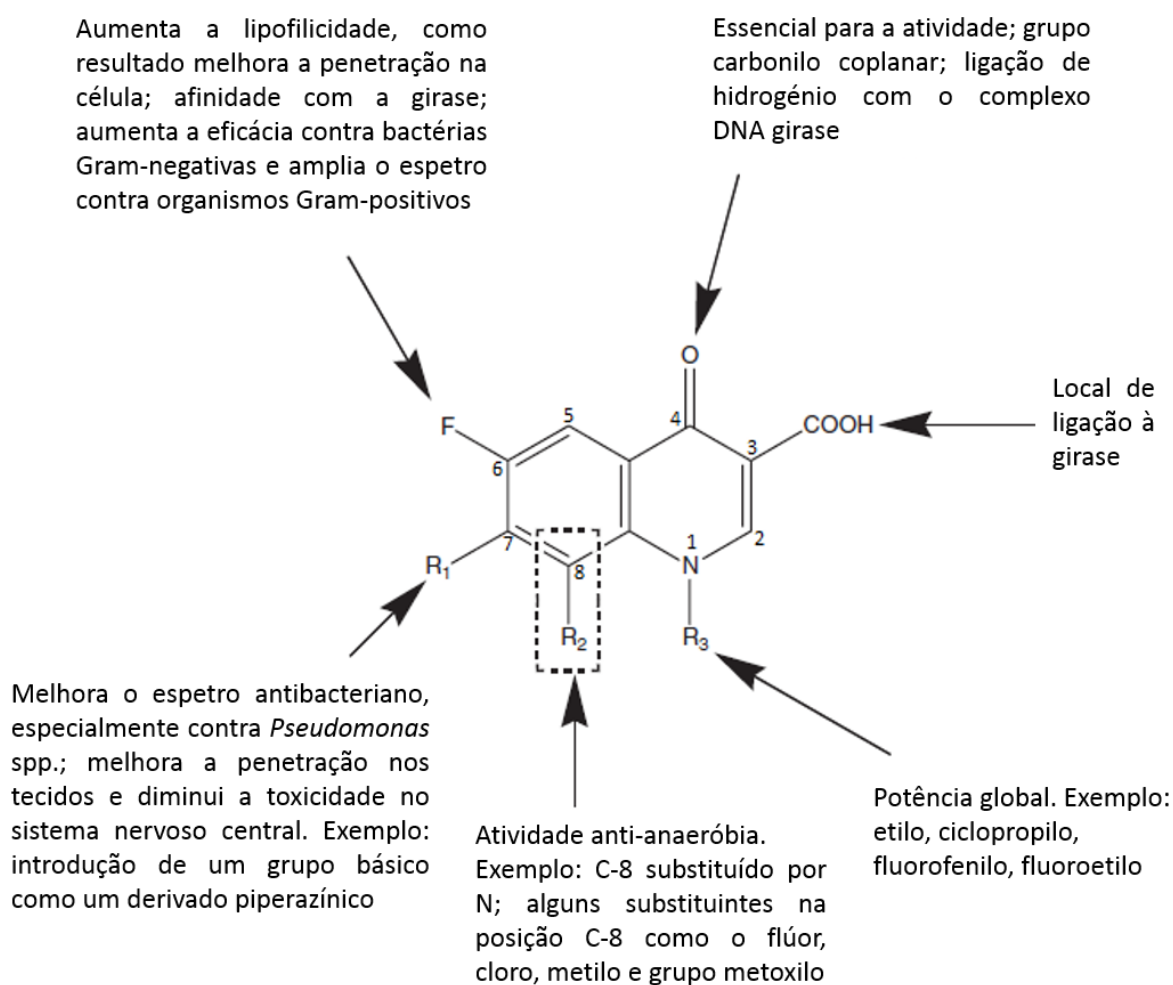


Figura 4. Estrutura geral das FQs. (Adaptado da referência 26)

As estruturas das FQs de interesse para este trabalho – ciprofloxacina (CIP), difloxacina (DIF), enrofloxacina (ENR), norfloxacina (NOR) e sarafloxacina (SAR) – estão apresentadas na figura 5, podendo observar-se as suas semelhanças. As diferenças entre elas ajudam na sua classificação em gerações baseadas no seu espectro bacteriano sendo que, as gerações mais recentes possuem uma estrutura mais complexa e um espectro de atividade mais amplo [25]. Contudo, parece não haver consenso na distinção destas gerações. Existem autores que consideram a existência de 4 gerações de FQs [16, 27], enquanto outros mencionam apenas três [28, 29]. Atendendo à informação encontrada na literatura para os compostos alvo desta investigação, verifica-se que todos os autores consideram que a CIP pertence à 2ª geração de FQs [27-31]. Já à NOR, muito menos referida na literatura, atribuem-lhe a 1ª geração [31] mas também a 2ª geração de FQs [27], não sendo possível afirmar qual a geração a que realmente pertence. A ENR é considerada, por vários autores, uma FQ de 2ª geração [25, 27, 30] enquanto a DIF e a SAR têm informação diferente na literatura consultada. Ambas são consideradas por Xiao et al. FQs de 3ª geração [27] embora outros autores afirmem que pertencem à 2ª geração [25, 28, 30]. Isto pode, eventualmente, levantar algumas dificuldades na interpretação de dados que refiram apenas a geração e não o composto específico.

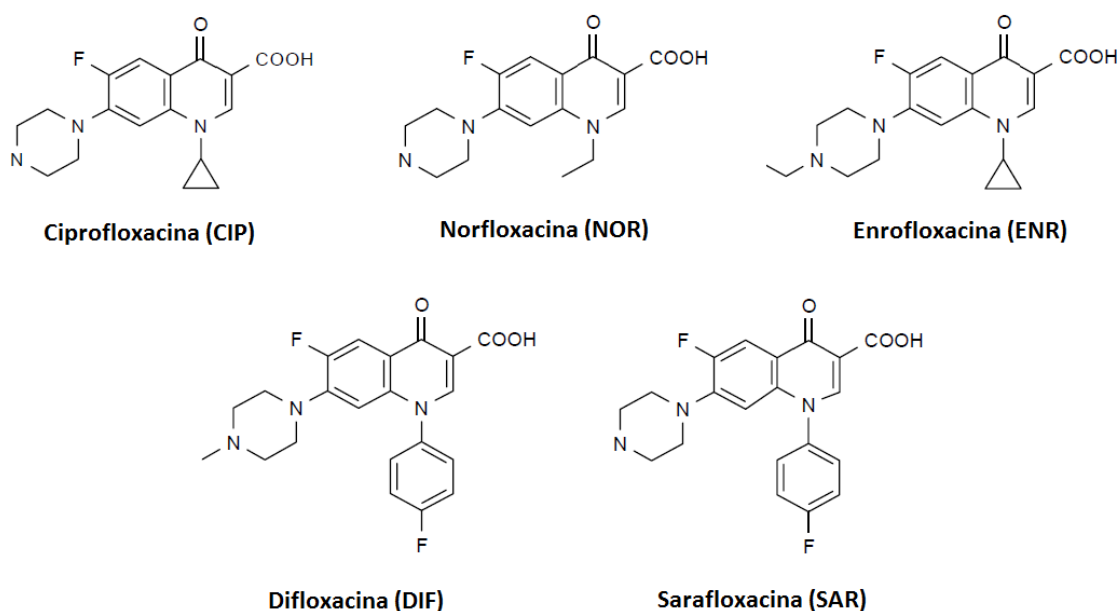


Figura 5. Estruturas químicas das FQs de interesse para o presente estudo. (Adaptado da referência 32)

2.2.4 Propriedades e Indicações Terapêuticas

Como já foi referido, as FQs são um grupo de antibióticos frequentemente utilizado em todo o mundo quer a nível terapêutico, quer a nível sub-terapêutico para promover o crescimento animal [33]. De uma forma geral, são utilizadas no tratamento de diversas infeções (maioritariamente do trato urinário e do aparelho digestivo) mas são apenas aconselhadas num pequeno número de situações clínicas já que, na maioria dos casos, são alternativas terapêuticas quando a primeira escolha de tratamento não apresenta resposta [20]. São raros os casos em que as reações adversas são graves, no entanto, as gerações mais recentes de FQs estão associadas a efeitos secundários graves, estando o seu potencial ecotóxico e genotóxico a ser alvo de grandes preocupações resultando numa utilização restrita destes compostos [19, 20].

As FQs são moléculas com um comportamento zwitteriónico devido à existência de grupos funcionais ionizáveis, e a natureza do solvente pode afetar significativamente o comportamento ácido-base destes compostos devido à presença de grupos amino e grupos carboxilo [17, 34]. Os grupos polares existentes ligados a um núcleo lipofílico garantem a estas moléculas uma solubilidade em água relativamente boa. Estas características atribuem às FQs uma forte interação com a matéria orgânica devido às interações hidrofóbicas e eletrostáticas e às ligações de hidrogénio, permitindo a adsorção em vários tipos de matrizes sólidas tais como fezes, solos, lamas e sedimentos originando uma resistência à biodegradação. Em consequência da presença de um anel heterocíclico as FQs apresentam ainda uma grande estabilidade química que as torna resistentes à hidrólise e ao calor sendo, por isso, consideradas contaminantes altamente persistentes [17]. Algumas das propriedades destes compostos encontram-se listadas na tabela 3.

Tabela 3. Algumas propriedades das FQs de interesse, assim como algumas das bactérias contra as quais são eficazes. (Adaptado das referências 18, 25, 32, 34-36)

| FQ | M (g/mol) | Uso | pKa1 | pKa2 | Ativa contra |
|-----|-----------|-------------|------|------|--|
| CIP | 331,35 | Humano | 5,90 | 8,89 | <i>Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae, pseudomonas aeruginosa</i> |
| DIF | 399,39 | Veterinário | 6,17 | 7,41 | <i>E. coli, Staphylococcus spp</i> |
| ENR | 359,46 | Veterinário | 6,27 | 8,30 | <i>E. coli, Salmonella spp, Klebsiella spp</i> |
| NOR | 319,34 | Humano | 6,23 | 8,55 | <i>E. coli, Proteus mirabilis</i> |
| SAR | 385,36 | Veterinário | 6,17 | 8,68 | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> |

2.2.5 Resistência e Consumo de FQs: a Nível Mundial e em Portugal

Em 2000 a Organização Mundial de Saúde (OMS) publica um documento intitulado “Resistência Antimicrobiana: uma ameaça global” [37]. Em 2011 a preocupação mantém-se e o *slogan* do dia mundial da saúde era: “Resistência Antimicrobiana: se não agirmos hoje, não haverá cura amanhã” [38]. A administração de fármacos é a prática mais comum no controlo e tratamento de doenças humanas levantando uma grande preocupação com o elevado e incorreto consumo/prescrição de antibióticos [39]. As organizações relacionadas com a saúde espalhadas pelo mundo têm desenvolvido programas e campanhas de sensibilização da população mundial e dos próprios profissionais de saúde na tentativa de monitorizar o consumo destes medicamentos (figura 6). Ainda recentemente, em novembro de 2013, no Dia Europeu dos Antibióticos o tema foi “antibióticos a mais, saúde a menos”, alertando que a eficácia do antibiótico se encontra comprometida prejudicando o tratamento de várias doenças [40]. A resistência aos antimicrobianos é, por isso, uma das maiores ameaças à saúde pública já que existem diversos estudos epidemiológicos que demonstram uma associação consistente e estatisticamente relevante entre o nível de consumo de classes específicas de antibióticos e a resistência a essas mesmas classes [41].



Figura 6. Campanhas de sensibilização relativamente ao consumo excessivo e incorreto de antibióticos. (Retirado das referências 38 e 40)

A OMS está cada vez mais preocupada com a resistência aos antibióticos: “Esta séria ameaça deixou de ser uma previsão do futuro, está a acontecer agora mesmo em todas as regiões do mundo e tem o potencial de afetar qualquer pessoa, de qualquer idade, em qualquer país” [42]. O mais recente relatório da OMS demonstra que a resistência às FQs para tratamento de infeções urinárias por *E.coli*, que era praticamente zero quando os medicamentos foram introduzidos na década de 1980 e que são atualmente ineficazes em mais de metade dos doentes, existe em todo o mundo, inclusive em Portugal. Ainda que Portugal não tenha dados disponíveis para estes casos, existe também a resistência às FQs pela *Salmonella* nontyphoidal e pela *Shigella* espalhada um pouco por todo o mundo [43].

No que diz respeito aos compostos para utilização na medicina humana, Portugal, numa lista de 30 países europeus, é o 5º país que mais consome antibióticos e o 7º que mais consome QNs, segundo um relatório de vigilância do consumo de antibióticos publicado em 2014 pelo Centro Europeu de Controlo e Prevenção de Doenças (ECDC) que apresenta as estatísticas até 2012¹. Apesar do consumo de antibióticos no geral ter vindo a aumentar entre 2008 e 2012, há boas notícias em relação às FQs. Se por um lado o consumo total de FQs aumentou significativamente entre 1997 e 2009, por outro, um quinto dos países anteriormente referidos demonstrou um decréscimo significativo no consumo destes compostos entre 2008 e 2012. Em 2012 a 2ª geração de QNs foi consumida três vezes mais do que as 1ª e 3ª gerações juntas. Desta 2ª geração a CIP representou 71% das FQs consumidas pela UE [31].

¹ Ter em conta que neste relatório publicado pelo ECDC consideram apenas a existência de 3 gerações de FQs, sendo que a NOR pertence à 1ª geração e a CIP pertence à 2ª. As outras FQs de interesse não constam neste relatório pois são de utilização veterinária.

Quanto aos antibióticos para utilização na medicina veterinária a informação é mais escassa. Segundo a “European Medicines Agency”, em 2011, entre 25 países da UE, Portugal encontra-se entre os 5 que mais consome FQs. Apesar de se verificar uma diminuição de 9% no consumo de antibióticos entre 2010 e 2011, o consumo de FQs aumentou [44].

2.2.6 Fontes de Poluição: Ocorrência e Destino Ambiental

O uso de antibióticos na medicina humana e veterinária tem-se tornado uma prática terapêutica comum levando tanto ao consumo elevado de antibióticos como à acumulação gradual destes no meio ambiente [12]. Grandes frações da dosagem administrada não são, na verdade, assimiladas ou metabolizadas pelo corpo humano, mas sim excretadas, através da urina e das fezes, e libertadas nos esgotos domésticos tendo como destino as ETAR's municipais [39, 45, 46]. Por sua vez, as ETARs não têm a capacidade de remover eficazmente os fármacos em geral e consequentemente uma percentagem elevada destes compostos pode manter-se e atingir o meio ambiente através dos efluentes das ETARs na forma dissolvida ou adsorvidos nas lamas [39].

Devido à sua hidrofobicidade, forte adsorção e fraca biodegradabilidade, as FQs acumulam-se nos sólidos que são formados no tratamento das águas residuais e, por isso, qualquer redução de FQs conseguida durante o tratamento resulta principalmente da adsorção nas lamas, que são o maior reservatório de resíduos destes compostos, onde, de acordo com estudos recentes, se pode encontrar cerca de 70% do total de FQs que entra nas ETARs [47, 48]. Portanto, a adsorção nas lamas representa o principal meio de remoção de FQs durante o tratamento de águas residuais, tornando as lamas das ETARs na mais importante via de introdução de FQs no meio ambiente através da sua aplicação como adubos [2, 49]. O esquema da figura 7 representa as diferentes vias de entrada e deposição de poluentes emergentes no meio ambiente.

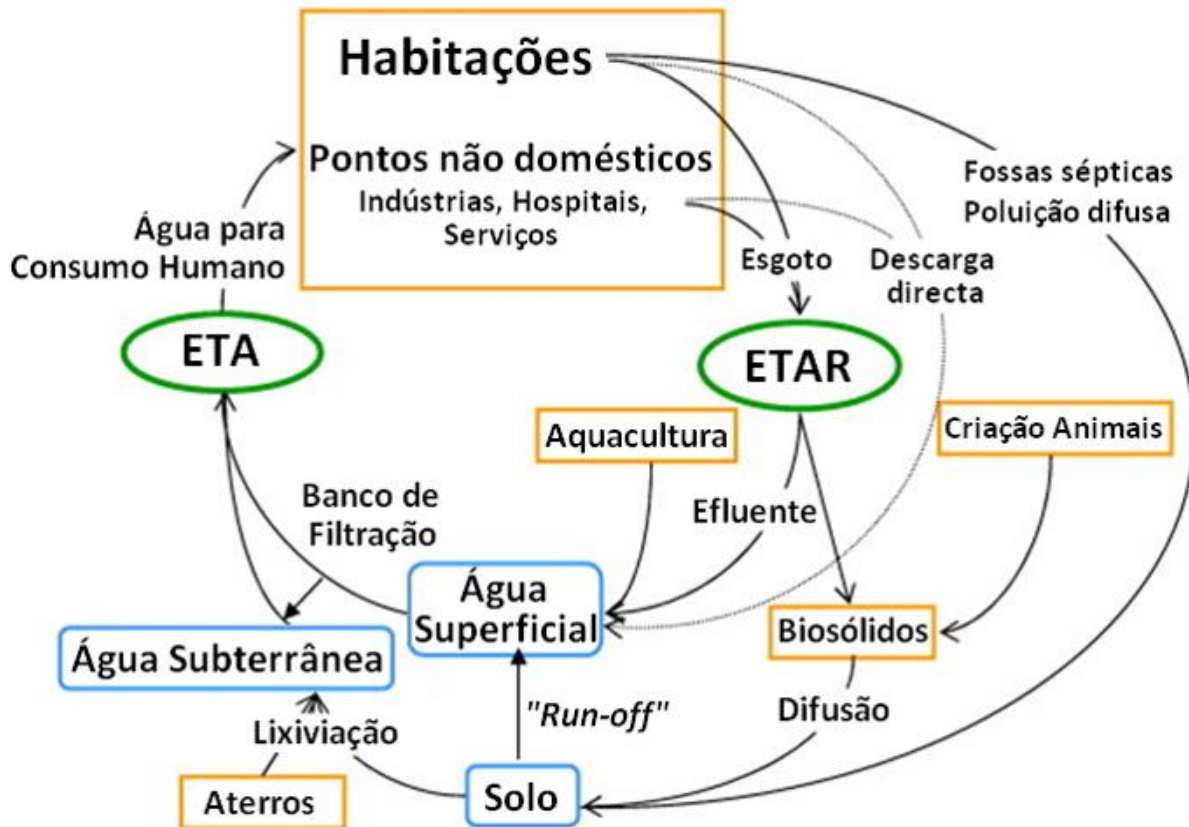


Figura 7. "Ciclo" dos poluentes emergentes no meio ambiente. (Adaptado da referência 50)

Apesar da sua natureza de resíduo perigoso, as lamas das ETARs podem, como já foi referido, ser utilizadas como fertilizantes se antes for realizado um tratamento adequado que as torne seguras para o solo. No entanto, pesquisas recentes têm demonstrado que estas lamas, designadas por lamas de depuração (biosólidos), contêm sempre vestígios de fármacos, inclusive antibióticos [51]. Apesar desta aplicação das lamas tratadas na agricultura ser controversa, esta é uma prática utilizada em vários países e representa uma via de entrada dos produtos farmacêuticos e outros contaminantes orgânicos no meio ambiente [49]. Mesmo a baixas concentrações, a exposição crónica a antibióticos pode exercer uma pressão seletiva no desenvolvimento de estirpes bacterianas resistentes a estes [39]. De facto, pela literatura é possível verificar que a concentração de resíduos de antibióticos detetados no ambiente se situa entre os ng/L e os µg/L em águas naturais e residuais e entre os µg/kg e os mg/kg em solos e lamas, podendo originar a longo prazo o desenvolvimento, subsistência, transferência e propagação das bactérias e genes resistentes a antibióticos e ter impactos significativos nos ecossistemas [52].

No que diz respeito às FQs de aplicação na medicina veterinária, mais uma vez a literatura consultada é muito escassa. No entanto, prevê-se que a liberação destas no meio ambiente ocorra através da medicação animal na piscicultura, onde a ração medicada e as fezes podem acabar nos sedimentos, e/ou na dispersão de estrume e excrementos de animais nos solos [53, 54].

2.2.7 Legislação

Apesar da existência de legislação relativamente à aplicação de lamas nos solos [55], esta apenas apresenta limites de concentração para metais pesados (cádmio, cobre, níquel, chumbo, zinco, mercúrio e crómio), alguns compostos orgânicos (LAS, NPE, PAH, PCB, PCDD e PCDF) e microrganismos (*E.coli* e *Salmonella*), sendo omissa no que respeita a valores de referência para a presença de antibióticos, o que levanta grandes questões sobre os riscos associados à presença de substâncias emergentes nas lamas utilizadas como matéria-prima e adubo [2].

2.3 Métodos de Extração

2.3.1 Métodos Clássicos e Métodos Mais Comuns

Existem vários métodos de extração mas aquele mais comum para a extração de lamas em ETARs é a extração por Soxhlet [47]. Apesar de ser uma técnica muito demorada, trabalhosa e que requer um grande volume de solvente orgânico, tem sido muito aplicada devido à sua elevada eficiência de extração [56]. Mais recentemente, outras técnicas são também aplicadas com sucesso nesta área como, por exemplo, a Extração Assistida por Ultrassons (USE), a Extração Assistida por Micro-ondas (MAE), a Extração por Fluido Supercrítico (SFE), a Extração com Líquido Pressurizado (PLE) entre outras [1, 47]. A USE surge como alternativa à extração por Soxhlet por ser uma técnica menos demorada embora menos reprodutível [56]. No entanto, a MAE e a PLE demonstram ser mais vantajosas que a USE uma vez que juntamente com a elevada eficiência de extração têm ainda um grau de automatização superior [1]. A técnica de MAE é ainda vantajosa na medida em que reduz os tempos de extração, requer menores volumes de solventes orgânicos podendo mesmo estes

ser substituídos por meios micelares [47]. No diagrama da figura 8 estão apresentadas algumas técnicas de extração de acordo com a frequência da sua utilização sendo possível verificar que, depois das técnicas de extração tradicionais, a PLE (também conhecida por ASE) é das mais comuns, sendo também a técnica de interesse para o presente trabalho cujas características serão apresentadas no ponto seguinte.

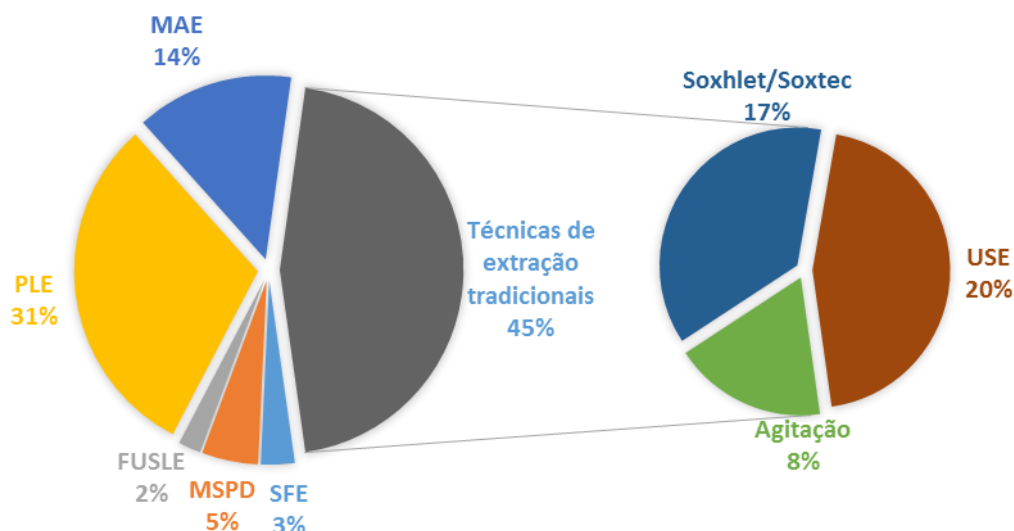


Figura 8. Técnicas de extração, tradicionais e mais recentes, utilizadas na extração de compostos orgânicos das lamas de ETARs. (Adaptado da referência 56)

2.3.2 Extração Acelerada por Solvente (ASE)

2.3.2.1 Fundamentos e Aplicações

Recentemente, a extração acelerada por solvente (ASE) tem atraído grande interesse como uma técnica de extração avançada e ecológica, devido ao seu mérito económico, rápido e automático [57]. É uma extração sólido-líquido que representa um avanço recente na preparação de amostras do ponto de vista analítico e tem como principais vantagens em relação aos outros métodos de extração o decréscimo dramático na quantidade de solvente utilizado e a utilização de solventes convencionais a temperaturas e pressões elevadas para extrair rapidamente os compostos em estudo presentes nas amostras [58, 59]. Esta extração recebeu vários nomes: extração de líquido pressurizado (PLE), extração de solvente pressurizado (PSE), extração com solvente a alta pressão (HPSE), extração com solvente aquecido pressurizado (PHSE), extração com solvente de alta pressão e alta temperatura

(HPHTSE), extração com água aquecida pressurizada (PHWE) e extração com solvente subcrítico (SSE) [59]. Contudo, apesar de ser muito usual na literatura a designarem por PLE, é mais conhecida como ASE, nome comercial atribuído pela Dionex, sendo esse o termo adotado ao longo deste trabalho.

Esta prática analítica surgiu em 1995 e tem demonstrado uma performance equivalente ou superior à extração por Soxhlet quando utilizada para extrair vários compostos orgânicos hidrofóbicos de diferentes amostras ambientais [60, 61]. O processo de extração dos analitos ocorre em três importantes passos: desorção dos analitos a partir de uma partícula sólida, difusão através do solvente localizado no interior de um poro da partícula e transferência para o solvente que passa na célula [61]. A diferenciação, e talvez a maior vantagem, da ASE comparativamente com os outros métodos é o facto de utilizar elevadas temperaturas (50-200 °C) e pressões (500-3000 psi) durante o processo de extração. A temperatura elevada (que é apenas limitada pela temperatura de degradação de cada analito) reduz a viscosidade dos solventes permitindo uma melhor penetração nas partículas da matriz, melhora a extração, diminui a superfície de tensão do solvente, dos solutos e da matriz permitindo que o solvente “molhe” a matriz da amostra mais intimamente, enfraquece e perturba as interações fortes entre os analitos e os componentes da matriz e aumenta as taxas de difusão do solvente e a solubilidade do analito. Por outro lado, a pressão elevada ajuda a manter o solvente no estado líquido na temperatura estabelecida mesmo quando se encontra acima do seu ponto de ebulição, facilita as extrações das amostras nas quais os analitos estão “presos” nos poros da matriz, encaminha o solvente para áreas da matriz que normalmente não entram em contacto com este em condições atmosféricas e melhora a eficiência da extração, pois ao forçar a entrada do solvente nos poros aumenta a disponibilidade dos analitos a serem dissolvidos [62-65].

A ASE pode ser realizada no modo estático ou no modo dinâmico, mas na grande maioria dos casos mencionados na literatura é realizada no modo estático. Neste modo, utilizado maioritariamente quando as matrizes são mais difíceis de penetrar (como no caso em estudo), o solvente selecionado é bombeado para encher a célula de extração que contém a amostra e que é mantida no forno a temperatura e pressão constantes durante um determinado tempo estático definido pelo utilizador. Depois, o solvente que contém os analitos extraídos é recolhido num frasco, é realizada a lavagem com um pequeno volume de solvente num fluxo

predefinido, seguindo-se a purga da célula com azoto para garantir a remoção completa do solvente do sistema de ASE. Estes passos constituem um ciclo e podem ser repetidos várias vezes, se necessário [61, 64, 66]. A figura 9 apresenta um esboço de um ciclo completo num sistema de ASE no modo estático.

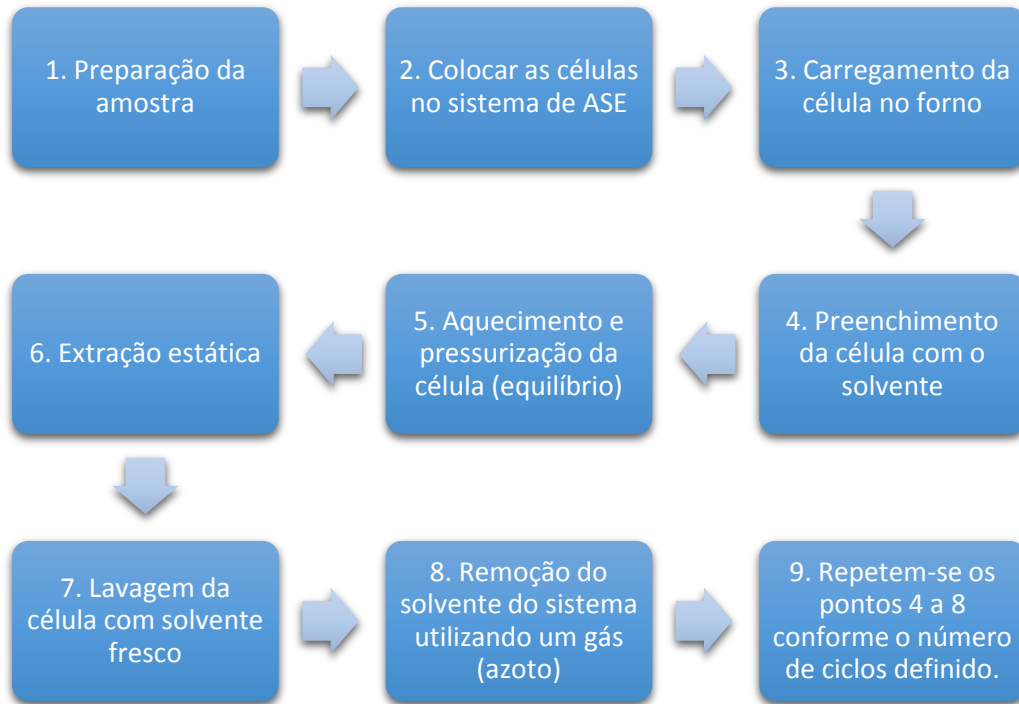


Figura 9. Esboço do processo que ocorre num sistema de ASE. (Adaptado da referência 61)

No modo dinâmico, o solvente que pode estar à temperatura ambiente ou ser pré-aquecido para a temperatura desejada, é bombeado continuamente através da célula de extração num fluxo constante (tipicamente 0,33-2,5 mL/min) por um período de tempo específico. Segundo a literatura, o contacto contínuo entre a amostra e o solvente fresco deve acelerar a transferência de massa e, conseqüentemente, melhorar a eficiência da extração e reduzir o tempo desta, embora na prática os resultados apresentados não suportem esta teoria [58, 64-66]. Na figura 10 apresenta-se um esquema simplificado do sistema de ASE.

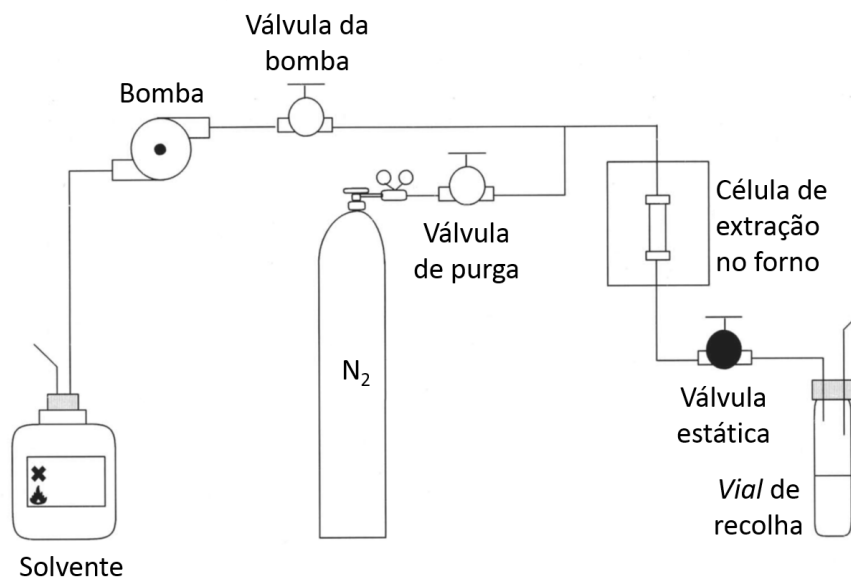


Figura 10. Esquema do sistema de ASE. (Adaptado da referência 63)

Na tabela 4 encontram-se compiladas as vantagens e desvantagens da utilização da ASE no equipamento automatizado disponível para este estudo – ASE350 da Dionex. Verifica-se que estão associadas a esta técnica grandes vantagens sendo as mais relevantes a redução do tempo de extração, os baixos custos (associados à redução do solvente utilizado) e a automatização do processo.

Tabela 4. Compilação das vantagens e desvantagens associadas à utilização do ASE350. (Adaptado da referência 61)

| Vantagens | Desvantagens |
|--|--|
| Baixo uso de solvente | Equipamento de custo elevado |
| Curto tempo de extração | A preparação das células é demorada |
| Sistema de fácil manuseamento | Geralmente a extração não é seletiva |
| Podem ser usadas misturas de solventes | É necessária uma limpeza após o fim da análise |
| Os solventes só precisam de ser desgaseificados se o analito for facilmente oxidado | O procedimento de lavagem das células é demorado levando a um aumento do consumo de solventes |
| Apenas os ácidos e bases fortes não podem ser utilizados como solvente extrator (ou solventes com pontos de ignição inferiores a 200 °C) | Os extratos produzidos nas mesmas condições podem ter volumes diferentes provavelmente devido a perturbações na válvula estática |
| A alta pressão permite remover os analitos termicamente instáveis | |
| O sistema é completamente automatizado (alta reprodutibilidade) | |
| Preparação das amostras simples e rápida | |

2.3.2.2 Parâmetros que Influenciam a Eficiência da Extração

Quando se desenvolve uma técnica analítica pretende-se que esta seja rápida e simples, que permita uma recuperação quantitativa dos analitos alvo sem perda ou degradação, que ofereça extrações totalmente automatizadas e que origine poucos desperdícios, o que só é possível após uma otimização cuidada de todos os parâmetros que influenciam a eficiência da mesma [59].

Além da eficiência da extração depender da natureza da matriz da amostra, do analito a ser extraído e da localização do analito dentro da matriz, esta depende de muitos outros parâmetros essencialmente relacionados com a técnica utilizada. Os parâmetros que mais influenciam a extração e que podem ser otimizados no sentido de obter recuperações elevadas são o solvente extrator, a temperatura, a pressão, o tempo estático e o número de ciclos. Alguns parâmetros como o tempo de purga e o volume de lavagem são fixos de acordo com a literatura porque têm que ser altos o suficiente para garantir a recuperação de todos os compostos extraídos [65].

Pouco mais há a esclarecer sobre a função da temperatura e da pressão na extração por ASE. Resta apenas referir que são frequentemente utilizadas temperaturas entre 50-130 °C e a pressão costuma estar definida em 1500 psi. Quanto aos outros parâmetros, o mais importante é talvez o tipo e composição do solvente, que tem de ser escolhido garantindo que a polaridade deste é similar à dos analitos de interesse. As misturas de solventes polares e apolares originam recuperações elevadas, mas os mais comuns na extração de fármacos são os solventes orgânicos polares como o metanol e o acetonitrilo. É também necessário otimizar o tempo de extração que deve ser suficientemente longo para garantir o contacto entre os analitos e o solvente, sendo comum utilizar ciclos de 3 a 15 min. O número de ciclos deverá também ser estudado e costuma variar entre 3 a 4, correspondendo, como já foi explicado, ao número de vezes que a célula é enchida com solvente fresco ficando este em contacto com a amostra. A exposição prolongada aos solventes permite que a matriz inche aumentando a penetração do solvente nos interstícios da amostra e o contacto entre o solvente e o analito [59, 65].

2.4 Métodos de *Clean-up*

2.4.1 Importância do *Clean-up*

A maioria das técnicas sólido-líquido utilizadas na extração de compostos orgânicos em lamas de ETARs não são seletivas e, por isso, é frequentemente necessário utilizar um passo de *clean-up*. Uma vez que um dos problemas que afeta a detecção é a presença de interferentes que podem causar supressão dos picos e limites de detecção pobres, é necessário e muito comum utilizar técnicas de purificação avançadas como a SPE para enfrentar o desafio de analisar fármacos em matrizes sólidas ambientais. Por um lado irá eliminar os componentes da matriz que têm uma grande probabilidade de ficarem retidos e concentrados juntamente com os compostos alvo interferindo na detecção e na sensibilidade, e por outro lado irá prolongar a vida do equipamento cromatográfico já que as amostras a injetar estarão mais “limpas” [67].

Existem vários tratamentos de *clean-up* (eliminação de enxofre, extração de permeação em gel (GPC), entre outros), alguns mais diretamente ligados à ASE, como o *in-cell clean-up* que consiste em adicionar um adsorvente (florisil, alumina ou sílica) ao conteúdo da célula de extração que retenha as substâncias interferentes, mas o mais comum e que apresenta melhores resultados continua a ser a extração em fase sólida (SPE) [33, 56, 68].

2.4.2 Extração em Fase Sólida (SPE)

2.4.2.1 Fundamentos e Aplicações

A preparação de amostras é crucial no desenrolar de todo um processo analítico e tem como objetivo remover potenciais interferentes, pré-concentrar os analitos e converter, se necessário, o analito numa forma mais adequada para a detecção ou separação. A SPE, inventada em 1970 como alternativa ao método de extração líquido-líquido, demonstrou ser capaz de cumprir estes objetivos e desempenha hoje um papel importante na preparação de amostras em análises ambientais, bem como nos mais variados domínios da investigação [69, 70].

Esta técnica de preparação de amostras utiliza partículas sólidas e material de empacotamento cromatográfico, normalmente contido num cartucho, para separar

quimicamente os diferentes componentes da amostra [71]. Os cartuchos típicos de SPE consistem em colunas pequenas (geralmente um corpo de seringa aberto) que contêm um adsorvente, com um determinado tamanho de partícula compactado entre dois discos porosos de plástico ou de metal, no qual tanto podem ficar retidos os analitos como as substâncias interferentes, dependendo das propriedades físico-químicas de ambos [68, 72]. As etapas que constituem um método de SPE estão apresentadas no esquema da figura 11. No entanto, nem todos os métodos desenvolvidos utilizam todos os passos apresentados pois alguns deles são dispensáveis em determinados casos mediante o tipo de amostra, de analito e das características do cartucho [71]. O âmbito de aplicação do SPE é considerável, já que há várias combinações possíveis entre adsorventes/eluentes/matriz, mas o funcionamento base (exemplificado na figura 12) é sempre o mesmo: a amostra é bombeada através do cartucho e os analitos são depois eluídos com um pequeno volume de solvente orgânico [73].

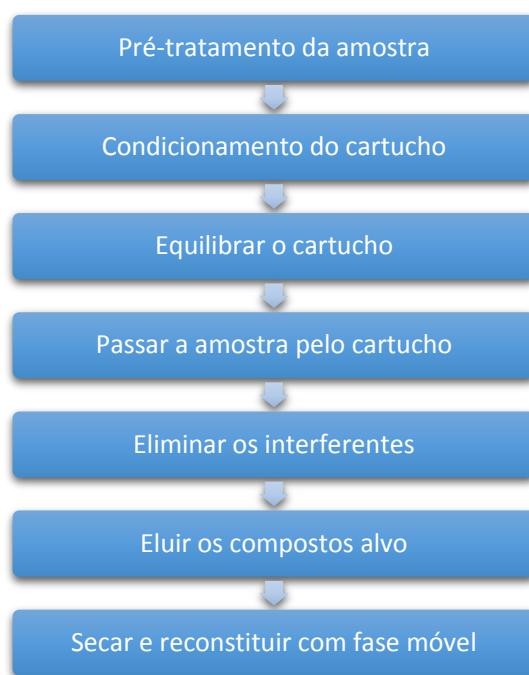


Figura 11. Esquema representativo das etapas mais comuns que constituem um método de SPE. (Adaptado da referência 71)

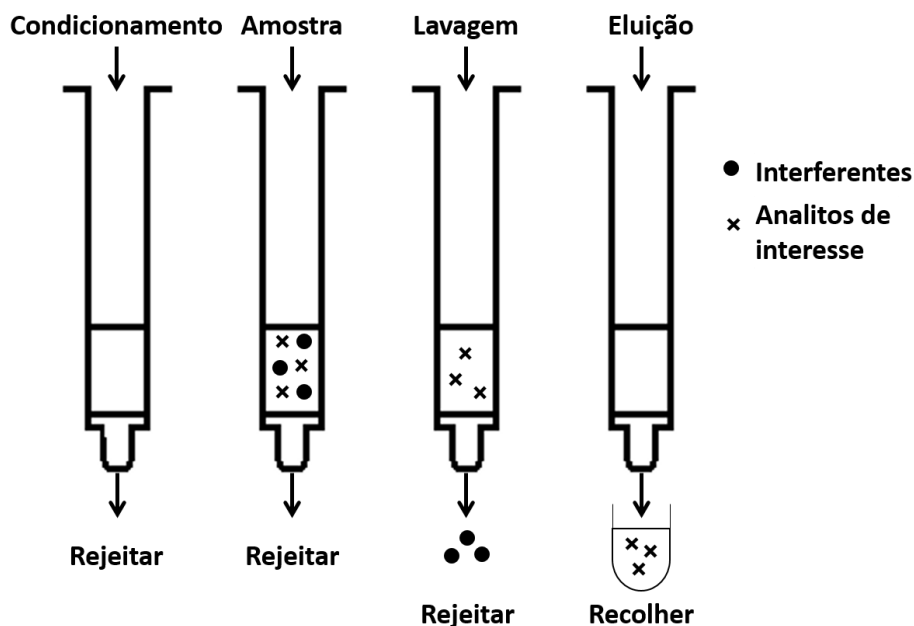


Figura 12. Etapas genéricas que constituem um método de SPE. (Adaptado da referência 71).

Entre as inúmeras vantagens que esta técnica apresenta existem quatro que são realmente as mais importantes: permite a eliminação das interferências transformando uma matriz complexa numa outra muito mais pura, reduz a supressão iônica/melhora as aplicações no espectrómetro de massa, tem a capacidade de fracionar a matriz da amostra para analisar compostos por classe e permite aumentar o sinal de compostos com níveis de concentrações vestigiais muito baixos [71]. Outras vantagens que a SPE apresenta fazem com que esta seja muitas vezes utilizada como *clean-up*: é um método rápido, simples, que requer pouco volume de solvente orgânico, pode ser automatizado, não forma emulsões durante a extração, é seletivo, é eficiente, apresenta um baixo risco de contaminação, garante baixos custos inerentes e pode ser usado combinado com diferentes técnicas de detecção (*on-line* onde não existe manipulação da amostra entre a pré-concentração e a análise, diminuindo os riscos de perdas e contaminações e aumentando a reprodutibilidade, ou *off-line*) [67, 70, 72, 74].

Uma das principais aplicações da SPE é na extração de fármacos e os seus metabolitos de fluidos corporais. A segunda maior aplicação tem sido em amostras ambientais, como águas de rios e águas residuais, onde grandes volumes de amostras diluídas têm que ser extraídos [73]. Além do *clean-up* da amostra, esta técnica é também muito utilizada para pré-concentrar FQs em matrizes complexas como as lamas produzidas nas ETARs [39, 70, 75].

2.4.2.2 Adsorventes

É importante selecionar o adsorvente mais apropriado durante o desenvolvimento do método analítico tendo em conta a polaridade, a acidez, a basicidade e a hidrofobicidade dos adsorventes, dos analitos e dos solventes utilizados no processo de extração pois estas propriedades físico-químicas afetam as interações e a eficiência da extração [70].

Pode-se dividir a SPE em 3 tipos: fase reversa, fase normal e modo misto. Na grande maioria das vezes, e essencialmente em extratos de lamas de ETARs, são utilizados adsorventes de fase reversa, nos quais o mecanismo de retenção é a interação dos grupos apolares dos analitos de interesse com os grupos funcionais apolares do adsorvente, via forças de Van der Waals, através de um mecanismo facilitado na presença de solventes muito polares [56, 67]. Os adsorventes de fase normal são polares e permitem extrair da amostra analitos com polaridade baixa, alta ou neutra. Já os de modo misto, que pertencem aos adsorventes de troca iónica, permitem a extração de analitos ionizáveis ou com grupos funcionais polares [71]. Os materiais mais tipicamente utilizados no SPE são C₈, C₁₈, equilíbrio hidrofílico-lipofílico (HLB), modo-misto/troca catiónica (MCX), modo-misto/troca aniónica (MAX) e troca aniónica fraca (WAX). Contudo, na maioria das vezes verificou-se que os cartuchos HLB são os mais requisitados quando se trata de amostras ambientais [69]. Alguns exemplos de cartuchos utilizados estão apresentados na figura 13 conforme o tipo de separação que realizam.

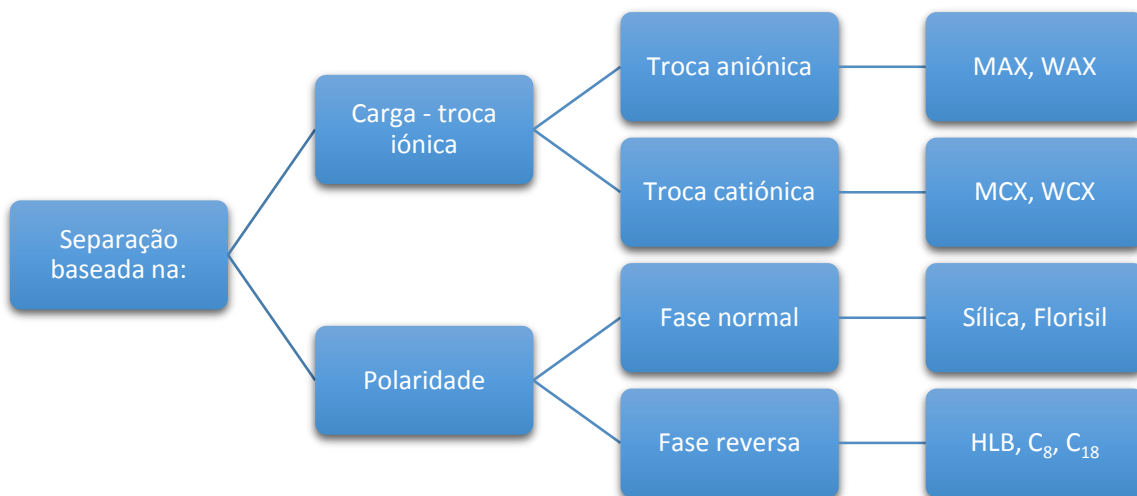


Figura 13. Vários tipos de cartuchos mais utilizados em SPE. (Adaptado da referência 71)

2.4.2.3 Parâmetros que Influenciam a Eficiência da Extração

Para além da escolha do adsorvente mais adequado ao processo de *clean-up* é também aconselhada a otimização de outros parâmetros que influenciam a eficiência da extração como o volume de rotura (que depende dos parâmetros cinéticos do adsorvente e dos parâmetros de retenção), bem como a taxa de fluxo da amostra, o volume de lavagem, o volume de solvente de eluição (que depende das propriedades do enchimento do cartucho), o volume retido e o fator de retenção [70].

2.5 Análise Cromatográfica

2.5.1 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência Acoplada à Espectrometria de Massa Tandem (UPLC-MS/MS)

A cromatografia líquida (LC) tornou-se na ferramenta mais eficiente para a identificação e quantificação de fármacos em amostras ambientais devido às características químicas destes compostos que melhor se adequam aos princípios de funcionamento desta técnica [39]. Tem inúmeras vantagens tais como: alta sensibilidade, determinações quantitativas precisas, fácil automatização, a sua adequação para a separação de espécies não voláteis ou termicamente frágeis e, acima de tudo, a sua enorme aplicabilidade em substâncias que são importantes para a indústria, para vários campos científicos e para o público [76]. Ao longo dos últimos anos a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (HPLC-MS/MS) tem sido muito utilizada na análise de antibióticos em níveis de concentração muito baixos. Recentemente, uma nova tecnologia de HPLC designada por UPLC (cromatografia líquida de ultra eficiência) tem vindo a ser desenvolvida oferecendo reduções adicionais no tempo de cada corrida e um aumento da sensibilidade quando comparado com a LC convencional [5, 46]. Uma vez que a eficiência e velocidade das análises tem-se tornado de grande importância em muitas aplicações da LC, especialmente nos campos de análise farmacêutica, toxicológica e clínica, onde é importante aumentar o rendimento e reduzir os custos das análises, a UPLC pode desempenhar um papel importante no futuro da LC [77].

2.5.1.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e de Ultra Eficiência (UPLC)

Os métodos cromatográficos consistem fundamentalmente na separação eficiente de compostos quimicamente similares baseada nas interações do soluto com a fase móvel e a fase estacionária como demonstra a figura 14 [78].

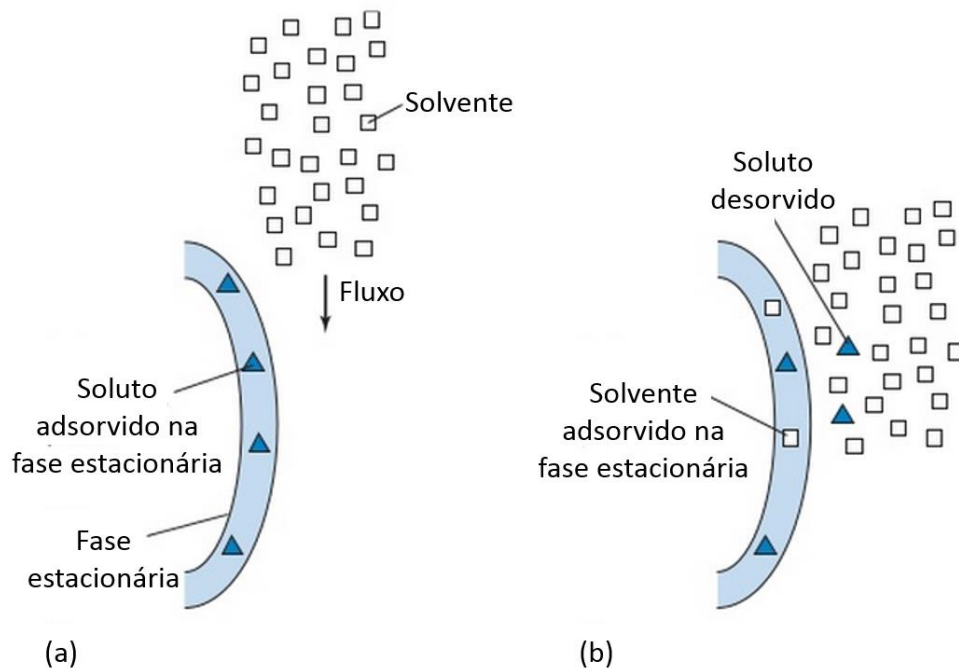


Figura 14. Esquematisação da competição entre as moléculas do solvente e do soluto por locais de ligação na fase estacionária. (Adaptado da referência 78)

Um sistema de LC é constituído essencialmente por um conjunto de solventes, uma bomba, uma válvula para injetar a amostra através de uma seringa, uma coluna onde ocorre a separação dos compostos e um detetor que envia uma resposta para um sistema de recolha de dados que a vai analisar e processar [79]. Grande parte destes sistemas englobam ainda um forno utilizado para controlar a temperatura da coluna [78]. O processo de extração ocorre quando a amostra começa a passar na coluna e melhora à medida que a amostra avança pela mesma enquanto a fase móvel passa constantemente pela coluna num fluxo definido [80]. A figura 15 apresenta um esquema generalizado de um equipamento de HPLC.

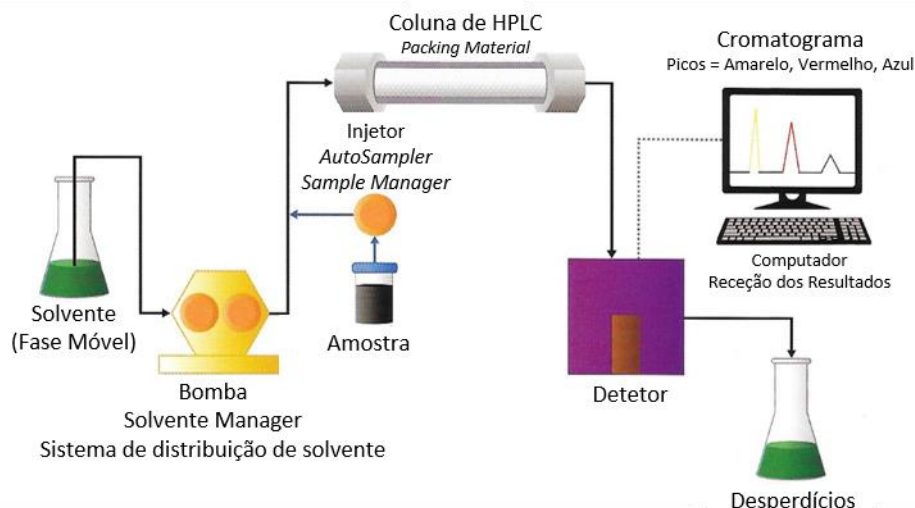


Figura 15. Representação de um esquema de HPLC. (Adaptado da referência 81)

A UPLC tem o mesmo mecanismo de separação que a HPLC, bem como os mesmos princípios cromatográficos, no entanto, a velocidade, a sensibilidade, a eficiência de separação e a resolução são mais elevadas tornando-a numa versão mais avançada da HPLC. Tem também um menor tempo de análise e por isso reduz o consumo de solventes tornando-a uma técnica mais económica [46, 77]. A diferença efetiva entre estas duas técnicas cromatográficas é o tamanho das partículas da fase estacionária, sendo que na HPLC variam entre 3 e 5 μm e na UPLC são inferiores a 2 μm levando ao aumento da eficiência do processo cromatográfico [77, 82]. Este facto é suportado pela equação de van Deemter (equação 1), uma fórmula empírica que está na base dos princípios da cromatografia e que relaciona a velocidade linear da fase móvel com a altura equivalente do prato teórico [83]. Nesta equação H é a altura equivalente do prato teórico, v representa a velocidade linear da fase móvel, A é um termo independente da velocidade e representa a difusão turbilhonar, B diz respeito à difusão molecular e C refere-se à resistência à transferência de massa [82].

$$H = A + \frac{B}{v} + Cv$$

Equação 1

O gráfico de van Deemter da figura 16, que compara três diferentes tamanhos de partícula (10, 5 e 3 μm) mostra que as partículas mais pequenas reduzem a altura do prato teórico o que resulta num aumento da eficiência da coluna de empacotamento e demonstra ainda que a taxa de fluxo poderá ser elevada sem afetar significativamente a eficiência [77].

As partículas menores permitem também obter uma melhor resolução porque oferecem um fluxo mais uniforme ao longo da coluna (diminuição de A na equação de van Deemter) e uma redução na distância que o soluto tem para se difundir (diminuição de C na equação de van Deemter) [78].

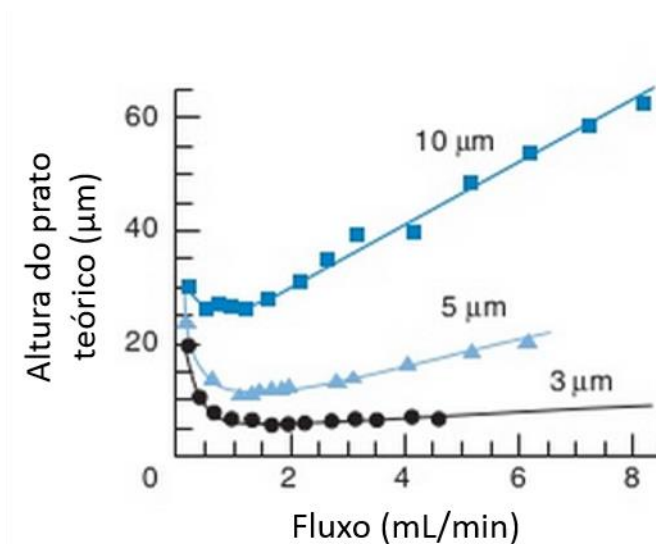


Figura 16. Representação gráfica da altura do prato teórico (μm) em função do fluxo (mL/min) para fases estacionárias com um diâmetro de partícula de 10, 5 e 3 μm . (Adaptado da referência 78)

Uma outra diferença que estas duas técnicas apresentam é a pressão, que ronda os 35-40 MPa na HPLC e na UPLC pode atingir valores superiores a 103,5 MPa. Este fator está diretamente ligado com o tamanho das partículas da coluna, pois ao utilizar-se partículas de pequeno diâmetro a pressão necessária para obrigar a fase móvel a atravessar a coluna aumenta com o quadrado do diâmetro da partícula [77, 84]. Esta representa uma das poucas desvantagens da UPLC, pois a utilização das pressões elevadas requer uma maior manutenção, reduz o tempo de vida das colunas e as partículas com tamanhos inferiores a 2 μm geralmente não são regeneráveis e têm, portanto, um uso limitado [82]. Contudo, verifica-se que a UPLC apresenta uma vasta lista de vantagens em relação à HPLC: redução de cerca de 87% no tempo de cada corrida; redução de cerca de 83% no consumo de solventes; redução de cerca de 93% no consumo de amostra devido ao volume de injeção reduzido; aumento da sensibilidade; aumento do âmbito de aplicação de métodos de multi-resíduos; análises mais rápidas devido ao uso de material de separação de pequenas partículas; redução do custo de cada análise; resolução dos picos melhor ou semelhante ao HPLC; linha de base mais plana; programa de gradiente de fase móvel mais simples; elevada precisão nos tempos de retenção; redução do tempo necessário para o tratamento dos resultados [77, 82, 84].

2.5.1.2 Detecção por Espectrometria de Massa (MS)

O espectrómetro de massa (MS) é constituído por uma fonte de ionização, um analisador e um detetor como é apresentado no esquema da figura 17. É introduzida no sistema uma quantidade muito pequena de amostra que passa para a câmara de ionização onde os componentes são convertidos em iões gasosos. Os fragmentos gerados seguem para o analisador onde serão submetidos a um forte campo magnético que irá obrigar os iões a adotarem uma trajetória curva (deflexão magnética). Os iões de menor massa são mais defletidos do que os iões de massa maior e essa informação será recolhida pelo detetor [85]. No caso estudado foi utilizada a ionização por ESI, uma técnica de ionização realizada à pressão atmosférica, na qual o composto em solução chega à fonte de ionização através de um capilar, onde é aplicada uma voltagem fazendo com que a solução saia do capilar sob a forma de gotículas carregadas que são evaporadas com a ajuda de um gás nebulizador como demonstrado nas figuras 18 e 19 [86]. A ESI é capaz de produzir vários iões carregados a partir de grandes moléculas, permite obter uma elevada sensibilidade e é fácil de acoplar com HPLC e UPLC. A corrente de ESI é limitada pelo processo eletroquímico que ocorre na ponta do capilar e é sensível à concentração e não à quantidade total de amostra injetada marcando desta forma a diferença em relação às outras fontes de ionização existentes [87].

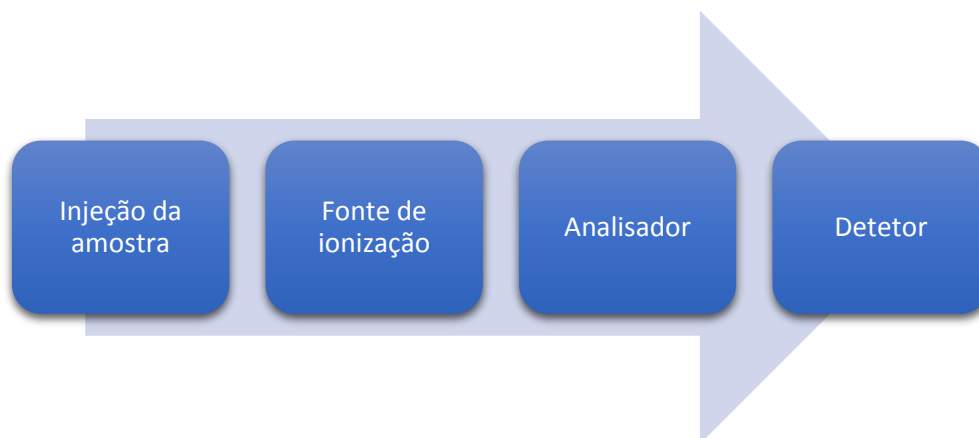


Figura 17. Principais componentes de um espectrómetro de massa. (Adaptado da referência 85)

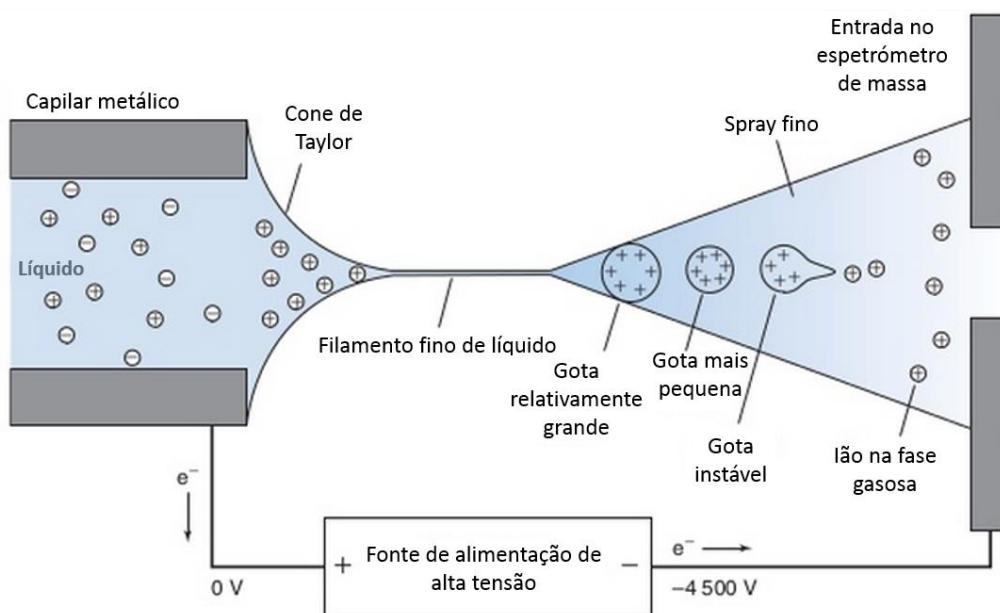


Figura 18. Esquema representativo da formação de íons gasosos por ESI. (Adaptado da referência 78)

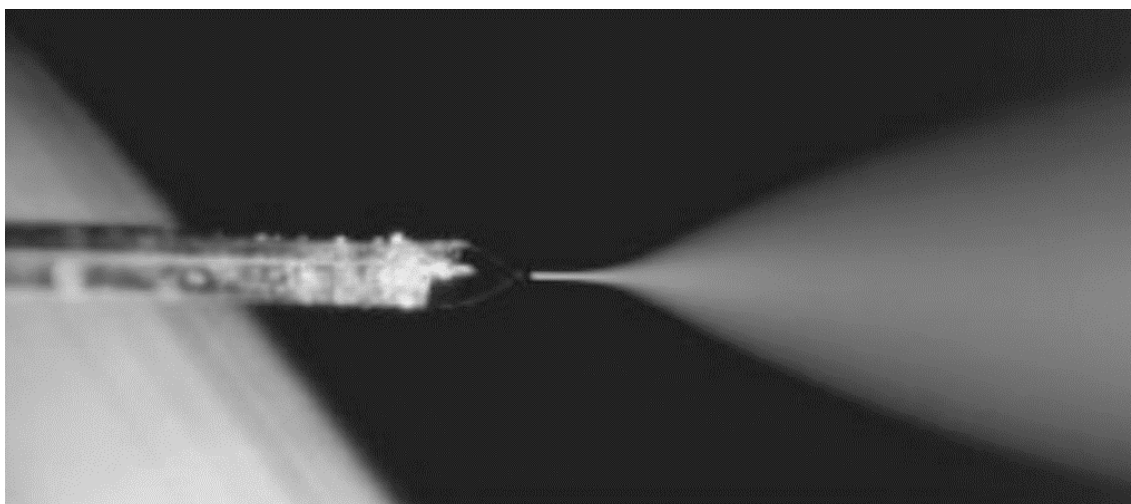


Figura 19. Eletrospray de um capilar. (Retirado da referência 78)

A figura 20 representa um analisador triplo-quadrupolo, um dos analisadores mais utilizados no acoplamento da espectrometria de massa com a cromatografia. Este analisador é constituído por, como o nome indica, três quadrupolos que consistem, cada um deles, em quatro cilindros (polos) paralelos distribuídos de uma forma simétrica. Os cilindros opostos têm a mesma polaridade e os adjacentes têm polaridades opostas. O funcionamento do triplo quadrupolo consiste na entrada de uma mistura de iões no quadrupolo Q1, onde os iões são separados segundo a razão massa/carga (m/z) e onde é seleccionado apenas um ião precursor que passa para o quadrupolo seguinte (Q2) designado por célula de colisão. Aqui, o ião precursor colide com o gás e divide-se em fragmentos designados por iões filho. Do Q2 passam todos os iões de todas as massas diretamente para o Q3 que por sua vez permite que apenas determinados iões filho cheguem ao detetor [78].

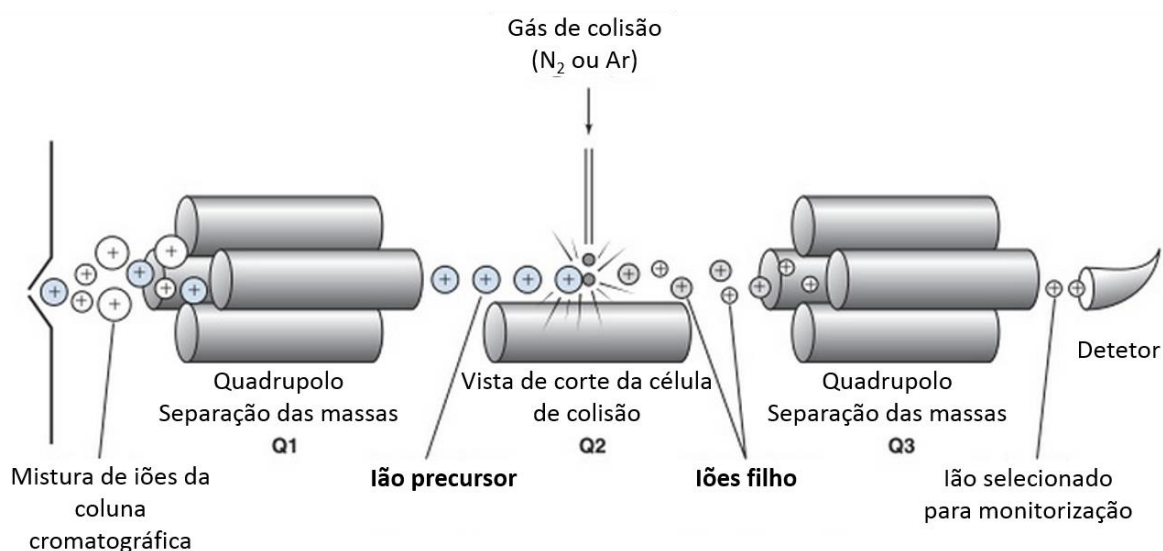


Figura 20. Esquematisação de um analisador triplo quadrupolo. (Adaptado da referência 78)

São vários os objetivos que se podem atingir com o acoplamento da MS com a cromatografia: não haver alteração na resolução cromatográfica, obter uma sensibilidade o mais elevada possível, ser um método universal e conseguir detetar todos os produtos eluídos, fornecer o máximo de informação estrutural possível, ser seletivo, fornecer um sinal proporcional à concentração, ter um fator de resposta constante ou pelo menos previsível, ter uma relação custo/desempenho o mais económica possível, não ser prejudicial para o produto, não produzir artefactos e permitir a decomposição dos picos não resolvidos nos seus constituintes [87].

CAPÍTULO 3.

Desenvolvimento do Método

3.1 Planeamento

Existem várias alternativas para realizar a extração de FQs em lamas de ETAR como já foi referido no capítulo anterior. Contudo, tornou-se bastante perceptível que o melhor caminho a seguir será a extração por ASE, seguida de *clean-up* por SPE e análise por cromatografia líquida (UPLC-MS/MS). O esquema da figura 21 representa resumidamente as várias etapas de métodos analíticos desenvolvidos, já reportados, para a determinação de fármacos e produtos de cuidado pessoal em lamas de depuração [65]. Os aspetos destacados a azul referem-se aos que foram utilizados, e devidamente otimizados, descritos no decorrer do presente trabalho.

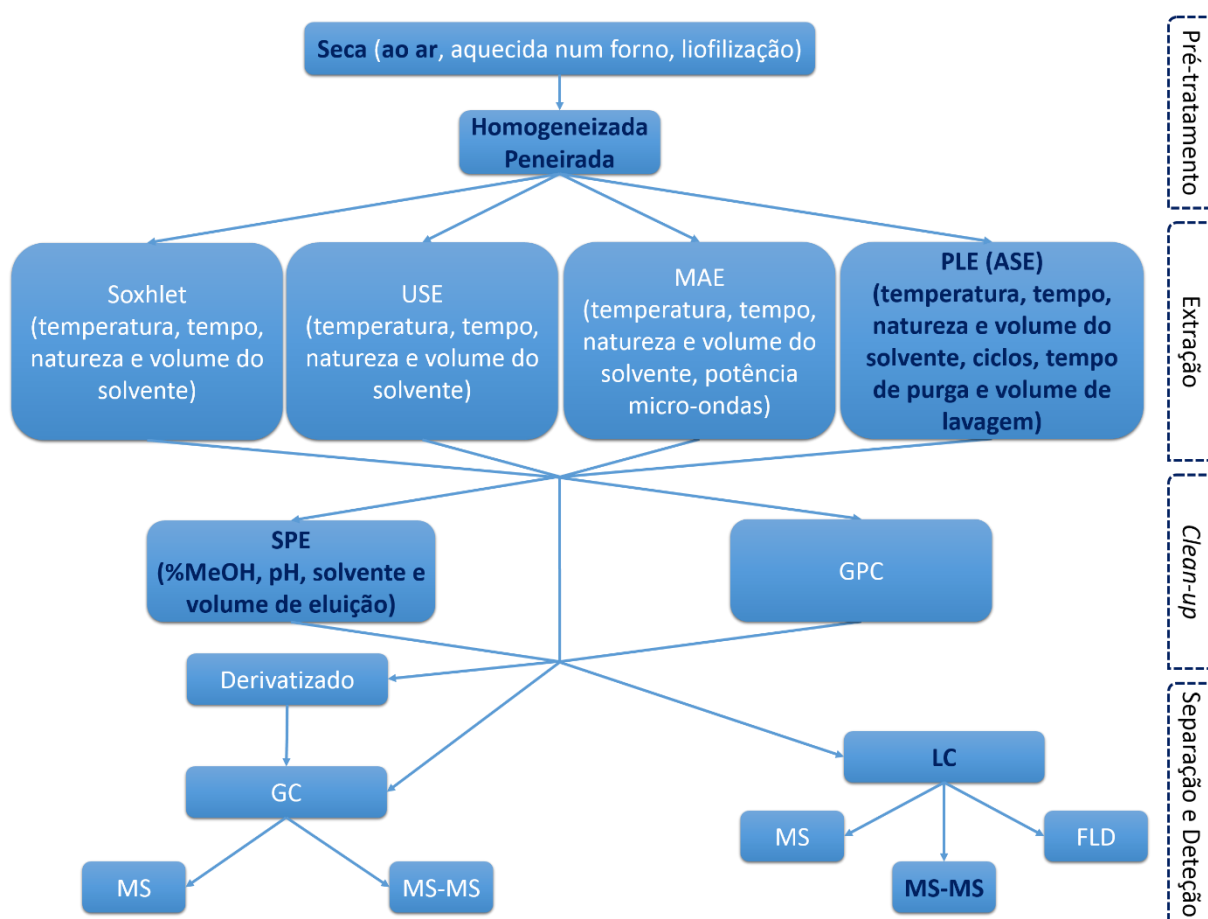


Figura 21. Diferentes etapas de métodos analíticos desenvolvidos para a determinação de PPCPs em lamas de ETARs, desde a preparação da amostra até à análise cromatográfica, e respetivos parâmetros otimizados. (Adaptado da referência 65)

3.2 Preparação da Amostra

As amostras de solo/lama utilizadas foram secas ao ar durante 2 ou 3 dias, trituradas num almofariz e tamisadas com uma peneira de 1 mm de maneira a que todas as partículas de maiores dimensões pudessem ser eliminadas. Todo o processo de otimização do método foi realizado com amostras de solo não contaminadas.

3.3 Otimização do UPLC

Para iniciar a otimização das transições no UPLC utilizou-se como ponto de partida um método já definido no equipamento cujas condições estão apresentadas na tabela 5. Não foi realizada a otimização das condições abaixo descritas uma vez que o método desenvolvido já havia sido devidamente otimizado e encontrava-se preparado para o tipo de análise pretendida. Contudo, foi realizada uma verificação das condições apresentadas para comprovar a operacionalidade do equipamento. Posto isto, foi realizada a otimização das massas das FQs de interesse para este estudo.

Tabela 5. Condições iniciais definidas no UPLC-MS/MS.

| | | | | |
|-------------------|--|-----|----|----------------|
| Fase Móvel A | MeOH | | | |
| Fase Móvel B | HCOOH 10 mM | | | |
| Coluna | C ₁₈ ; 1,7 µm; 2,1x50 mm (Acquity UPLC BEH) | | | |
| Gradiente | Tempo (min.) | %A | %B | Fluxo (mL/min) |
| | 0 | 25 | 75 | |
| | 8 | 50 | 50 | |
| | 9 | 100 | 0 | |
| | 11 | 50 | 50 | |
| | 13 | 25 | 75 | |
| Loop | 10 µL | | | |
| Volume de injeção | 40 µL | | | |

3.3.1 Otimização das Transições

Para a otimização das transições no UPLC prepararam-se soluções individualizadas em metanol de 1 mg/L de cada FQ em estudo e injetaram-se diretamente em triplicado no detetor. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na tabela 6.

Tabela 6. Apresentação dos resultados obtidos na otimização das massas para as FQs em estudo no UPLC.

| FQs | M (g/mol) | ESI | Ião Precursor (m/z) | MRM1 | MRM2 | Energia de Cone (V) | Energia de Colisão (eV) | |
|-----|--------------|-----|------------------------|--------|--------|------------------------|----------------------------|----|
| | | | | | | | 1 | 2 |
| ENR | 359,39 | + | 360,20 | 245,21 | 84,07 | 36 | 26 | 32 |
| NOR | 319,33 | + | 320,17 | 233,24 | 231,22 | 38 | 26 | 38 |
| CIP | 331,34 | + | 332,17 | 231,20 | 245,26 | 36 | 36 | 22 |
| DIF | 399,39 | + | 400,24 | 299,29 | 58,00 | 38 | 30 | 34 |
| SAR | 385,36 | + | 386,22 | 299,25 | 348,32 | 38 | 26 | 32 |

3.3.2 Calibração Direta

Para determinar a resolução do equipamento e definir a gama de trabalho recorreu-se a uma calibração direta. Tomou-se como ponto de partida um método já definido no laboratório e, após alguns testes foi possível definir a gama de trabalho em 6 padrões: 12,5; 25,0; 50,0; 100; 150 e 250 µg/kg. Para a calibração direta, estas concentrações foram ajustadas de maneira a ser possível obtê-las em solução. Desta forma, os padrões foram preparados em HCOOH 10 mM com uma concentração aproximada das FQs de interesse à concentração destas nos padrões submetidos ao processo de extração. Cada padrão foi injetado em triplicado e as curvas de calibração, apresentadas no anexo A.1.1, foram traçadas com a média das áreas obtidas. Os cromatogramas correspondentes (apresenta-se apenas um para cada padrão) encontram-se no anexo A.1.2 e demonstram a qualidade dos picos obtidos para todos os compostos ao longo de toda a gama de trabalho. Na tabela 7 apresentam-se os valores de declive e ordenada na origem das retas e ainda os coeficientes de correlação (R^2) a partir dos quais se verificou que para todas as FQs se obteve uma boa linearidade com R^2 iguais ou muito próximos a 0,999.

Tabela 7. Parâmetros da equação da reta e coeficientes de correlação obtidos a partir das curvas da calibração direta realizada para cada FQ.

| FQs | Declive | Ordenada na origem | R ² |
|-----|---------|--------------------|----------------|
| ENR | 63,02 | 57,22 | 0,9983 |
| NOR | 41,96 | 159,8 | 0,9987 |
| CIP | 36,48 | 215,7 | 0,9982 |
| DIF | 49,88 | 59,85 | 0,9999 |
| SAR | 47,77 | 97,06 | 0,9997 |

3.4 Otimização ASE

Para iniciar a otimização do processo de extração por ASE utilizou-se como ponto de partida um método já definido no equipamento cujas condições estão indicadas na tabela 8. Como já foi referido, existem vários parâmetros que influenciam significativamente a eficiência da extração. Dos parâmetros apresentados na tabela serão apenas otimizados o solvente de extração, a temperatura, o tempo estático e o número de ciclos uma vez que foi provado que a pressão, o volume de lavagem e o tempo de pré-aquecimento não demonstram uma influência significativa na eficiência da extração e serão, por isso, mantidos iguais aos valores apresentados na tabela durante todo o processo [1, 53]. Quanto ao tempo de purga este está definido no manual do equipamento e depende da capacidade da célula de extração.

Tabela 8. Condições definidas no ASE350 utilizadas como ponto de partida para o processo de extração deste estudo.

| Solvente Extrator | Pressão | Temp. | Tempo estático | Ciclos | Vol. Lavagem | Purga | Pré aquecimento |
|--|----------|-------|----------------|--------|--------------|-------|-----------------|
| H ₃ PO ₄ 50 mM/ACN (1:1) | 1500 psi | 65 °C | 5 min. | 2 | 60 % | 60 s | 2 min. |

Na otimização de todos os parâmetros da ASE começou-se por pesar cerca de 2 g de amostra de solo para um goblé e fortificou-se cada amostra com uma solução padrão da mistura de FQs em estudo de 2 mg/L. Na otimização do solvente as amostras foram fortificadas de maneira a obter-se uma concentração final de 50 µg/kg e nos restantes parâmetros otimizados de 500 µg/kg (estas concentrações são aproximadas, uma vez que nunca se pesam exatamente 2 g de amostra e, por isso, estas são sempre posteriormente ajustadas conforme a quantidade rigorosa de amostra que foi pesada). Depois de bem homogeneizada e seguindo as orientações do manual do ASE350 para a preparação das

células de extração, adicionou-se à amostra fortificada cerca de 0,5 g de um agente dispersante (terra de diatomáceas (TD)) e voltou-se a homogeneizar. O conteúdo do goblé foi transferido para as células de extração de 5 mL que contêm filtros de celulose de 27 mm, às quais se adiciona mais TD, se necessário, de maneira a que reste aproximadamente 0,5 cm de espaço vazio no topo das células como demonstra o esquema da figura 22. De seguida, a célula de extração é colocada no ASE e inicia-se a extração com as condições definidas na tabela 8, que vão sendo atualizadas à medida que os diferentes parâmetros são otimizados. Aos extratos obtidos, realizou-se um *clean-up* (que neste caso consistiu apenas na troca de solvente e eliminação do particulado em suspensão). Para isso retirou-se 1 mL de cada extrato para um tubo de ensaio levado de seguida a evaporar, não até à secura, sob um fluxo de azoto, sendo de extrema importância manter este fluxo reduzido para não haver perda dos analitos. Posteriormente, reconstituiu-se o extrato com 2 mL de HCOOH 10 mM (fase móvel do UPLC) e levou-se a centrifugar a 4000 rpm durante 10 min. Por fim, filtrou-se o sobrenadante com um filtro de seringa de 0,22 µm e o filtrado foi transferido para *vials* do UPLC para posterior análise.

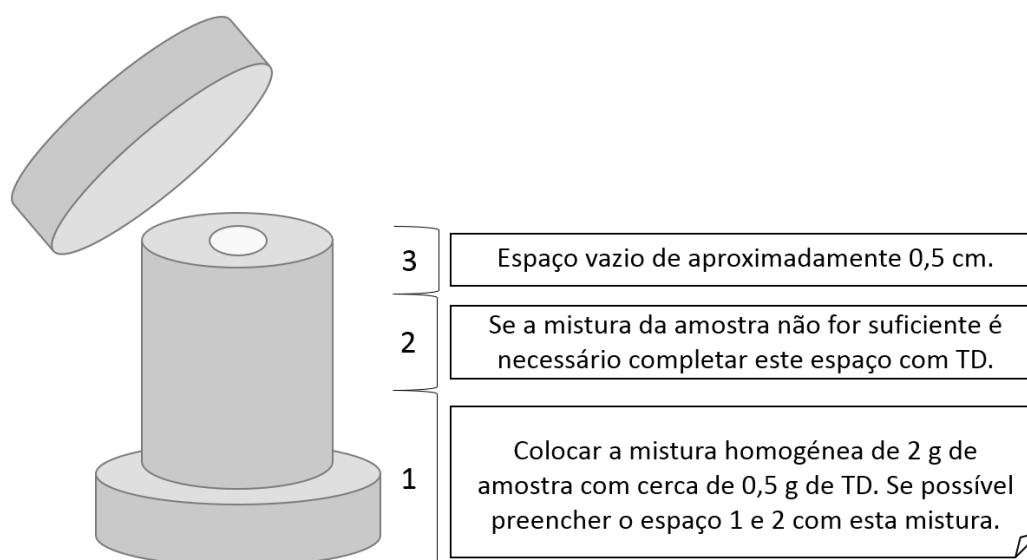


Figura 22. Esquema de uma célula de extração de ASE e respetivo procedimento relativamente ao enchimento da mesma.

3.4.1 Solvente Extrator

No que diz respeito à otimização do processo de extração começou-se por testar o solvente mais adequado para extrair as FQs de interesse das lamas/solos. Para isso, realizaram-se 5 extrações com 5 solventes diferentes em triplicado, especificados na tabela 9.

Tabela 9. Solventes utilizados na otimização do processo de extração por ASE.

| Solventes | |
|-----------|--|
| I | H ₃ PO ₄ 50 mM/ACN (1:1) |
| II | H ₃ PO ₄ 1 mM/MeOH (1:1) |
| III | MeOH/H ₂ O (1:2) |
| IV | MeOH |
| V | Acetato de Etilo |

A partir dos resultados obtidos foi possível determinar que o solvente mais adequado para a extração das FQs em estudo, nas condições definidas, seria o solvente I. Pode-se verificar que o gráfico da figura 23 (comparação direta entre os diferentes solventes) corrobora esta afirmação já que foi este o único solvente que permitiu obter um bom sinal para todas as FQs. Na tabela 10, referente apenas ao solvente definido como o melhor para a extração em questão, tendo em conta que as extrações foram realizadas em triplicado, são apresentados os valores de cada extração, da média das 3 extrações e o desvio padrão relativo (DPR) associado que demonstra a concordância entre os resultados. A tabela com os resultados para todos os solventes bem como os respetivos cromatogramas encontram-se no anexo A.2.1.

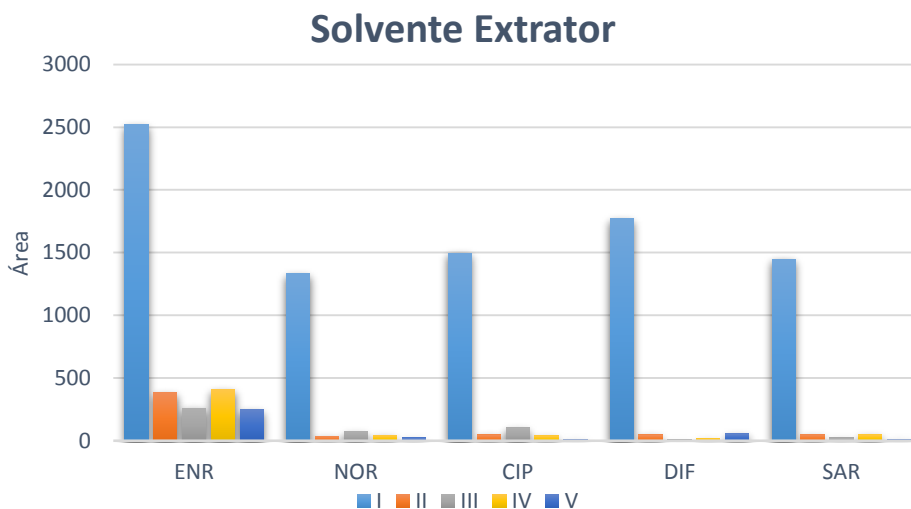


Figura 23. Comparação entre os diferentes solventes utilizados na otimização da ASE através da representação gráfica da média das áreas obtidas nas 3 extrações para cada composto pela análise por UPLC.

Tabela 10. Resultados obtidos no UPLC relativamente ao solvente definido como o mais apropriado para a extração de FQs no ASE. Apresentação das áreas obtidas em 3 extrações para cada composto, da média das áreas das 3 extrações e do respetivo desvio padrão relativo.

| Solvente I | | | | |
|------------|-------------|--------|--------|---------|
| FQ | Extração | Área | Média | DPR (%) |
| ENR | 1ª Extração | 2981,0 | 2522,2 | 16,1 |
| | Duplicado | 2210,9 | | |
| | Triplicado | 2374,8 | | |
| NOR | 1ª Extração | 1459,3 | 1328,8 | 9,9 |
| | Duplicado | 1197,5 | | |
| | Triplicado | 1329,6 | | |
| CIP | 1ª Extração | 1472,1 | 1496,6 | 5,2 |
| | Duplicado | 1583,9 | | |
| | Triplicado | 1434,0 | | |
| DIF | 1ª Extração | 1913,4 | 1770,4 | 8,5 |
| | Duplicado | 1783,3 | | |
| | Triplicado | 1614,5 | | |
| SAR | 1ª Extração | 1446,9 | 1446,6 | 4,0 |
| | Duplicado | 1388,1 | | |
| | Triplicado | 1504,6 | | |

3.4.2 Temperatura de Extração

Na continuação da otimização do processo de extração foram testadas diferentes temperaturas, variando entre 45 °C e 100 °C. De entre as temperaturas testadas, 45 °C, 65 °C, 85 °C e 100 °C, escolheu-se a de 65 °C por se obterem os melhores resultados e será esta a temperatura a definir no equipamento. Esta escolha está fundamentada através da leitura do gráfico da figura 24, onde é apresentada a média das áreas obtidas nas três extrações para cada temperatura de extração e para cada FQ em estudo. Verifica-se que apesar de no caso particular da DIF os 45 °C parecerem mais adequados, nas restantes quatro FQs isto não se observa, sendo que o sinal é superior quando a extração é realizada a 65 °C. No entanto, uma vez que a DIF mesmo a 65 °C apresenta áreas superiores à maioria das FQs em estudo concluiu-se que é, de uma maneira geral, mais vantajoso realizar a extração a 65 °C.

Na tabela 11, são apresentados os valores obtidos através da análise por UPLC para a temperatura escolhida, para cada extração, para a média das 3 extrações e o desvio padrão relativo (DPR) associado que demonstra ser satisfatório em todos os casos. No anexo A.2.2 encontram-se tabelados os resultados obtidos para todas as temperaturas e os respetivos cromatogramas.

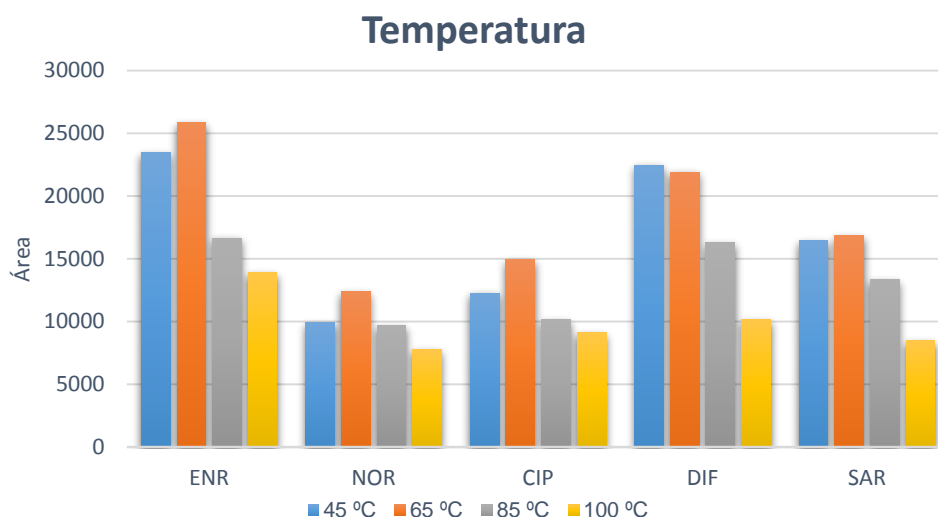


Figura 24. Comparação entre as diferentes temperaturas utilizadas na otimização da ASE através da representação gráfica da média das áreas obtidas nas 3 extrações para cada composto pela análise por UPLC.

Tabela 11. Resultados obtidos no UPLC relativamente à temperatura definida como a mais apropriada para a extração de FQs no ASE. Apresentação das áreas obtidas em 3 extrações para cada composto, da média das áreas das 3 extrações e do respetivo desvio padrão relativo.

| 65 °C | | | | |
|-------|-------------|---------|---------|---------|
| FQ | Extração | Área | Média | DPR (%) |
| ENR | 1ª Extração | 25493,8 | 25839,1 | 1,5 |
| | Duplicado | 26252,5 | | |
| | Triplicado | 25771,0 | | |
| NOR | 1ª Extração | 12224,7 | 12370,2 | 1,0 |
| | Duplicado | 12414,2 | | |
| | Triplicado | 12471,8 | | |
| CIP | 1ª Extração | 15227,0 | 14948,5 | 2,2 |
| | Duplicado | 14582,0 | | |
| | Triplicado | 15036,6 | | |
| DIF | 1ª Extração | 22318,1 | 21917,7 | 2,4 |
| | Duplicado | 22104,2 | | |
| | Triplicado | 21331,0 | | |
| SAR | 1ª Extração | 16637,4 | 16828,7 | 2,4 |
| | Duplicado | 17287,3 | | |
| | Triplicado | 16561,3 | | |

3.4.3 Número de Ciclos Estáticos

Variou-se ainda o número de ciclos de 2 a 9 no sentido de se perceber qual o mais eficaz na extração de FQs. Para uma melhor interpretação dos resultados é apresentada a figura 25, representação gráfica da média das áreas obtidas em 3 extrações, para cada FQ e para o diferente número de ciclos testados. Atendendo a esse mesmo gráfico verificou-se que com 6 ciclos obtém-se um maior sinal para todas as FQs com exceção da DIF que apresenta um sinal superior quando extraída com 5 ciclos embora seja, nos dois casos, um sinal bastante elevado. Assim, foram escolhidos 6 ciclos por ser o número de ciclos mais favorável pois permitiu a obtenção de melhores resultados na maioria dos compostos em estudo e manteve um sinal igualmente elevado para a DIF.

Na tabela 12 estão representadas as áreas obtidas pela análise por UPLC de cada extração, para cada FQ no número de ciclos escolhido como o mais vantajoso. Tendo em conta que as extrações foram realizadas em triplicado, são apresentados os valores de cada

extração, da média das 3 extrações e o desvio padrão relativo associado. A compilação dos restantes resultados obtidos encontra-se no anexo A.2.3 juntamente com os respetivos cromatogramas.

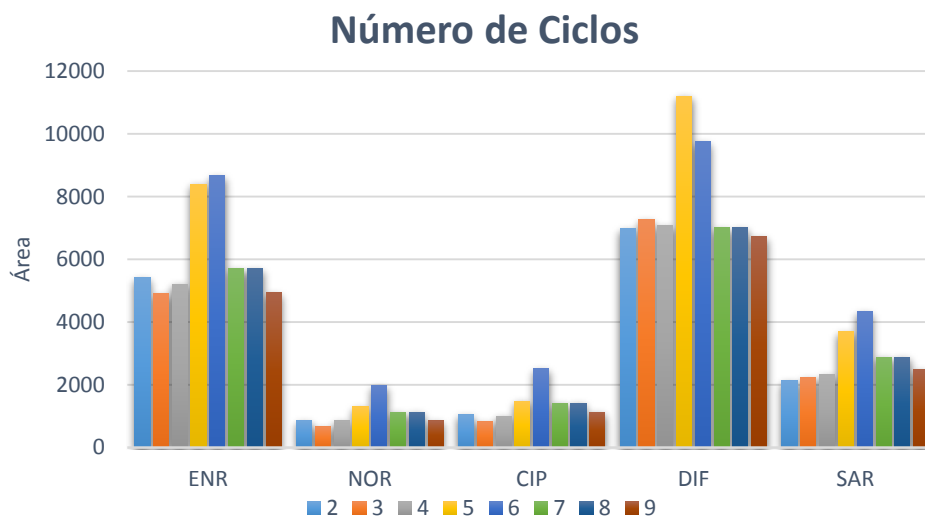


Figura 25. Comparação entre o diferente número de ciclos utilizados na otimização da ASE através da representação gráfica da média das áreas obtidas nas 3 extrações para cada composto pela análise por UPLC.

Tabela 12. Resultados obtidos no UPLC relativamente ao número de ciclos definido como o mais apropriado para a extração de FQs no ASE. Apresentação das áreas obtidas em 3 extrações para cada composto, da média das áreas das 3 extrações e do respetivo desvio padrão relativo.

| 6 Ciclos | | | | |
|----------|-------------|--------|--------|---------|
| FQ | Extração | Área | Média | DPR (%) |
| ENR | 1ª Extração | 8859,2 | 8663,1 | 2,2 |
| | Duplicado | 8647,1 | | |
| | Triplicado | 8482,9 | | |
| NOR | 1ª Extração | 2038,1 | 1979,3 | 5,9 |
| | Duplicado | 2055,0 | | |
| | Triplicado | 1843,9 | | |
| CIP | 1ª Extração | 2564,0 | 2514,6 | 2,5 |
| | Duplicado | 2534,8 | | |
| | Triplicado | 2444,9 | | |
| DIF | 1ª Extração | 9780,7 | 9755,1 | 1,2 |
| | Duplicado | 9853,0 | | |
| | Triplicado | 9631,5 | | |
| SAR | 1ª Extração | 4385,1 | 4330,7 | 3,8 |
| | Duplicado | 4459,5 | | |
| | Triplicado | 4147,5 | | |

3.4.4 Tempo Estático

Para terminar a otimização do processo de extração testou-se mais um parâmetro que afeta a eficiência da mesma, o tempo estático. Escolheram-se intervalos de tempo de 3, 5 e 8 min. para testar qual o que originava melhores resultados e pôde-se constatar que é possível obter melhores resultados se cada ciclo tiver a duração de 3 min., sendo perceptível uma tendência na diminuição do sinal à medida que o tempo estático aumenta. O gráfico da figura 26 possibilita a comparação da média das áreas obtidas em 3 extrações, nos 3 diferentes tempos testados, para cada FQ e comprova que o tempo escolhido deverá ser 3 min. Os resultados obtidos nesta análise e os respetivos cromatogramas encontram-se no anexo A.2.4. Na tabela 13 são apresentadas as áreas obtidas pela análise por UPLC de cada extração, a médias das 3 extrações e o desvio padrão relativo associado, para cada FQ, no tempo estático escolhido como o mais vantajoso.

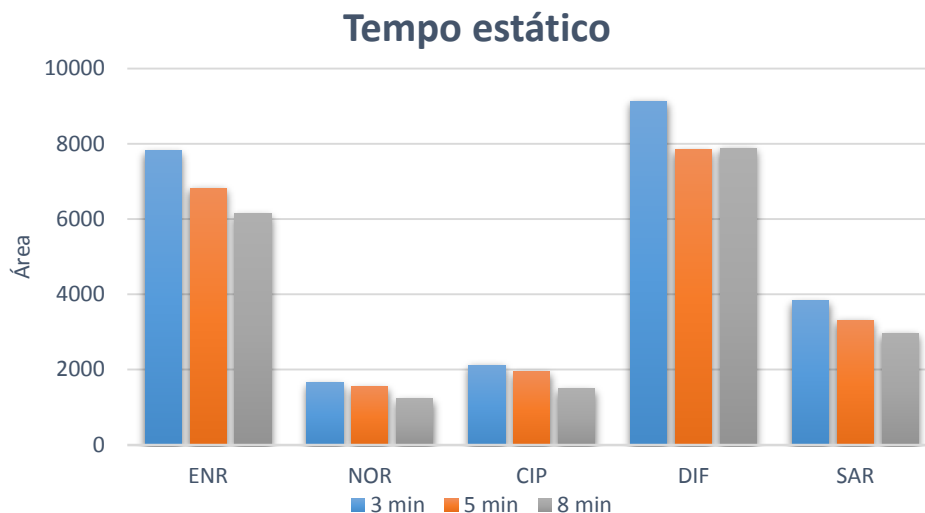


Figura 26. Comparação entre os diferentes valores de tempo estático utilizados na otimização da ASE através da representação gráfica da média das áreas obtidas nas 3 extrações para cada composto pela análise por UPLC.

Tabela 13. Resultados obtidos no UPLC relativamente ao tempo estático definido como o mais apropriado para a extração de FQs no ASE. Apresentação das áreas obtidas em 3 extrações para cada composto, da média das áreas das 3 extrações e do respetivo desvio padrão relativo.

| 3 min. | | | | |
|--------|-------------|--------|---------|---------|
| FQ | Extração | Área | Média | DPR (%) |
| ENR | 1ª Extração | 7939,6 | 7813,57 | 1,6 |
| | Duplicado | 7693,7 | | |
| | Triplicado | 7807,4 | | |
| NOR | 1ª Extração | 1687,9 | 1652,11 | 2,1 |
| | Duplicado | 1648,3 | | |
| | Triplicado | 1620,2 | | |
| CIP | 1ª Extração | 2135,7 | 2125,98 | 2,2 |
| | Duplicado | 2075,1 | | |
| | Triplicado | 2167,1 | | |
| DIF | 1ª Extração | 8995,4 | 9134,89 | 1,4 |
| | Duplicado | 9164,1 | | |
| | Triplicado | 9245,2 | | |
| SAR | 1ª Extração | 3789,4 | 3820,81 | 1,9 |
| | Duplicado | 3903,1 | | |
| | Triplicado | 3770,0 | | |

Na sequência do trabalho analítico, foram-se tentando alterar aspetos que permitissem um melhor desempenho na realização da extração de FQs em lamas/solos, o que foi conseguido com êxito com as condições que se apresentam na tabela 14.

Tabela 14. Compilação das condições de extração finais, definidas no ASE após a otimização cuidada dos parâmetros que mais influenciam a eficiência da extração.

| Solvente Extrator | Pressão | Temp. | Tempo estático | Ciclos | Vol. Lavagem | Purga | Pré aquecimento |
|--|----------|-------|----------------|--------|--------------|-------|-----------------|
| H ₃ PO ₄ 50 mM/ACN (1:1) | 1500 psi | 65 °C | 3 min. | 6 | 60 % | 60 s | 2 min. |

3.5 Otimização do *Clean-up*

Todos os extratos, após serem recolhidos no ASE e até serem injetados no UPLC, têm que sofrer um tratamento que reduza a quantidade de interferentes e de particulado presentes nos mesmos. Desta forma, garante-se o prolongamento da vida do equipamento e a obtenção de melhores resultados. Para isso, considerou-se uma nova etapa de *clean-up* por SPE realizada num equipamento para o efeito – ASPEC – cujas condições se encontram na tabela 15 e foram retiradas de um método interno já rotinado no laboratório.

Tabela 15. Condições de condicionamento do cartucho, diluição e quantidade de amostra aspirada, lavagem e secagem do cartucho e eluição dos analitos definidas no ASPEC.

| | |
|-----------------|--|
| Condicionamento | 6 mL MeOH seguidos de 3 mL MeOH/H ₂ O (10:90) |
| Amostra | 10 mL de amostra em 250 mL de água ultrapura |
| Lavagem | 3 mL água ultrapura |
| Secagem | Em vácuo durante cerca de 45 min. |
| Eluição | 6 mL MeOH |

Para a obtenção dos extratos que iriam ser submetidos ao processo de *clean-up* seguiu-se um procedimento semelhante ao descrito na otimização da extração diferindo apenas na fortificação das amostras, o que neste caso permitiu a obtenção de uma concentração de 100 µg/kg. Todo o processo de extração foi realizado já sob as condições otimizadas e os extratos obtidos foram submetidos ao *clean-up* por SPE mediante as condições apresentadas na tabela acima. Inicialmente, os 6 mL de extrato obtidos no ASPEC, foram a evaporar, não até à *secura*, num fluxo reduzido de azoto, reconstituiu-se o extrato

com 10 mL de HCOOH 10 mM, centrifugou-se a 4000 rpm durante 10 min., filtrou-se o sobrenadante com um filtro de seringa de 0,22 µm transferindo o filtrado para *vials* do UPLC para posterior análise. À medida que os vários parâmetros foram otimizados as condições foram sendo atualizadas tendo em conta que se seguiu a ordem pela qual são apresentados abaixo.

3.5.1 Cartuchos

Com o objetivo de otimizar o processo de *clean-up* fez-se uma pesquisa sobre os tipos de cartuchos e procedimentos utilizados já descritos noutros estudos para se escolher os mais apropriados para este caso. Mediante a mesma pesquisa [51, 88, 89], e conforme o material disponível no laboratório, considerou-se que seria vantajoso realizar um teste de comparação entre dois cartuchos: Oasis HLB (200 mg/6 mL) e Oasis MAX (500 mg/6 mL), ambos da Waters. A partir dos resultados obtidos, apresentados no anexo A.3.1, foi possível verificar que o cartucho mais adequado seria o HLB. Para uma interpretação mais clara dos resultados apresenta-se o gráfico da figura 27 que compara a média das áreas obtidas no UPLC para os extratos após o *clean-up* com os dois cartuchos utilizados. Através deste, verificou-se que, de uma forma geral, os cartuchos MAX não podem ser utilizados pois conduzem a uma diminuição extremamente significativa de sinal, perdendo-o mesmo por completo no caso de duas das FQs. Na tabela 16 estão apresentadas as áreas obtidas para as 3 extrações, a média das mesmas e o respetivo DPR apenas para o caso do cartucho HLB.

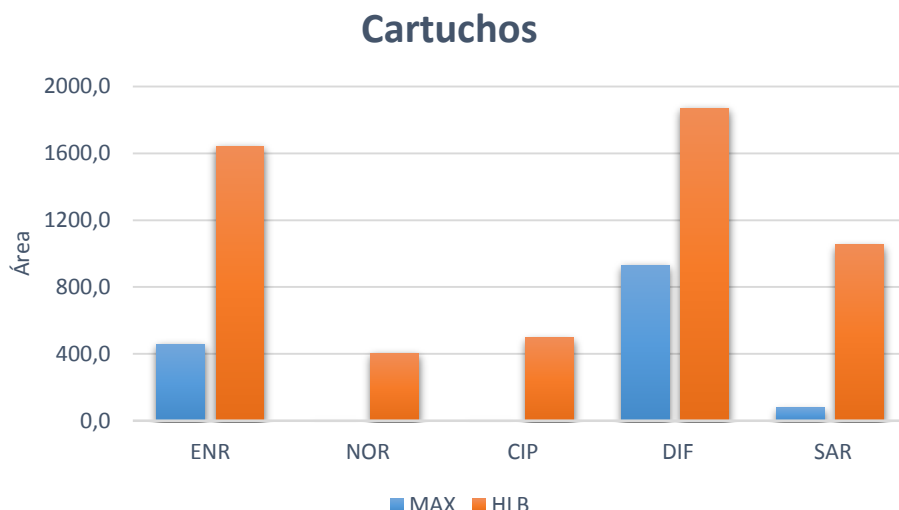


Figura 27. Comparação entre os diferentes cartuchos utilizados na otimização da SPE através da representação gráfica da média das áreas obtidas nas 3 extrações para cada composto pela análise por UPLC.

Tabela 16. Resultados obtidos no UPLC relativamente ao cartucho definido como o mais apropriado para o clean-up dos extratos obtidos no ASE. Apresentação das áreas obtidas em 3 extrações para cada composto, da média das áreas das 3 extrações e do respetivo desvio padrão relativo.

| HLB | | | | |
|-----|-------------|--------|--------|---------|
| FQ | Extração | Área | Média | DPR (%) |
| ENR | 1ª Extração | 1578,9 | 1644,3 | 3,5 |
| | Duplicado | 1666,1 | | |
| | Triplicado | 1687,9 | | |
| NOR | 1ª Extração | 409,8 | 403,9 | 15,1 |
| | Duplicado | 461,6 | | |
| | Triplicado | 340,4 | | |
| CIP | 1ª Extração | 496,2 | 499,0 | 0,6 |
| | Duplicado | 499,1 | | |
| | Triplicado | 501,8 | | |
| DIF | 1ª Extração | 1968,7 | 1870,4 | 4,9 |
| | Duplicado | 1856,8 | | |
| | Triplicado | 1785,8 | | |
| SAR | 1ª Extração | 1077,6 | 1051,5 | 7,6 |
| | Duplicado | 1114,6 | | |
| | Triplicado | 962,3 | | |

Na sequência da otimização do processo de *clean-up* achou-se vantajoso verificar o tipo de alterações a nível de sinal que a adição desta etapa provoca nos resultados. Para isso analisou-se o mesmo extrato em duas condições diferentes, para que os resultados não fossem influenciados pelas variações que pudessem ocorrer entre extrações. Assim, uma parte do extrato foi tratada seguindo o procedimento definido no final da otimização do ASE e outra parte foi submetida ao *clean-up* por SPE com um cartucho HLB. Estes resultados encontram-se na tabela 17.

Tabela 17. Resultados obtidos no UPLC relativamente ao mesmo extrato submetido aos dois diferentes procedimentos: com e sem SPE. Apresentação das áreas obtidas para cada composto e as perdas associadas.

| HLB e sem SPE | | | |
|---------------|---------|--------|------------|
| FQ | sem SPE | HLB | Perdas (%) |
| ENR | 1681,1 | 1578,9 | 6,1 |
| NOR | 543,7 | 461,6 | 15,1 |
| CIP | 555,2 | 496,2 | 10,6 |
| DIF | 1114,4 | 1785,8 | -60,2 |
| SAR | 761,8 | 962,3 | -26,3 |

O gráfico da figura 28 compara as áreas obtidas no UPLC para os dois casos. Concluiu-se que para a ENR, NOR e CIP o procedimento sem a etapa de *clean-up* por SPE apresenta um sinal mais elevado, ainda que seja aproximado do sinal obtido com SPE, como demonstra a tabela 17 já que as perdas não são significativas pois são inferiores a 20%. Para a DIF e SAR o procedimento com SPE apresenta áreas superiores. Ao analisar os cromatogramas obtidos quando se utiliza SPE (figura 29) verifica-se que estes estão mais livres de interferentes, o que não acontece com os que dizem respeito ao procedimento sem SPE (figura 30), especialmente no caso da ENR, NOR e CIP. Posto isto, percebeu-se que é de facto importante realizar o SPE como processo de *clean-up*, obtendo assim melhores cromatogramas, sinais idênticos em três das FQs de interesse e intensificando o sinal de outras duas.

Com e sem SPE

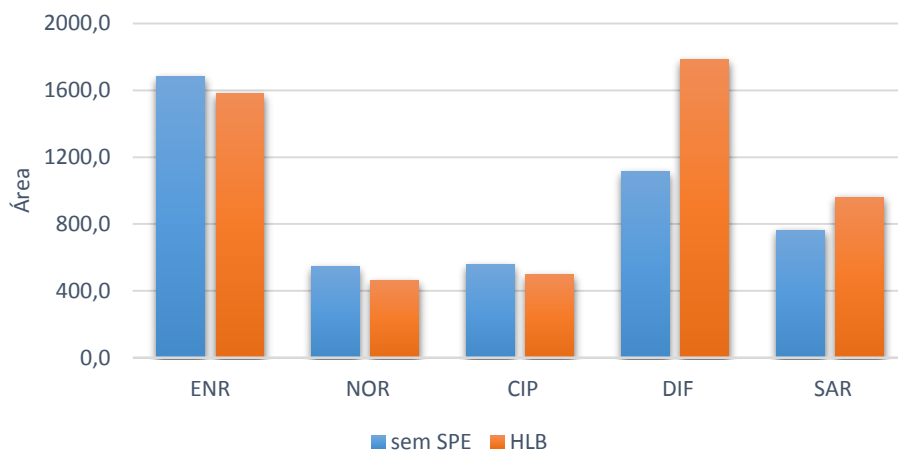


Figura 28. Comparação entre a utilização ou não da etapa de SPE realizada ao mesmo extrato através da representação gráfica das áreas obtidas para cada composto pela análise por UPLC.

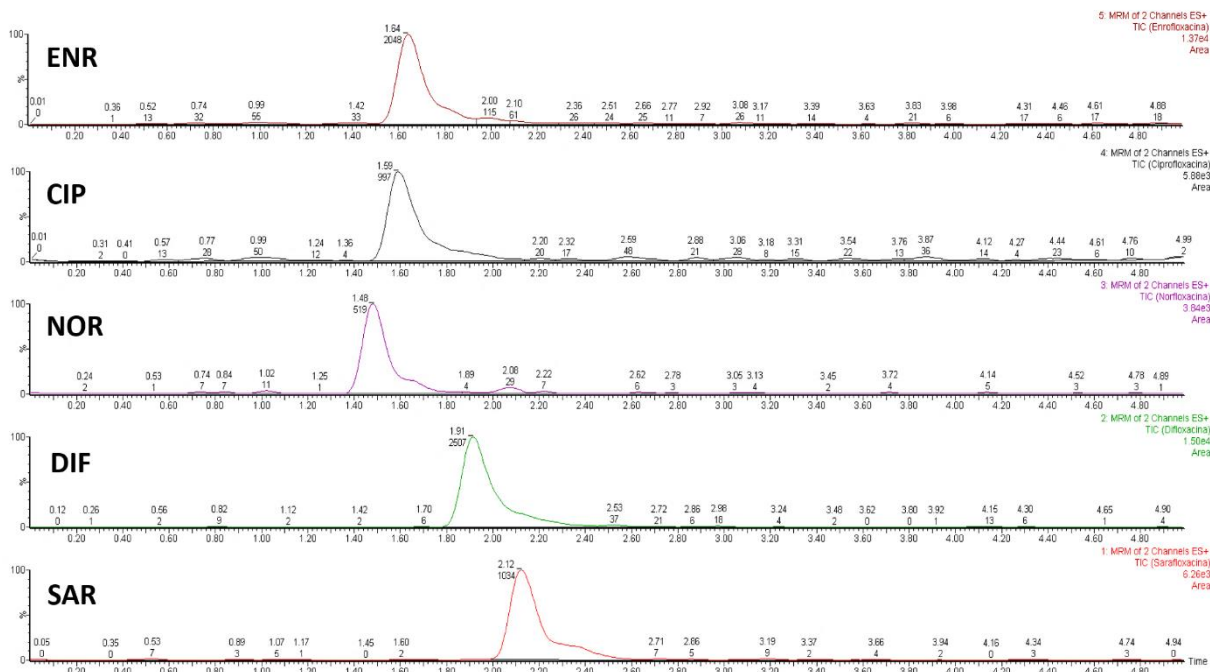


Figura 29. Cromatogramas obtidos no UPLC após a análise do extrato submetido à etapa de clean-up por SPE para todas as FQs.

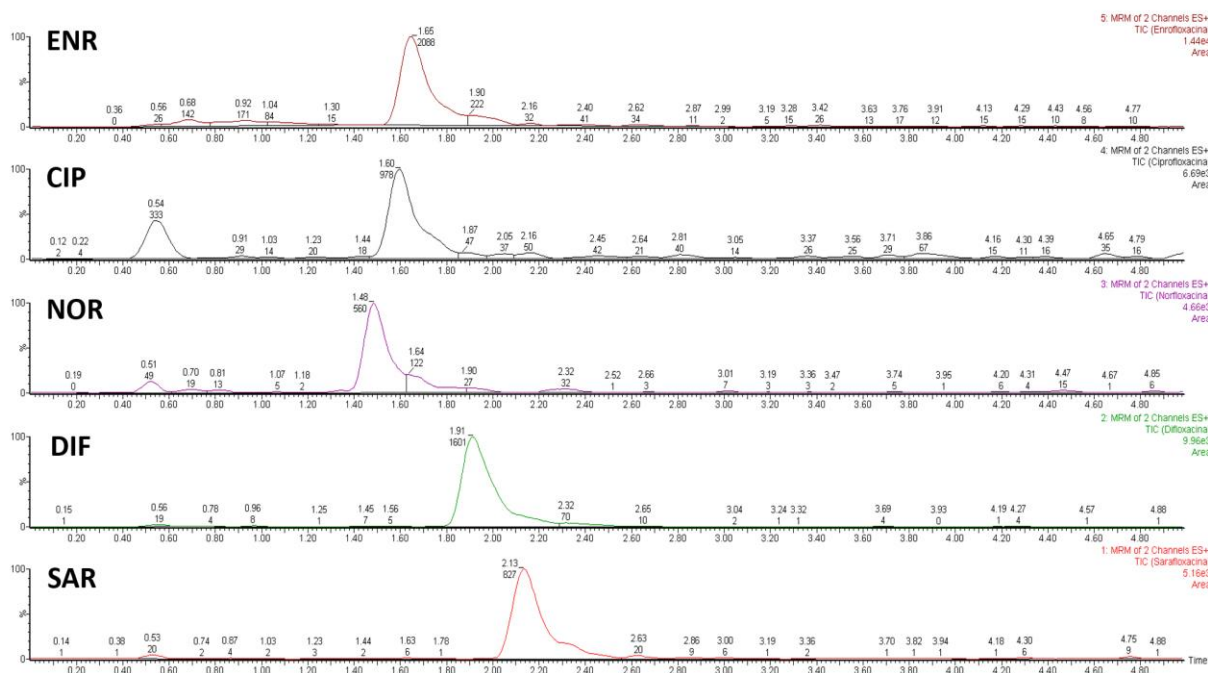


Figura 30. Cromatogramas obtidos no UPLC após a análise do extrato sem a utilização da etapa de clean-up por SPE para todas as FQs.

3.5.2 Diluição da Amostra

É necessário também definir o tipo de diluição mais vantajosa dos extratos para o *clean-up* por SPE. Para isso efetuaram-se diferentes diluições de 10 mL de cada extrato obtido no ASE (5x, 10x, 25x e 50x) em 4 volumes diferentes com água ultrapura: 50 mL, 100 mL, 250 mL e 500 mL. Para uma melhor comparação dos resultados é apresentado o gráfico da figura 31 que compara as diferentes diluições a partir das áreas obtidas no UPLC para cada FQ em estudo. A partir do mesmo é possível concluir que diluir o extrato 25x (10 mL de extrato em 250 mL de água ultrapura) foi mais eficaz no sentido da obtenção de um sinal mais intenso para todas as FQs exceto para a DIF que tem mesmo assim um sinal mais elevado que todas as outras. Na tabela 18 estão apresentadas as áreas obtidas para as 3 extrações, a média das mesmas e o respetivo DPR apenas para a diluição escolhida como a mais favorável. Os restantes resultados e cromatogramas encontram-se no anexo A.3.2.

Diluição dos extratos

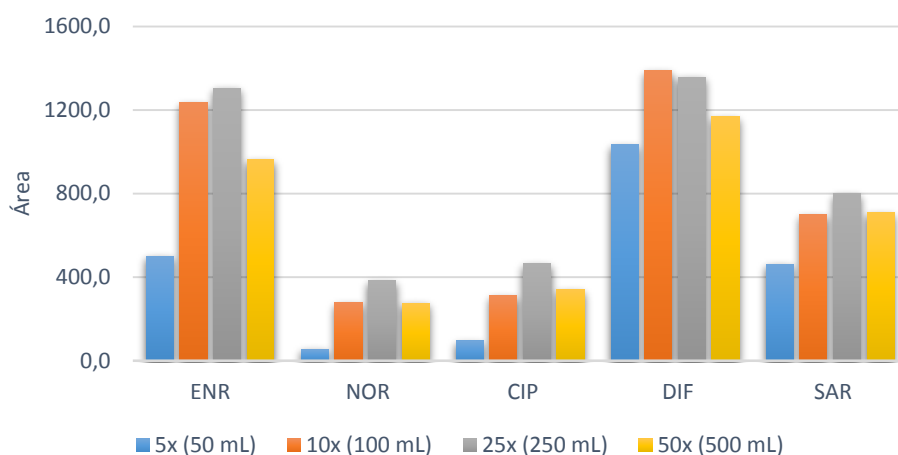


Figura 31. Comparação entre as diferentes diluições dos extratos utilizadas na otimização da SPE através da representação gráfica da média das áreas obtidas nas 3 extrações para cada composto pela análise por UPLC.

Tabela 18. Resultados obtidos no UPLC relativamente à diluição dos extratos obtidos no ASE definida como a mais apropriada para o clean-up destes. Apresentação das áreas obtidas em 3 extrações para cada composto, da média das áreas das 3 extrações e do respetivo desvio padrão relativo.

| Diluição 25x | | | | |
|--------------|-------------|--------|--------|---------|
| FQ | Extração | Área | Média | DPR (%) |
| ENR | 1ª Extração | 1228,6 | 1304,7 | 5,1 |
| | Duplicado | 1351,3 | | |
| | Triplicado | 1334,2 | | |
| NOR | 1ª Extração | 360,1 | 382,7 | 5,3 |
| | Duplicado | 398,6 | | |
| | Triplicado | 389,4 | | |
| CIP | 1ª Extração | 450,2 | 466,2 | 8,4 |
| | Duplicado | 437,8 | | |
| | Triplicado | 510,6 | | |
| DIF | 1ª Extração | 1330,2 | 1358,9 | 3,5 |
| | Duplicado | 1333,2 | | |
| | Triplicado | 1413,4 | | |
| SAR | 1ª Extração | 799,1 | 800,2 | 1,6 |
| | Duplicado | 813,8 | | |
| | Triplicado | 787,8 | | |

3.5.3 Outros Aspetos Otimizados

Na continuação da otimização da etapa de *clean-up* considerou-se vantajoso concentrar os analitos de interesse para intensificar o sinal, com o intuito de diminuir os limites de deteção e quantificação. Para isso reconstituiu-se o extrato evaporado com diferentes volumes de fase móvel para concentrar os compostos em estudo em diferentes níveis: 10 mL (sem concentrar), 5 mL (concentrar 2x), 2 mL (concentrar 5x), 1 mL (concentrar 10x) e 100 µL (concentrar 100x).

O gráfico da figura 32, que permite a comparação entre os diferentes níveis de concentração dos analitos testados, demonstra que realmente o sinal é mais elevado à medida que se concentra os analitos. Assim, verifica-se que o sinal mais intenso se obtém quando se concentra os analitos 100x, no entanto, resta um volume muito pequeno (100 µL) impedindo mais do que uma injeção (no caso de ocorrer algum percalço durante a análise) e impossibilitando a realização de uma centrifugação seguida de filtração. Posto isto, decidiu-se que seria mais vantajoso concentrar apenas 10x, pois apesar de o sinal não ser tão intenso permite prolongar a vida do detetor já que é possível reduzir a quantidade de particulado que é injetado no equipamento. Na tabela 19 estão apresentadas as áreas obtidas para as 3 extrações, a média das mesmas e o respetivo DPR apenas para o nível de concentração definido como o mais favorável. Os restantes resultados bem como os respetivos cromatogramas encontram-se no anexo A.3.3.

Concentrar os analitos

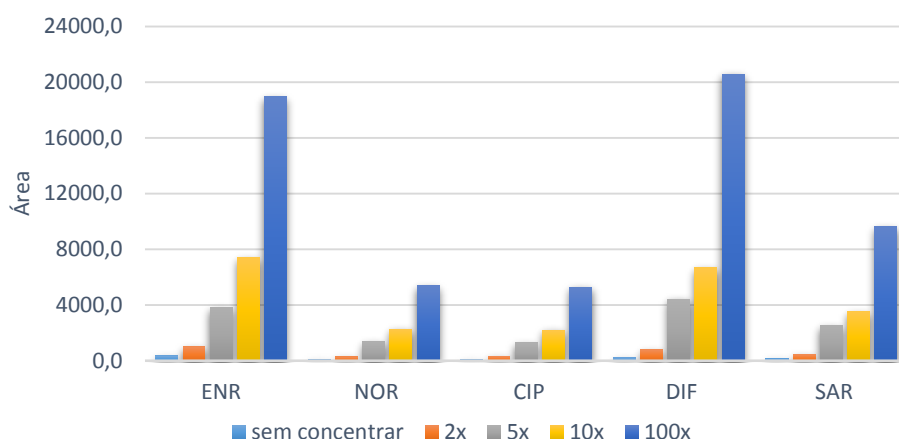


Figura 32. Comparação entre os diferentes níveis de concentração dos analitos testados nos extratos após SPE através da representação gráfica da média das áreas obtidas nas 3 extrações para cada composto pela análise por UPLC.

Tabela 19. Resultados obtidos no UPLC relativamente ao nível de concentração testado nos extratos após SPE definido como o mais apropriado. Apresentação das áreas obtidas em 3 extrações para cada composto, da média das áreas das 3 extrações e do respetivo desvio padrão relativo.

| Concentrar 10x | | | | |
|----------------|-------------|--------|--------|---------|
| FQ | Extração | Área | Média | DPR (%) |
| ENR | 1ª Extração | 7346,7 | 7389,4 | 2,2 |
| | Duplicado | 7565,4 | | |
| | Triplicado | 7256,2 | | |
| NOR | 1ª Extração | 2340,2 | 2270,3 | 4,1 |
| | Duplicado | 2163,4 | | |
| | Triplicado | 2307,2 | | |
| CIP | 1ª Extração | 2072,0 | 2173,8 | 4,3 |
| | Duplicado | 2196,0 | | |
| | Triplicado | 2253,4 | | |
| DIF | 1ª Extração | 6659,8 | 6675,7 | 1,7 |
| | Duplicado | 6796,2 | | |
| | Triplicado | 6571,1 | | |
| SAR | 1ª Extração | 3595,0 | 3519,3 | 4,2 |
| | Duplicado | 3613,8 | | |
| | Triplicado | 3349,3 | | |

Após a otimização cuidada de todos os parâmetros foi possível verificar que as condições iniciais definidas no ASPEC eram de facto as que originavam melhores resultados. Concluiu-se ainda que a utilização do SPE melhora significativamente a qualidade dos extratos injetados no UPLC e conseqüentemente a qualidade dos cromatogramas obtidos. Por fim, ao concentrar os analitos 10x verificou-se que o sinal obtido era cerca de cinco vezes superior o que adiciona uma mais-valia ao método desenvolvido.

CAPÍTULO 4.

Parte Experimental

4.1 Materiais

4.1.1 Reagentes e Soluções

Os padrões da ciprofloxacina (98 %), difloxacina (99 %) e sarafloxacina (97,3 %) foram adquiridos à Fluka (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), enquanto a norfloxacina (99,8 %) e a enrofloxacina (99,2 %) foram adquiridas à Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). As soluções padrão individualizadas de cada uma das FQs foram preparadas em metanol com uma concentração de aproximadamente 500 mg/L, a partir das quais se preparou a solução intermédia da mistura das FQs de 2 mg/L. A água utilizada nas mais diversas soluções foi primeiramente purificada com um sistema Milli-Q (Millipore, Billerica, MA, USA). O ácido ortofosfórico (85-88 %) e o ácido fórmico (98 %) foram adquiridos à Fluka (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e à Riedel-de-Häen (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), respetivamente. O metanol e o acetonitrilo foram adquiridos à Carlo-Erba (França) ambos com grau de pureza adequado à utilização em HPLC (99,9 %).

4.1.2 Material e Equipamento

Para a extração das amostras recorreu-se a um ASE350 da Dionex (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, EUA) equipado com células de extração de aço inoxidável de 5 mL às quais foram sempre colocados novos filtros de celulose de 27 mm em cada extração. Para o *clean-up* por SPE utilizou-se o ASPEC XL da Gilson (Middleton, WI, EUA) disponível no laboratório e cartuchos Oasis HLB (200 mg/6 mL) da Waters (Milford, MA, EUA). Para a secagem dos cartuchos durante o processo de *clean-up* recorreu-se ao apoio de um sistema de vácuo Vac Elut SPS 24 da Varian (Walnut Creek, CA, EUA) acoplado a uma bomba. Para a separação e deteção dos compostos foi utilizado um Acquity Ultra Performance LC equipado com uma coluna Acquity UPLC BEH C₁₈ (1,7 µm; 2,1x50 mm), acoplado a um detetor triplo-quadrupolo equipado com ionização por eletrospray, tudo da Waters (Milford, MA, EUA). A centrifugação dos extratos foi realizada com o auxílio de uma centrífuga Centrifuge 5810R da Eppendorf (Hamburgo, Alemanha). Todo o material de vidro utilizado foi submetido a um tratamento prévio para eliminar tanto quanto possível os compostos que pudessem interferir nos resultados.

4.2 Preparação da Amostra

Para a aplicação do método desenvolvido foram rececionadas no laboratório 3 amostras: solo, lama (colhida na ETAR selecionada após a etapa de desidratação) e fertilizante (produzido a partir das lamas resultantes do tratamento das águas residuais). Estas amostras sofreram a mesma preparação que a descrita no capítulo de desenvolvimento do método. Foram secas ao ar, durante cerca de 2 ou 3 dias, como demonstra a figura 33. Após a secagem, estas foram trituradas num almofariz e tamisadas com uma peneira de 1 mm para remover partículas de maiores dimensões e homogeneizar o mais possível a amostra. Foram reservadas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz para posteriormente se realizarem 3 ensaios independentes para cada amostra aplicando o método desenvolvido.



Figura 33. Demonstração da secagem das amostras.

4.3 ASE – Extração das FQs

4.3.1 Condições Experimentais

Após a otimização cuidada de todos os parâmetros, (descrita ao pormenor no capítulo anterior) o solvente utilizado para a extração das amostras foi uma solução de H_3PO_4 10 mM/ACN (1:1) e no equipamento foram definidas as seguintes condições: a pressão foi mantida a 1500 psi, a temperatura a 65 °C, com 2 min. de pré-aquecimento, 6 ciclos de 3 min. cada, com um volume de lavagem de 60 % e 60 s de tempo de purga para eliminar qualquer vestígio de solvente/extrato que tenha ficado na tubagem do equipamento.

4.3.2 Procedimento

Começou-se por pesar cerca de 2 g de amostra para um goblé e 0,5 g de dispersante TD, mantendo a proporção recomendada no manual do equipamento (4 g de amostra para 1 g de TD). Esta mistura foi bem homogeneizada e transferida para a célula de extração que se encontra apresentada na figura 34. O enchimento da célula segue a mesma linha de raciocínio exemplificada no capítulo anterior na figura 22: a mistura foi transferida para a célula de extração, que continha filtros de celulose de 27 mm nas extremidades, e, quando necessário, acrescentou-se TD até sobrar um espaço de cerca de 0,5 cm no topo da célula. De seguida, esta foi bem fechada e colocada no equipamento para ser submetida ao processo de extração. Na figura 34 estão apresentadas as diferentes etapas de preparação das células de extração e na figura 35 o equipamento utilizado na extração – ASE350. É ainda apresentada uma imagem com alguns dos extratos obtidos por ASE na figura 36 que justificam a necessidade da realização de uma etapa de *clean-up* tendo em conta a coloração dos mesmos, além das outras razões anteriormente referidas.



Figura 34. Células de extração (5 mL) do ASE. **1-** Célula desmontada nas suas 3 principais peças, duas “tampas” e o “corpo” da célula; **2-** Células prontas para receber a amostra com os filtros nas “tampas”; **3-** Células com a amostra; **4-** Célula fechada pronta para a extração.



Figura 35. Equipamento utilizado na extração das amostras – ASE350.

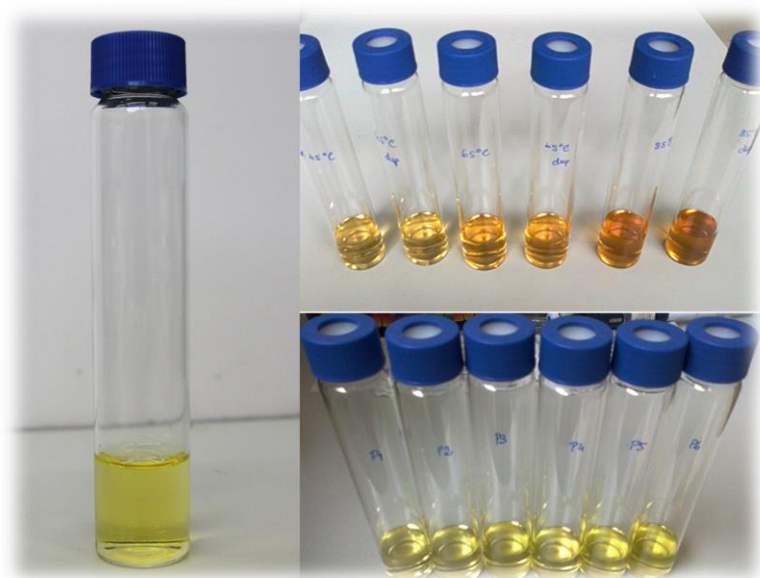


Figura 36. Aspeto de alguns extratos obtidos pela ASE.

4.4 SPE – *Clean-up* dos Extratos

4.4.1 Condições Experimentais

Como referido anteriormente, foi utilizado o ASPEC (figura 37) para o *clean-up* dos extratos e as condições definidas neste foram mantidas as mesmas que as de um método já rotinado no laboratório. No equipamento estavam então definidas as seguintes condições: condicionamento dos cartuchos com 6 mL de metanol seguidos de 3 mL de água ultrapura, passagem de 250 mL de amostra, lavagem com 3 mL de água ultrapura e eluição com 6 mL de metanol.

4.4.2 Procedimento

Dos extratos obtidos no ASE retirou-se 10 mL de cada e diluiu-se em 250 mL de água ultrapura. Os cartuchos HLB foram condicionados e este volume de amostra foi posteriormente aspirado e feito passar pelos mesmos. Após a lavagem, os cartuchos foram secos em vácuo no equipamento apresentado na figura 37 durante cerca de 45 min. Depois de secos os cartuchos foram novamente colocados no ASPEC para se proceder à eluição a partir da qual se obteve cerca de 6 mL de extrato num tubo de ensaio de vidro.

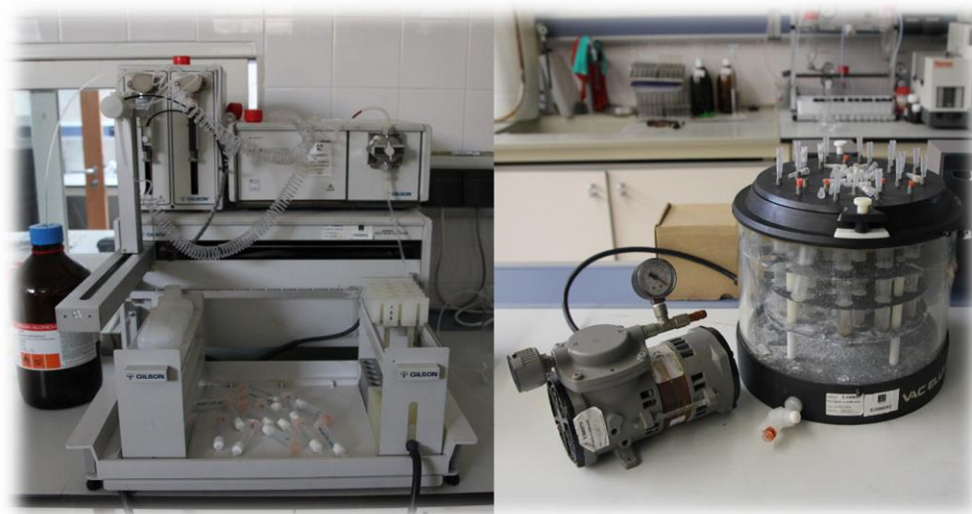


Figura 37. Equipamento de extração em fase sólida ASPEC (à esquerda) e sistema de vácuo para a secagem dos cartuchos (à direita).

Os extratos obtidos foram a evaporar, não até à secura, sob um fluxo reduzido de N_2 , como demonstrado na figura 38. Reconstituiu-se o conteúdo do tubo com 1 mL de $HCOOH$ 10 mM para concentrar os analitos e centrifugou-se no equipamento apresentado na figura 38 a 4000 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi filtrado com um filtro de seringa de $0,22\ \mu m$ e transferido para um *vial* de análise por UPLC.

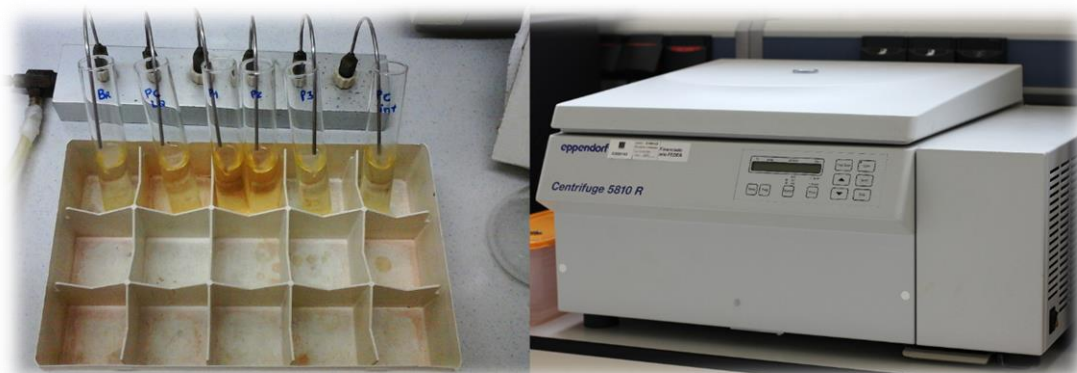


Figura 38. Evaporação dos extratos sob fluxo de N_2 (à esquerda) e o equipamento onde se realizou a centrifugação (à direita).

4.5 UPLC-MS/MS – Separação e Detecção dos Compostos

4.5.1 Condições Experimentais

Como fases móveis foram definidos o metanol (A) e uma solução aquosa de ácido fórmico 10 mM (B). O gradiente destes (variação das quantidades de fase móvel A ou B que passa no sistema ao longo do tempo) encontra-se explícito na tabela 5 do capítulo 3. Cada corrida tem a duração de cerca de 13 min. e as fases móveis passam a um fluxo constante de $0,300\ mL/min$ por uma coluna C_{18} ($1,7\ \mu m$; $2,1 \times 50\ mm$).

4.5.2 Procedimento

É fácil perceber que na última fase do procedimento do SPE o extrato fica pronto para ser analisado no UPLC (equipamento apresentado na figura 39). No entanto, há diversos fatores a ter em conta sempre que se utiliza o equipamento. É necessário verificar o loop do injetor requerido para este trabalho ($10\ \mu L$), a seringa (capacidade de $100\ \mu L$), a coluna

desejada e confirmar as ligações de forma a evitar fugas no sistema e por consequência alteração dos resultados. Resumidamente, é necessário verificar todas as ligações de passagem de fase móvel no equipamento tendo em conta que a análise em questão é apenas uma das muitas realizadas no laboratório. Posto isto, ligam-se os gases, o detetor e o fluxo e, após estabilização do sistema que é possível controlar a partir de um *software*, é possível iniciar a análise cromatográfica.



Figura 39. Equipamento utilizado na separação e deteção dos compostos – UPLC-MS/MS. **1-** amostrador automático e injetor; **2-** em primeiro plano o sistema de separação e deteção dos compostos; **3-** visão geral do UPLC com, da esquerda para a direita: amostrador, bomba e SPE “online”, solventes e coluna, detetor.

CAPÍTULO 5.

Validação do Método Analítico

5.1 Linearidade e Gama de Trabalho

A linearidade do método desenvolvido foi testada recorrendo à construção de curvas de calibração para cada composto de interesse para verificar a capacidade do método obter resultados proporcionais à concentração do analito [90]. Após alguma pesquisa [51], recorrendo a métodos internos já desenvolvidos no laboratório e alguns testes, a gama de trabalho foi definida com as seguintes concentrações: 12,5; 25,0; 50,0; 100; 150 e 250 µg/kg. Para a preparação dos padrões, escolheu-se um solo livre de FQs e seguiu-se o procedimento descrito no capítulo 4. Pesou-se 2 g de amostra e fortificou-se com uma solução padrão da mistura de FQs de interesse de forma a obter-se os diferentes níveis de concentração da gama de trabalho. As diferentes porções de amostra fortificada foram então submetidas a todo o método desenvolvido (extração por ASE, *clean-up* por SPE e análise por UPLC).

Para verificar a linearidade das curvas de calibração construídas, avaliou-se o coeficiente de correlação obtido em cada caso e realizou-se ainda o teste de linearidade. Quanto mais próximo de 1 estiver o R^2 , menor será o valor do desvio padrão residual e por isso, assume-se que o coeficiente de correlação deve ser superior a 0,990 para que se possa considerar que a curva de calibração apresenta uma linearidade satisfatória. Já o teste de linearidade consiste no cálculo da função de calibração linear (equação 2) e na função de calibração não linear (equação 3). Calcula-se a diferença das variâncias (equação 4) e aplica-se o teste PG (equação 5) comparando com o valor tabelado da distribuição F de Snedecor/Fisher. Se PG for menor ou igual a F então a função polinomial não produz um melhor ajustamento dos pontos e por isso a função de calibração é linear. No entanto, se PG for superior a F a função de calibração é não linear.

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}} \quad \text{Equação 2}$$

$$S_{y2} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 3}} \quad \text{Equação 3}$$

nas quais, $S_{y/x}$ e S_{y2} representam os desvios padrão residuais e n o número de padrões de calibração.

$$DS^2 = (n - 2) \times S_{y/x}^2 - (n - 3) \times S_{\bar{y}}^2 \quad \text{Equação 4}$$

na qual n é o número de graus de liberdade da função quadrática.

$$PG = \frac{DS^2}{S_{y^2}} \quad \text{Equação 5}$$

5.2 Limiares Analíticos

O limite de deteção (LD) é a mais baixa concentração de analito na amostra que pode ser detetada e o limite de quantificação é a menor concentração de analito que pode ser determinada com um valor aceitável de precisão [91].

Estes limites foram calculados a partir da calibração anteriormente efetuada. O LD foi obtido a partir da equação 6 e o LQ a partir da equação 7.

$$LD = \frac{3,3 \times S_{y/x}}{m} \quad \text{Equação 6}$$

$$LQ = \frac{10 \times S_{y/x}}{m} \quad \text{Equação 7}$$

nas quais, m representa o declive e $S_{y/x}$ o desvio padrão residual das retas.

Pretende-se que o LQ calculado seja próximo do padrão de mais baixa concentração (12,5 µg/kg) definido na gama de trabalho.

5.3 Precisão

A precisão do método foi avaliada tendo em conta dois parâmetros: repetibilidade e precisão intermédia.

5.3.1 Repetibilidade

Foram realizados 5 ensaios sucessivos ao nível do padrão de 25 µg/kg, no mesmo dia, pelo mesmo analista, no mesmo equipamento e laboratório, sem alterar qualquer condição, para determinar a repetibilidade do método. Para isso, cerca de 2 g de amostra foram

fortificadas de forma a obter a concentração desejada, e foram realizadas 5 extrações com estas condições. Os extratos foram submetidos a todo o método desenvolvido.

O cálculo da repetibilidade foi determinado pelo desvio padrão relativo entre os valores obtidos nos 5 ensaios e considerou-se aceitáveis valores de DPR (equação 8) inferiores a 25% uma vez que o método desenvolvido compreende diversas etapas que originam algumas perdas durante o processo.

$$DPR (\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Equação 8}$$

na qual \bar{x} representa a média dos resultados obtidos e s o respetivo desvio padrão.

5.3.2 Precisão Intermédia

A precisão intermédia foi avaliada em 5 ensaios ao nível do padrão intermédio (100 µg/kg), exatamente nas mesmas condições que foi avaliada a repetibilidade, variando apenas o dia em que cada ensaio foi realizado.

O cálculo desta foi determinado também pelo DPR e considerou-se, mais uma vez, aceitáveis valores inferiores a 25% pelas razões acima descritas.

5.4 Recuperação

Para a avaliação da recuperação realizou-se uma calibração direta representativa das concentrações definidas na gama de trabalho e uma calibração realizada a partir da fortificação de uma amostra nos diferentes níveis de concentrações definidos na gama de trabalho que foi submetida a todo o método desenvolvido.

As percentagens de recuperação foram calculadas ao longo de toda a gama de trabalho a partir da equação 9.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{C1 - C2}{C3} \times 100 \quad \text{Equação 9}$$

onde $C1$ é a concentração na amostra fortificada (determinada a partir da calibração efetuada com o método desenvolvido) e $C2$ é a concentração na amostra e $C3$ é a concentração da fortificação (determinada a partir da calibração direta).

5.5 Identificação dos Compostos

Através dos resultados fornecidos pelo *software* do equipamento, foram compilados os dados referentes aos tempos de retenção (TR) e *ion ratio* (razão entre o íão de quantificação e o íão de confirmação), obtidos para todos os compostos, numa das calibrações efetuada. Calculou-se a média e os DPR destes para ser possível estabelecer dois critérios de identificação dos compostos. Desta forma, a presença de determinado composto numa amostra só é provada se os TR e *ion ratio* estiverem compreendidos entre os valores que foram definidos.

5.6 Quantificação dos Compostos

A partir das curvas de calibração elaboradas para cada FQ e das respetivas equações da reta obtidas é possível determinar a concentração dos analitos nas amostras por interpolação. Os valores de m e b são conhecidos, os valores de y são os obtidos experimentalmente e, por substituição na equação da reta (equação 10), determina-se o x obtendo-se assim a concentração dos analitos nas amostras. Sempre que os valores de concentração obtidos são inferiores ao LQ ou ao LD, é desta forma que os resultados devem ser apresentados.

$$y = mx + b \qquad \text{Equação 10}$$

na qual y representa o sinal obtido (nesta caso a área), m o declive, x a concentração dos analitos e b a ordenada na origem.

CAPÍTULO 6.

Resultados e Discussão

6.1 Linearidade e Gama de Trabalho

A partir da calibração efetuada foi possível obter as curvas de calibração apresentadas nas figuras 40 a 44. Foi necessário remover o ponto referente ao P4, de 100 µg/kg uma vez que, para todas as FQs, apresentava um desvio excessivo em relação à curva de calibração. Desta forma, verifica-se que o método apresenta uma boa linearidade na gama de trabalho definida. Na tabela 20 são apresentados os valores obtidos a partir da reta e do teste de linearidade.

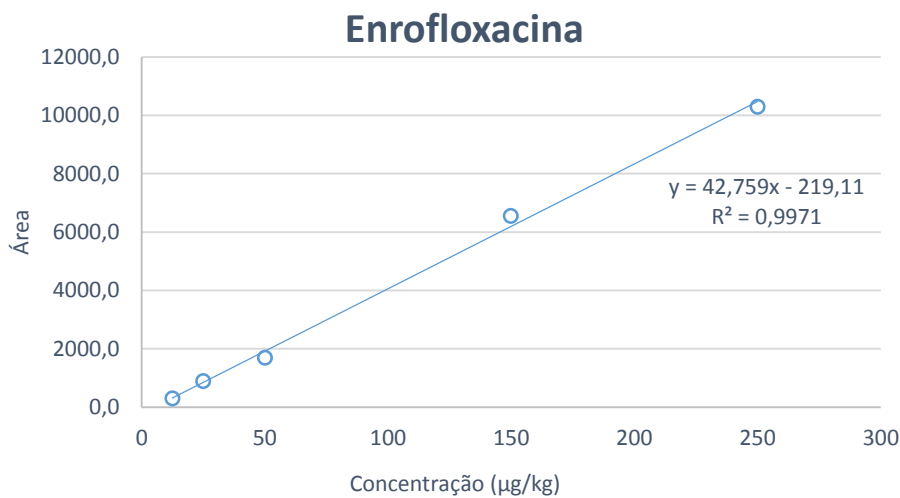


Figura 40. Representação gráfica da curva de calibração obtida para a ENR.

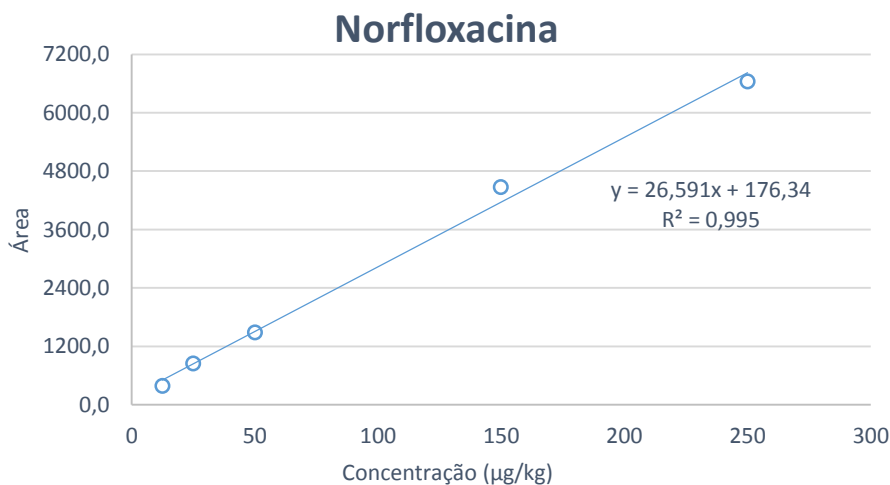


Figura 41. Representação gráfica da curva de calibração obtida para a NOR.

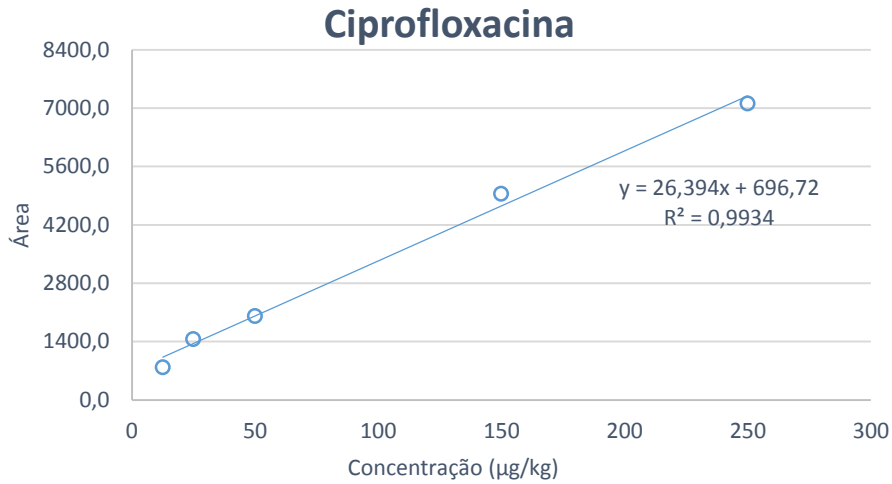


Figura 42. Representação gráfica da curva de calibração obtida para a CIP.

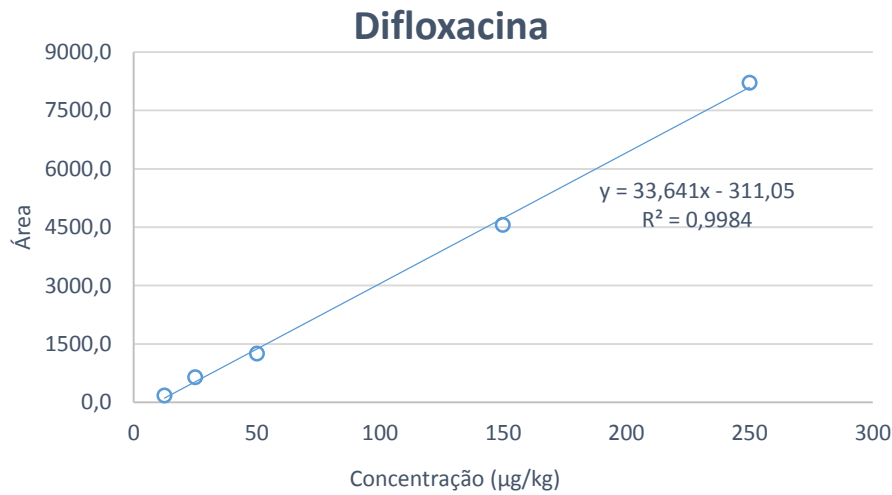


Figura 43. Representação gráfica da curva de calibração obtida para a DIF.

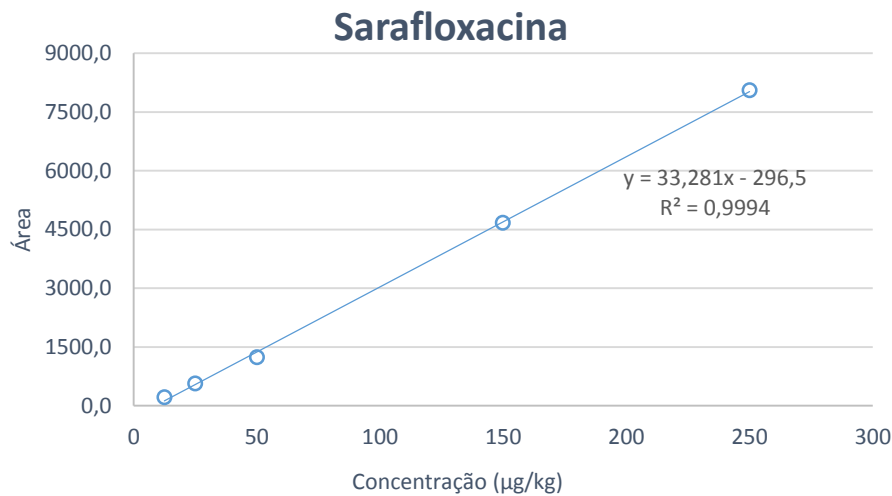


Figura 44. Representação gráfica da curva de calibração obtida para a SAR.

Tabela 20. Resultados obtidos após a validação do método para todas as FQs em estudo.

| FQ | <i>m</i> | <i>b</i> | R ² | <i>S</i> _{<i>y/x</i>} | DS ² | PG | F |
|-----|----------|----------|----------------|--------------------------------|-----------------|-------|-------|
| ENR | -219,11 | 42,759 | 0,9971 | 269,52 | 88920,74 | 1,379 | |
| NOR | 26,591 | 176,34 | 0,9950 | 219,12 | 126455,9 | 14,38 | |
| CIP | 26,394 | 696,72 | 0,9934 | 249,90 | 142621,9 | 6,378 | 15,98 |
| DIF | 33,641 | 311,05 | 0,9984 | 156,58 | 63549,31 | 12,71 | |
| SAR | 33,281 | -296,5 | 0,9994 | 97,74 | 10224,71 | 1,109 | |

Atendendo à tabela 20 verifica-se que de facto os valores de R² são superiores a 0,990 e PG≤F para todas as FQs o que significa que a função polinomial não produz um melhor ajustamento dos pontos e, por isso, a função é linear. Os cromatogramas referentes à calibração são apresentados no anexo B.1 a partir dos quais se verifica que mesmo a baixas concentrações os picos são bem definidos e a linha de base apresenta pouco ruído. Todos os resultados desta validação encontram-se apresentados no anexo B.2.

6.2 Limiares Analíticos

Os limites de deteção e quantificação teóricos foram calculados a partir das equações apresentadas no capítulo anterior. Os experimentais foram obtidos a partir da injeção de um padrão controlo (submetido, em triplicado, a todo o método analítico desenvolvido) ao nível do LQ cujo resultado foi posteriormente lido nas curvas de calibração obtidas. Atendendo às tabelas 21 e 22 verificou-se que o LQ teórico é bastante elevado quando comparado com o LQ obtido experimentalmente. Esta diferença está relacionada com diversos fatores como os elevados valores de *S*_{*y/x*} e a utilização de uma gama de trabalho alargada (o último padrão é 20x mais concentrado que o primeiro). Também a baixa linearidade do método na maioria dos casos (R² < 0,999) faz com que os limites sejam mais elevados do que o verificado na prática. Contudo, experimentalmente verificou-se ser possível ler concentrações de aproximadamente 12,5 µg/kg com DPR inferiores a 25 % pelo que estes limites são os que melhor representam a realidade.

Tabela 21. Limites de deteção (LD) e quantificação (LQ) teóricos obtidos a partir das curvas de calibração.

| FQ | LD ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | LQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$) |
|-----|--------------------------------|--------------------------------|
| ENR | 20,80 | 63,03 |
| NOR | 27,19 | 82,40 |
| CIP | 31,24 | 94,68 |
| DIF | 15,36 | 46,54 |
| SAR | 9,69 | 29,37 |

Tabela 22. Limites de deteção e quantificação (média dos 3 ensaios) obtidos experimentalmente e respetivo DPR.

| FQs | LD ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | LQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | DPR (%) |
|-----|--------------------------------|--------------------------------|---------|
| ENR | 3,66 | 12,09 | 5,1 |
| NOR | 3,14 | 10,36 | 10,4 |
| CIP | 3,54 | 11,66 | 0,5 |
| DIF | 4,39 | 14,49 | 7,1 |
| SAR | 4,01 | 13,22 | 8,6 |

6.3 Precisão

6.3.1 Repetibilidade

Na tabela 23 estão apresentados os valores obtidos no teste de repetibilidade, que, como o pretendido, apresentam desvios inferiores a 25%. Este teste foi realizado apenas ao nível de concentração do segundo padrão, uma concentração próxima do LQ que tem demonstrado ser a concentração mais aproximada dos valores de FQs encontrados no meio ambiente. Tendo em conta as inúmeras etapas que fazem parte do método desenvolvido, os valores de DPR obtidos são baixos e satisfatórios. Pode-se por isso afirmar que o método encontra-se validado em termos de repetibilidade.

Tabela 23. Resultados obtidos no teste de repetibilidade ao nível do P2 (25 µg/kg).

| FQ | Concentração (µg/kg) | | | | | Média | DPR (%) |
|-----|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|---------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | |
| ENR | 25,93 | 24,24 | 26,06 | 24,81 | 25,53 | 25,31 | 3,04 |
| NOR | 23,13 | 23,73 | 25,34 | 26,74 | 25,90 | 24,97 | 6,02 |
| CIP | 22,74 | 22,29 | 23,57 | 23,65 | 25,77 | 23,60 | 5,68 |
| DIF | 21,54 | 22,57 | 22,32 | 23,45 | 24,00 | 22,77 | 4,25 |
| SAR | 21,82 | 21,67 | 21,84 | 25,51 | 25,04 | 23,18 | 8,31 |

6.3.2 Precisão intermédia

No que diz respeito à determinação da precisão intermédia, a tabela 24 apresenta os valores obtidos verificando-se que os desvios são inferiores a 25 %, um valor bastante aceitável tendo em conta todos os passos a que a amostra é submetida e a complexidade da matriz.

Tabela 24. Resultados obtidos para a determinação da precisão intermédia (100 µg/kg).

| FQ | Concentração (µg/kg) | | | | | Média | DPR (%) |
|-----|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|---------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | |
| ENR | 100,1 | 119,4 | 97,96 | 87,40 | 88,03 | 98,57 | 13,1 |
| NOR | 119,5 | 82,27 | 81,98 | 117,2 | 83,90 | 96,96 | 20,1 |
| CIP | 110,2 | 77,20 | 108,2 | 108,4 | 79,60 | 96,71 | 17,3 |
| DIF | 80,07 | 80,44 | 116,0 | 115,3 | 93,82 | 97,13 | 18,3 |
| SAR | 101,2 | 98,30 | 108,1 | 81,64 | 101,2 | 98,09 | 10,1 |

6.4 Recuperação

As taxas de recuperação foram calculadas e encontram-se apresentadas na tabela 25, contudo é necessário ter em conta que em todos os casos, obviamente com a exceção da calibração direta, quer os padrões quer as amostras, foram submetidos a todo o método desenvolvido, e portanto a interferência da matriz nos resultados vai ser igual tanto na calibração como nas amostras.

Tabela 25. Taxas de recuperação obtidas para cada FQ ao longo de toda a gama de trabalho.

| FQ | Taxas de recuperação (%) | | | | | | Média |
|-----|--------------------------|------|------|------|------|------|-------|
| | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | P6 | |
| ENR | 96,5 | 78,0 | 62,9 | 76,6 | 64,8 | 69,0 | 74,6 |
| NOR | 89,8 | 70,3 | 62,0 | 68,7 | 61,7 | 61,2 | 69,0 |
| CIP | 91,9 | 72,2 | 66,8 | 63,3 | 65,1 | 74,6 | 68,4 |
| DIF | 60,4 | 64,4 | 55,1 | 50,1 | 56,2 | 50,1 | 56,1 |
| SAR | 54,2 | 50,2 | 52,0 | 60,6 | 51,6 | 53,0 | 53,6 |

6.5 Identificação dos Compostos

Para a identificação dos compostos foram utilizados dois critérios: TR e a *ion ratio*. Na tabela 26 são apresentadas as médias dos TR e do *ion ratio* e o respetivo desvio padrão relativo para cada FQ. A presença de FQs nas amostras só é confirmada se estes dois critérios forem cumpridos.

Tabela 26. Critérios de identificação dos compostos.

| FQ | TR (min.) | Razão dos iões |
|-----|-------------|----------------|
| ENR | 1,74 ± 0,98 | 2,73 ± 16,6 |
| NOR | 1,58 ± 1,61 | 3,52 ± 7,35 |
| CIP | 1,69 ± 0,88 | 1,03 ± 6,68 |
| DIF | 2,02 ± 1,38 | 3,01 ± 20,3 |
| SAR | 2,25 ± 0,94 | 14,5 ± 18,8 |

6.6 Quantificação das Amostras

Em primeiro lugar é importante referir que sempre que uma amostra foi analisada foi também realizada uma calibração com os respetivos padrões controlo (ao nível do LQ – 12,5 µg/kg – e ao nível intermédio – 100 µg/kg), submetidos a todo o processo tal como as amostras, para ser possível validar os resultados obtidos. A partir das amostras analisadas verifica-se que a amostra de lama é a única que contém vestígios de FQs. Nesta amostra só foi possível quantificar 3 das FQs em estudo uma vez que foi a única amostra e os únicos compostos com concentrações acima do LD. Na tabela 27 são apresentados os resultados obtidos na sequência da quantificação das amostras onde se verifica que é possível encontrar vestígios de ENR ao nível do 2º padrão (valores muito aproximados a 25 µg/kg), e também

NOR e CIP acima do último padrão (um valor médio de 293 µg/kg e 1922 µg/kg, respetivamente). Os respetivos cromatogramas encontram-se no anexo B.3 onde se comprova o aparecimento dos picos referentes à ENR, NOR e CIP. A partir dos valores de TR e *ion ratio* apresentados na tabela 28 confirma-se a presença destes compostos uma vez que cumprem os critérios de identificação definidos na tabela 26. Verifica-se ainda pelos valores apresentados na tabela 27 e pelos cromatogramas que se encontram no anexo B.3 que os compostos quantificados são, muito provavelmente, eliminados mais à frente no processo de tratamento das lamas uma vez que o fertilizante produzido a partir destas não apresenta quaisquer dos compostos em questão.

Tabela 27. Concentração de FQs (em µg/kg) determinada nas amostras de solo, lama e fertilizante analisadas.

| Amostras | ENR | NOR | CIP | DIF | SAR |
|----------------|-------|-------|--------|-----|-----|
| Solo 1 | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD |
| Solo 2 | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD |
| Solo 3 | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD |
| Lama 1 | 24,32 | 296,7 | 1919,8 | <LD | <LD |
| Lama 2 | 25,36 | 292,8 | 1929,5 | <LD | <LD |
| Lama 3 | 22,54 | 290,8 | 1915,7 | <LD | <LD |
| Fertilizante 1 | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD |
| Fertilizante 2 | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD |
| Fertilizante 3 | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD |

Tabela 28. Apresentação dos valores de TR e *ion ratio* obtidos para os compostos encontrados nas amostras de lama.

| Amostra | Critério | ENR | NOR | CIP |
|---------|------------------|-------|-------|-------|
| Lama 1 | TR (min.) | 1,59 | 1,44 | 1,53 |
| | <i>ion ratio</i> | 1,032 | 4,106 | 0,974 |
| Lama 2 | TR (min.) | 1,58 | 1,43 | 1,52 |
| | <i>ion ratio</i> | 0,33 | 4,105 | 1,021 |
| Lama 3 | TR (min.) | 1,56 | 1,43 | 1,51 |
| | <i>ion ratio</i> | 0,537 | 4,086 | 1,024 |

CAPÍTULO 7.

Conclusões

7.1 Conclusões Gerais

O método desenvolvido permitiu a realização de um trabalho que abrange problemas da atualidade, ainda pouco estudados e que merecem, por isso, a maior atenção por parte da comunidade científica. Para tal, foram usados equipamentos com poucos anos de comercialização e de elevada tecnologia.

As condições definidas para a análise por UPLC-MS/MS já estabelecidas na rotina do laboratório demonstraram ser adequadas ao presente estudo, resultando numa boa separação dos compostos e obtenção de picos bem definidos. As condições foram então mantidas: MeOH e HCOOH 10 mM como fases móveis seguindo o gradiente definido durante 13 min., e a deteção por MS foi efetuada com a ionização em modo positivo para todos os compostos.

Os parâmetros que mais influenciam a eficiência da extração foram cuidadosamente otimizados e concluiu-se que se obtinha uma melhor extração por ASE das FQs com uma mistura de H₃PO₄ 50 mM/ACN (1:1), a 65 °C ao longo de 6 ciclos de 3 min. cada.

Uma vez que os extratos obtidos apresentam coloração e particulado em suspensão, foi necessário introduzir uma etapa de *clean-up* por SPE. Após alguns testes verificou-se que os melhores resultados eram obtidos quando se utilizavam cartuchos HLB e se diluíam as amostras 25x. Para um aumento do sinal obtido, foi ainda necessário concentrar os analitos 10x. A introdução do *clean-up* demonstrou aumentar os limites de deteção e de quantificação, tendo a grande vantagem de permitir obter extratos mais limpos, prolongando o tempo de vida do UPLC e ainda melhorando a qualidade dos cromatogramas.

As calibrações realizadas demonstraram que a gama de trabalho se adequa à determinação de FQs e que é possível obter coeficientes de correlação satisfatórios superiores a 0,990 demonstrando uma boa linearidade para os 5 compostos alvo.

Durante a validação do método foram calculados os limiares analíticos e, apesar de não haver legislação para a presença de FQs em biosólidos, verifica-se que os limites obtidos são baixos comparativamente com outras publicações. Tendo em conta os resultados obtidos para a repetibilidade e precisão intermédia pode-se concluir que o método desenvolvido é um método preciso, já que os desvios associados aos dois parâmetros referidos são inferiores a 25 %.

Em relação à quantificação das amostras, foram apenas quantificados 3 dos compostos, ENR, NOR e CIP, numa amostra de lama analisada em triplicado com uma concentração média de 24,07 µg/kg, 293,4 µg/kg e 1922 µg/kg, respetivamente. Verifica-se também que a ENR aparece em menor quantidade e que a DIF e SAR não são sequer detetadas, o que se poderá dever ao facto de serem FQs de utilização veterinária que, como referido no capítulo 2, têm uma via de entrada no ambiente ligeiramente diferente das FQs utilizadas na medicina humana, como é o caso da NOR e da CIP. A elevada concentração de CIP encontrada nas lamas corrobora o facto de ser uma das FQs mais prescritas na medicina humana. Nas restantes amostras, a presença dos compostos alvo não foi detetada uma vez que os resultados obtidos foram inferiores ao LQ. Verifica-se então que o método desenvolvido é capaz de detetar FQs em amostras sólidas, em particular nas lamas de ETARs.

Pode-se ainda concluir que ao se encontrar 3 FQs nas lamas numa quantidade suscetível de criar microrganismos resistentes aos compostos em estudo, estas apresentam um risco ambiental uma vez que os compostos não são eliminados antes da sua aplicação em solos. Portanto, a eliminação destes compostos pelas estações de tratamento não é eficaz.

Apesar das amostras de lamas terem apresentado alguns dos compostos alvo quantificáveis, estes não foram detetados nas amostras de fertilizante produzido a partir das lamas. Isto poderá ter a ver com o procedimento de compostagem utilizado no qual se adicionam grandes quantidades de serrim às lamas, diluindo significativamente a concentração dos compostos impedindo a sua quantificação.

Com o método desenvolvido foi ainda possível conseguir algumas melhorias em relação ao que se encontra descrito na literatura. Para a extração de FQs em amostras ambientais é muito comum utilizar-se o SPE, mas pretendeu-se melhorar as condições de extração utilizando a ASE, sendo esta uma técnica mais recente que tem apresentado resultados igualmente satisfatórios. Esta requer menores custos, quando comparada com os métodos de extração tradicionais, pois utiliza menores quantidades de solvente e permite também extrações mais rápidas. O SPE foi também utilizado mas apenas como ferramenta de *clean-up* apresentando claras vantagens em termos de sinal comparativamente com os casos em que não é utilizado.

Em relação a métodos já reportados utilizando a ASE na extração de FQs em lamas de ETARs, verifica-se que o método desenvolvido no presente trabalho utiliza uma temperatura

mais baixa que o usual (65 °C, quando o mais comum é 100 °C) podendo facilitar a preservação das células de extração. O método descrito utiliza ainda um tempo estático inferior aos mais comuns (3 min., quando o mais usual é acima de 5 min.), diminuindo assim o tempo de cada ciclo. Apesar de se utilizar um maior número de ciclos, como o tempo de cada um é inferior, o tempo total da extração continua a ser inferior ao mais usual. Outra grande diferença em relação ao que se encontra reportado, é o facto de se utilizar células de menor capacidade (5 mL) diminuindo assim o volume de solvente gasto durante as extrações.

Por fim, o método desenvolvido tem a grande vantagem de utilizar o UPLC-MS/MS na análise cromatográfica tendo em conta que é um avanço recente da cromatografia líquida e faz frente ao LC-MS/MS habitualmente utilizado nestes estudos.

Em suma, o trabalho desenvolvido permitiu a obtenção de um método analítico para a extração de FQs em lamas de ETARs que demonstrou ser seletivo, uma vez que consegue identificar os compostos alvo distinguindo-os dos restantes, preciso e robusto.

7.2 Perspetivas Futuras

Após terminar este trabalho verifica-se que existem alguns pormenores que poderiam ser melhorados e estudados com maior detalhe. Seria proveitoso começar por aumentar a abrangência do estudo direcionando-o para ETARs localizadas noutros locais com modelos de processo de tratamento diferentes, sendo possível verificar se existem alguns que demonstram ser mais eficazes na eliminação de FQs.

Para diminuir as perdas que se verificam, resultantes das inúmeras etapas que o método desenvolvido contém, poder-se-ia também realizar uma investigação mais aprofundada sobre métodos de *clean-up* na própria célula de extração (*in-cell*). Assim, seria também possível eliminar o tempo e os custos despendidos no *clean-up* por SPE, sendo apenas necessário encontrar um adsorvente eficaz na remoção dos interferentes que seria adicionado no fundo da célula de extração.

Assim, parece possível concluir-se que este trabalho abre novas perspetivas no estudo de uma matriz tão complexa e que tantos problemas coloca a qualquer analista que se preocupa com a qualidade do trabalho desenvolvido.

CAPÍTULO 8.

Referências Bibliográficas

1. Dorival-Garcia, N., et al., *Analysis of quinolone antibiotic derivatives in sewage sludge samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: comparison of the efficiency of three extraction techniques*. Talanta, 2013. **106**: p. 104-118.
2. Peysson, W., et al., *Determination of 136 pharmaceuticals and hormones in sewage sludge using quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction followed by analysis with liquid chromatography-time-of-flight-mass spectrometry*. J Chromatogr A, 2013. **1290**: p. 46-61.
3. Sonune, A., et al., *Developments in wastewater treatment methods*. Desalination, 2004. **167**(0): p. 55-63.
4. Bitton, G., *Wastewater Microbiology*. 3ª Edição. 2005, New Jersey: John Wiley & Sons.
5. Petrie, B., et al., *Fate of drugs during wastewater treatment*. TrAC, 2013. **49**(0): p. 145-159.
6. Deblonde, T., et al., *Emerging pollutants in wastewater: a review of the literature*. Int J Hyg Environ Health, 2011. **214**(6): p. 442-448.
7. NORMAN, *Lista de substâncias emergentes*. Acedido a 03 de maio de 2014. Disponível em: <http://www.norman-network.net/?q=node/81>.
8. Jelic, A., et al., *Occurrence, partition and removal of pharmaceuticals in sewage water and sludge during wastewater treatment*. Water Res, 2011. **45**(3): p. 1165-1176.
9. Okuda, T., et al., *Development of extraction method of pharmaceuticals and their occurrences found in Japanese wastewater treatment plants*. Environ Int, 2009. **35**(5): p. 815-820.
10. Senta, I., et al., *Removal of antimicrobials using advanced wastewater treatment*. J Hazard Mater, 2011. **192**(1): p. 319-328.
11. Jelic, A., et al., *Multi-residue method for trace level determination of pharmaceuticals in solid samples using pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry*. Talanta, 2009. **80**(1): p. 363-371.
12. Manzetti, S., et al., *The environmental release and fate of antibiotics*. Mar Pollut Bull, 2014. **79**(1-2): p. 7-15.
13. Gilman, A. G., *Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da Terapêutica*. 10ª Edição. 2003, New York: McGraw-Hill.
14. Yu, H., et al., *Simultaneous determination of fluoroquinolones in foods of animal origin by a high performance liquid chromatography and a liquid chromatography tandem mass spectrometry with accelerated solvent extraction*. J Chromatogr B, 2012. **885-886**: p. 150-159.
15. Dorival-Garcia, N., et al., *Removal of quinolone antibiotics from wastewaters by sorption and biological degradation in laboratory-scale membrane bioreactors*. Sci Total Environ, 2013. **442**: p. 317-328.
16. Jia, A., et al., *Occurrence and fate of quinolone and fluoroquinolone antibiotics in a municipal sewage treatment plant*. Water Res, 2012. **46**(2): p. 387-394.
17. Speltini, A., et al., *Fluoroquinolone antibiotics in environmental waters: sample preparation and determination*. J Sep Sci, 2010. **33**(8): p. 1115-1131.
18. Golet, E.M., et al., *Trace Determination of Fluoroquinolone Antibacterial Agents in Urban Wastewater by Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography with Fluorescence Detection*. Anal Chem, 2001. **73**(15): p. 3632-3638.

19. Dorival-García, N., et al., *Removal and degradation characteristics of quinolone antibiotics in laboratory-scale activated sludge reactors under aerobic, nitrifying and anoxic conditions*. J Environ Manage, 2013. **120**(0): p. 75-83.
20. INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, *Prontuário Terapêutico - 11*. Acedido a 13 de outubro de 2013. Disponível em: <http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/PUBLICACOES/PRONTUARIO>
21. Patrick, G.L., *An Introduction to Medicinal Chemistry*. 4ª Edição. 2009, Oxford: Oxford University Press.
22. Turiel, E., et al., *Trace enrichment of (fluoro)quinolone antibiotics in surface waters by solid-phase extraction and their determination by liquid chromatography–ultraviolet detection*. J Chromatogr A, 2003. **1008**(2): p. 145-155.
23. Bryskier, A., *Antimicrobials Agents: Antibacterial and antifungals*. 2005, Washington: ASM Press.
24. Speltini, A., et al., *Analytical methods for the determination of fluoroquinolones in solid environmental matrices*. TrAC, 2011. **30**(8): p. 1337-1350.
25. Van Doorslaer, X., et al., *Fluoroquinolone antibiotics: An emerging class of environmental micropollutants*. Sci Total Environ, 2014. **500-501C**: p. 250-269.
26. Premasis Sukul, M.S., *Fluoroquinolone antibiotics in the environment*. Rev Environ Contam Toxicol, 2007(191): p. 131-162.
27. Xiao, Y., et al., *Trace analysis of quinolone and fluoroquinolone antibiotics from wastewaters by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry*. J Chromatogr A, 2008. **1214**(1-2): p. 100-108.
28. Johnson, G., et al., *A generic approach for the HPLC separation of quinolone antibiotics*. Chromatographia, 2002. **55**(1): p. S127-S131.
29. Andreu, V., et al., *Analytical strategies to determine quinolone residues in food and the environment*. TrAC, 2007. **26**(6): p. 534-556.
30. Prat, M.D., et al., *Determination of quinolones in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography with fluorimetric detection*. J Chromatogr A, 2004. **1041**(1-2): p. 27-33.
31. European Centre for Disease Prevention and Control, *Surveillance of antimicrobial consumption in Europe 2012*. 2014, Stockholm: ECDC.
32. Nakata, H., et al., *Determination of fluoroquinolone antibiotics in wastewater effluents by liquid chromatography-mass spectrometry and fluorescence detection*. Chemosphere, 2005. **58**(6): p. 759-766.
33. Dorival-García, N., et al., *Simultaneous determination of 13 quinolone antibiotic derivatives in wastewater samples using solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. Microchem J, 2013. **106**(0): p. 323-333.
34. Pico, Y., et al., *Fluoroquinolones in soil - risks and challenges*. Anal Bioanal Chem, 2007. **387**(4): p. 1287-1299.
35. INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, *Consulta de Medicamentos*. Acedido a 20 de setembro de 2014. Disponível em: <http://www.infarmed.pt/genericos/pesquisamg/pesquisaMG.php>.
36. Santa Cruz Biotechnology, *ChemCruz Biochemicals*. Acedido a 20 de setembro de 2014. Disponível em: http://www.scbt.com/chapter_chemicals.html.

37. World Health Organization, *Essential Drugs Monitor*, 28&29, 2000. Acedido a 23 de setembro de 2013. Disponível em: <http://apps.who.int/medicinedocs/collect/medicinedocs/pdf/s2248e/s2248e.pdf?ua=1>.
38. World Health Organization, *World health day - 7 April 2011*. Acedido a 23 de setembro de 2013. Disponível em: www.who.int/world-health-day/2011/en/index.html.
39. Ding, Y., et al., *Determination of pharmaceuticals in biosolids using accelerated solvent extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. J Chromatogr A, 2011. **1218**(1): p. 10-16.
40. Direção-Geral da Saúde, *Dia Europeu do Antibiótico 2013*. Acedido a 03 de maio de 2014. Disponível em: <http://www.dgs.pt/em-destaque/dia-europeu-do-antibiotico-2013.aspx>.
41. INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, *Programa Nacional de Prevenção das Resistências aos Antimicrobianos*. Acedido a 23 de setembro de 2013. Disponível em: http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/MONITORIZACAO_DO_MERCADO/OBSERVATORIO/Programa_Nacional_Prevencao_Resistencia.
42. World Health Organization, *Relatório Resistência Antimicrobiana*. Acedido a 26 de setembro de 2014. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/en/>.
43. World Health Organization, *Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014*. Acedido a 15 de junho de 2014. Disponível em: <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>.
44. European Medicines Agency - European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption, *Sales of veterinary antimicrobial agents in 25 EU/EEA countries in 2011 (EMA/236501/2013)*. Acedido a 15 de junho de 2014. Disponível em: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2013/10/WC500152311.pdf.
45. Göbel, A., et al., *Extraction and determination of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in sewage sludge*. J Chromatogr A, 2005. **1085**(2): p. 179-189.
46. Li, B., et al., *Rapid analysis of 21 antibiotics of multiple classes in municipal wastewater using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Anal Chim Acta, 2009. **645**(1-2): p. 64-72.
47. Montesdeoca-Esponda, S., et al., *Combination of microwave-assisted micellar extraction with liquid chromatography tandem mass spectrometry for the determination of fluoroquinolone antibiotics in coastal marine sediments and sewage sludges samples*. Biomed Chromatogr, 2012. **26**(1): p. 33-40.
48. Chenxi, W., et al., *Determination of the persistence of pharmaceuticals in biosolids using liquid-chromatography tandem mass spectrometry*. Chemosphere, 2008. **73**(4): p. 511-518.
49. Radjenović, J., et al., *Determination of pharmaceuticals in sewage sludge by pressurized liquid extraction (PLE) coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)*. Anal Bioanal Chem, 2009. **393**(6-7): p. 1685-1695.
50. Mompelat, S., et al., *Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water*. Environ Int, 2009. **35**(5): p. 803-814.

51. Lillenberg, M., et al., *Simultaneous determination of fluoroquinolones, sulfonamides and tetracyclines in sewage sludge by pressurized liquid extraction and liquid chromatography electrospray ionization-mass spectrometry*. J Chromatogr A, 2009. **1216**(32): p. 5949-5954.
52. Li, B., et al., *Biodegradation and Adsorption of Antibiotics in the Activated Sludge Process*. Environ Sci Technol, 2010. **44**(9): p. 3468-3473.
53. Golet, E.M., et al., *Determination of Fluoroquinolone Antibacterial Agents in Sewage Sludge and Sludge-Treated Soil Using Accelerated Solvent Extraction Followed by Solid-Phase Extraction*. Anal Chem, 2002. **74**(21): p. 5455-5462.
54. Giger, W., et al., *Occurrence and fate of antibiotics as trace contaminants in wastewaters, sewage sludges, and surface waters*. Chimia, 2003. **57**(9): p. 485-491.
55. *Decreto-Lei nº 276/2009 de 2 de outubro. Diário da República nº 192 - 1.ª Série.*
56. Zuloaga, O., et al., *Overview of extraction, clean-up and detection techniques for the determination of organic pollutants in sewage sludge: A review*. Anal Chim Acta, 2012. **736**(0): p. 7-29.
57. Gao, F., et al., *Optimal extraction and fingerprint analysis of Cnidii fructus by accelerated solvent extraction and high performance liquid chromatographic analysis with photodiode array and mass spectrometry detections*. Food Chem, 2013. **141**(3): p. 1962-1971.
58. Liao, Q.G., et al., *Applicability of accelerated solvent extraction for synthetic colorants analysis in meat products with ultrahigh performance liquid chromatography–photodiode array detection*. Anal Chim Acta, 2012. **716**(0): p. 128-132.
59. Sun, H., et al., *Application of accelerated solvent extraction in the analysis of organic contaminants, bioactive and nutritional compounds in food and feed*. J Chromatogr A, 2012. **1237**(0): p. 1-23.
60. Gong, J., et al., *Sequential ASE extraction of alkylphenols from sediments: Occurrence and environmental implications*. J Hazard Mater, 2011. **192**(2): p. 643-650.
61. Giergielewska-Możajska, H., et al., *Accelerated Solvent Extraction (ASE) in the Analysis of Environmental Solid Samples — Some Aspects of Theory and Practice*. Crit Rev Anal Chem, 2001. **31**(3): p. 149-165.
62. Kim, B., et al., *Applicability of Pressurized Liquid Extraction for Melamine Analysis in Pet Foods with High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection*. Food Anal Method, 2010. **3**(3): p. 188-194.
63. Richter, B.E., et al., *Accelerated Solvent Extraction: A Technique for Sample Preparation*. Anal Chem, 1996. **68**(6): p. 1033-1039.
64. Ramos, L., et al., *Current use of pressurised liquid extraction and subcritical water extraction in environmental analysis*. J Chromatogr A, 2002. **975**(1): p. 3-29.
65. Nieto, A., et al., *Pressurized liquid extraction: A useful technique to extract pharmaceuticals and personal-care products from sewage sludge*. TrAC, 2010. **29**(7): p. 752-764.
66. Carabias-Martínez, R., et al., *Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples*. J Chromatogr A, 2005. **1089**(1–2): p. 1-17.
67. Díaz-Cruz, M.S., et al., *Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge*. TrAC, 2003. **22**(6): p. 340-351.
68. Herrero, P., et al., *Determination of polyether ionophores in urban sewage sludge by pressurised liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry: Study of different clean-up strategies*. J Chromatogr A, 2013. **1285**(0): p. 31-39.

69. Wen, Y., et al., *Recent advances in solid-phase sorbents for sample preparation prior to chromatographic analysis*. TrAC, 2014. **59**(0): p. 26-41.
70. Bielicka-Daszkiwicz, K., et al., *Theoretical and experimental methods of determination of the breakthrough volume of SPE sorbents*. Talanta, 2009. **80**(2): p. 614-621.
71. Arsenault, J.C., *Begginer's guide to SPE (solid-phase extraction)*. 2012, Milford:Waters Corporation.
72. Poole, C.F., et al., *New trends in solid-phase extraction*. TrAC, 2003. **22**(6): p. 362-373.
73. Smith, R.M., et al., *Before the injection—modern methods of sample preparation for separation techniques*. J Chromatogr A, 2003. **1000**(1–2): p. 3-27.
74. Das, D., et al., *Recent developments in solid phase extraction in elemental speciation of environmental samples with special reference to aqueous solutions*. TrAC, 2012. **38**(0): p. 163-171.
75. Ferdig, M., et al., *Improved liquid chromatographic determination of nine currently used (fluoro)quinolones with fluorescence and mass spectrometric detection for environmental samples*. J Sep Sci, 2005. **28**(13): p. 1448-1456.
76. Skoog, D.A., *Principles of instrumental analysis*. 6ª Edição. 2007, Michigan: Thomson Brooks.
77. Nováková, L., et al., *Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis*. Talanta, 2006. **68**(3): p. 908-918.
78. Harris, D.C., *Quantitative Chemical Analysis*. 5ª Edição. 1999, New York: W. H. Freeman and Company.
79. Skoog, D.A., *Fundamentals of Analytical Chemistry*. 8ª Edição. 2004, London: Brooks Cole.
80. Ahuja, S., *Chromatography and separation science*. Vol. 4. 2003, San Diego: Academic Press.
81. Grumbach, E.S., et al., *Beginners guide to UPLC - Ultra-Performance Liquid Chromatography*. 2012, Milford: Waters Corporation.
82. Shalini, B., et al., *Ultra Performance Liquid Chromatography: A revolutionized LC technique*. IJDRA, 2014. **2**(3): p. 83-87.
83. Swartz, M.E., et al., *Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC): An Introduction*. Separation Science Redefined, 2005: p. 8-14.
84. Wren, S.A.C., et al., *Use of ultra-performance liquid chromatography in pharmaceutical development*. J Chromatogr A, 2006. **1119**(1–2): p. 140-146.
85. Niessen, W.M.A., *Liquid chromatography-mass spectrometry*. 3ª Edição. 2006, Boca Raton: CRC Press.
86. Herbert, C. G., et al., *Mass spectrometry basics*. 2003, Boca Raton: CRC Press.
87. Hoffman, E., *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. 3ª Edição. 2007, West Sussex: John Wiley & Sons.
88. Li, W., et al., *Occurrence, distribution and potential affecting factors of antibiotics in sewage sludge of wastewater treatment plants in China*. Sci Total Environ, 2013. **445-446**(0): p. 306-313.
89. Senta, I., et al., *Occurrence and fate of dissolved and particulate antimicrobials in municipal wastewater treatment*. Water Res, 2013. **47**(2): p. 705-714.
90. ISO 8466 : 1990, *Water quality - calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics*.
91. Eurachem, *The fitness for purpose of analytical methods*. 1998.

Anexos

Anexo A. Desenvolvimento do Método

A.1 Otimização UPLC

A.1.1 Curvas de Calibração

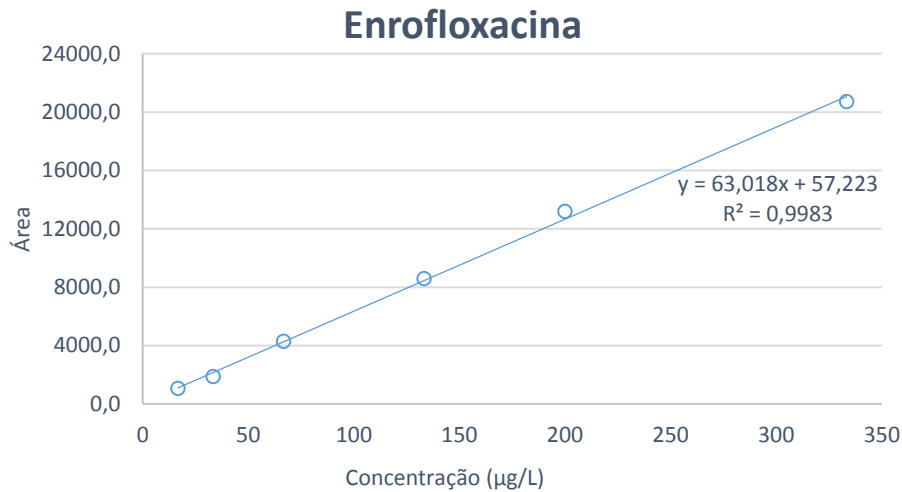


Figura 45. Curva de calibração obtida para a ENR a partir da calibração direta efetuada na otimização do UPLC.

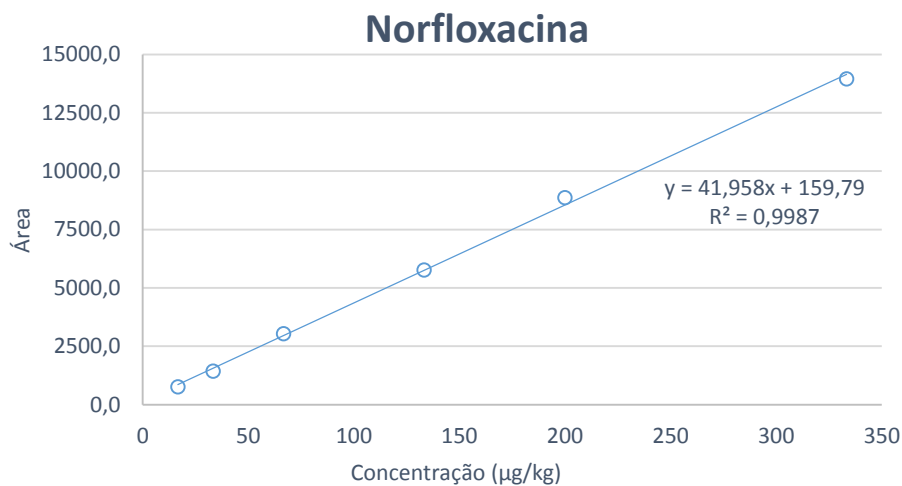


Figura 46. Curva de calibração obtida para a NOR a partir da calibração direta efetuada na otimização do UPLC.

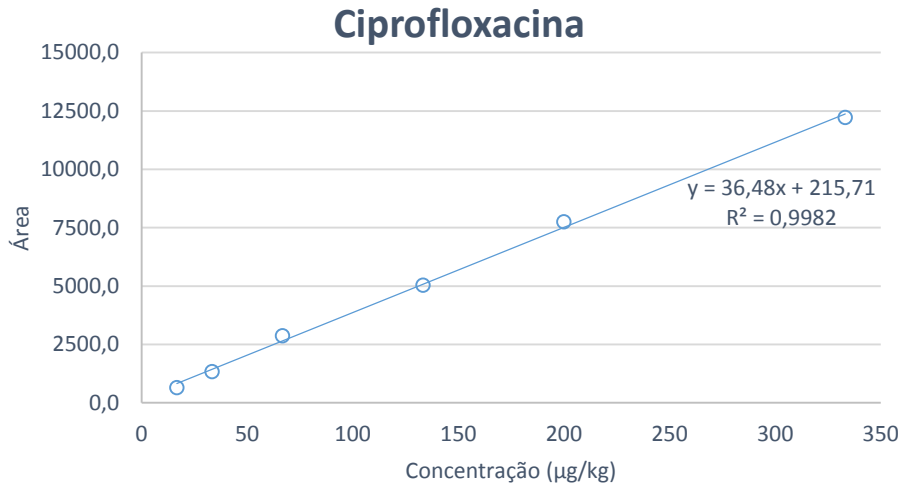


Figura 47. Curva de calibração obtida para a CIP a partir da calibração direta efetuada na otimização do UPLC.

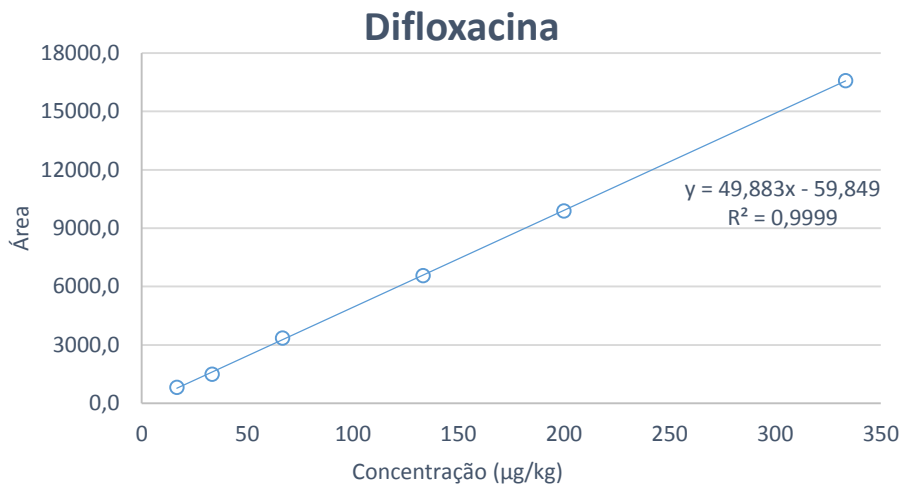


Figura 48. Curva de calibração obtida para a DIF a partir da calibração direta efetuada na otimização do UPLC.

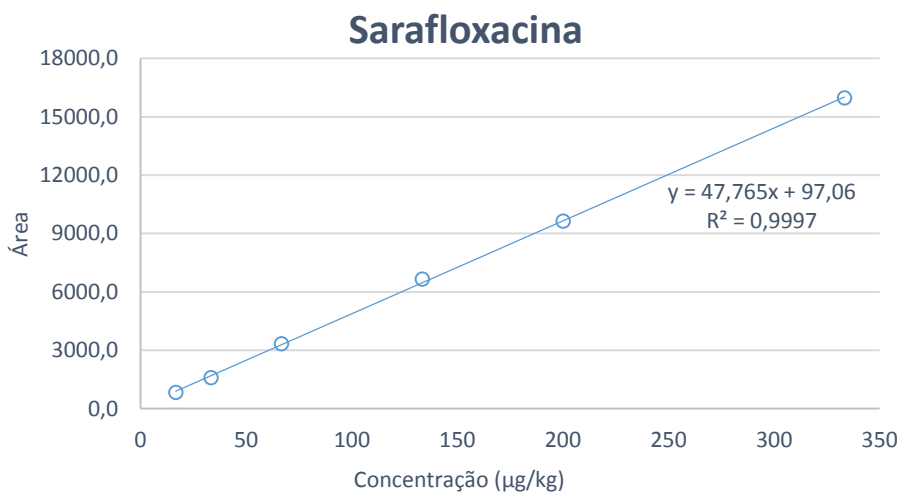


Figura 49. Curva de calibração obtida para a SAR a partir da calibração direta efetuada na otimização do UPLC.

A.1.2 Cromatogramas

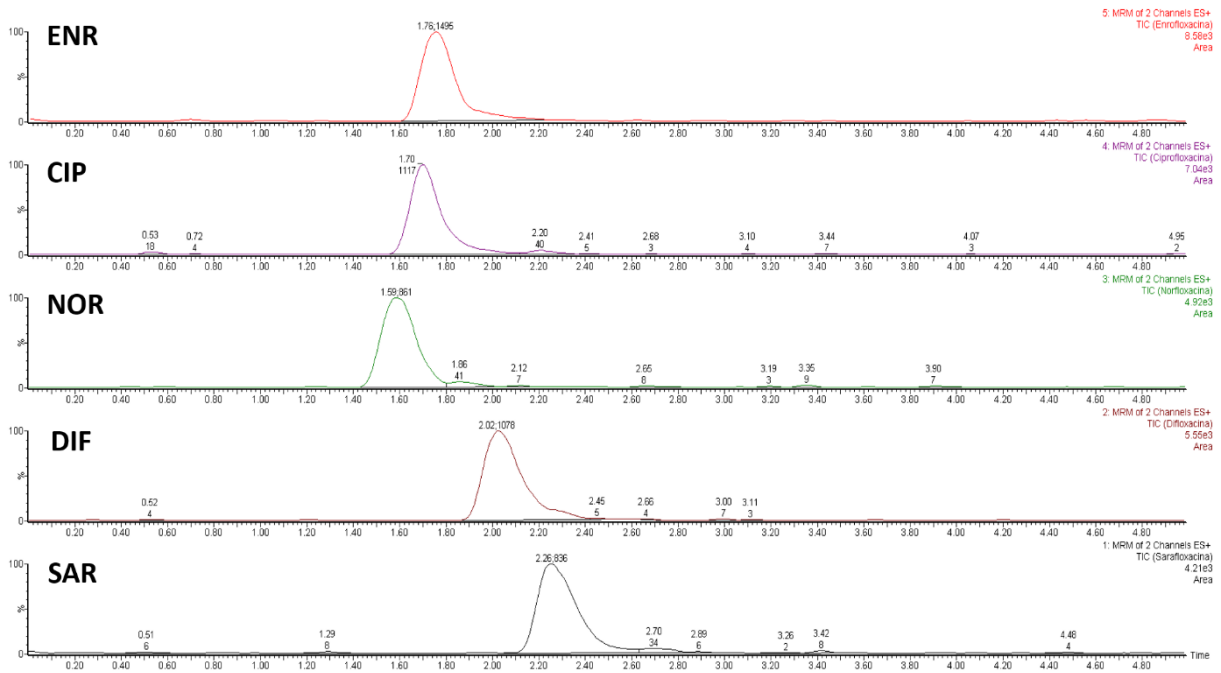


Figura 50. Cromatograma obtido para o P1 resultante da calibração direta.

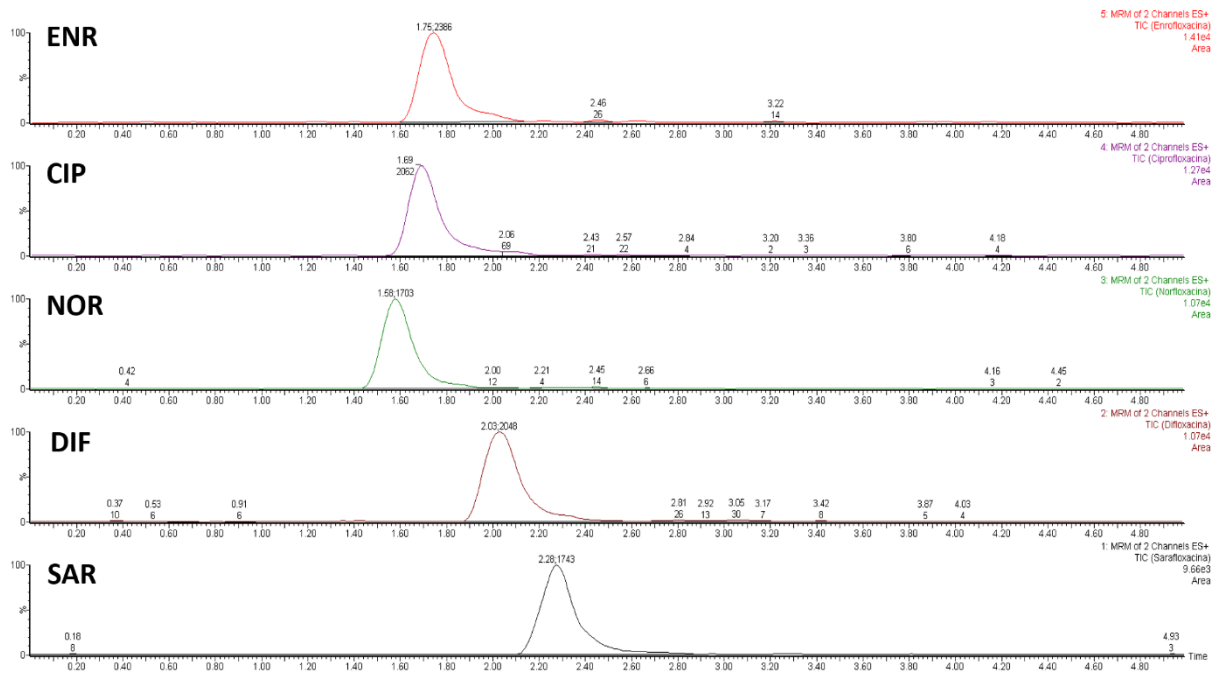


Figura 51. Cromatograma obtido para o P2 resultante da calibração direta.

Anexos

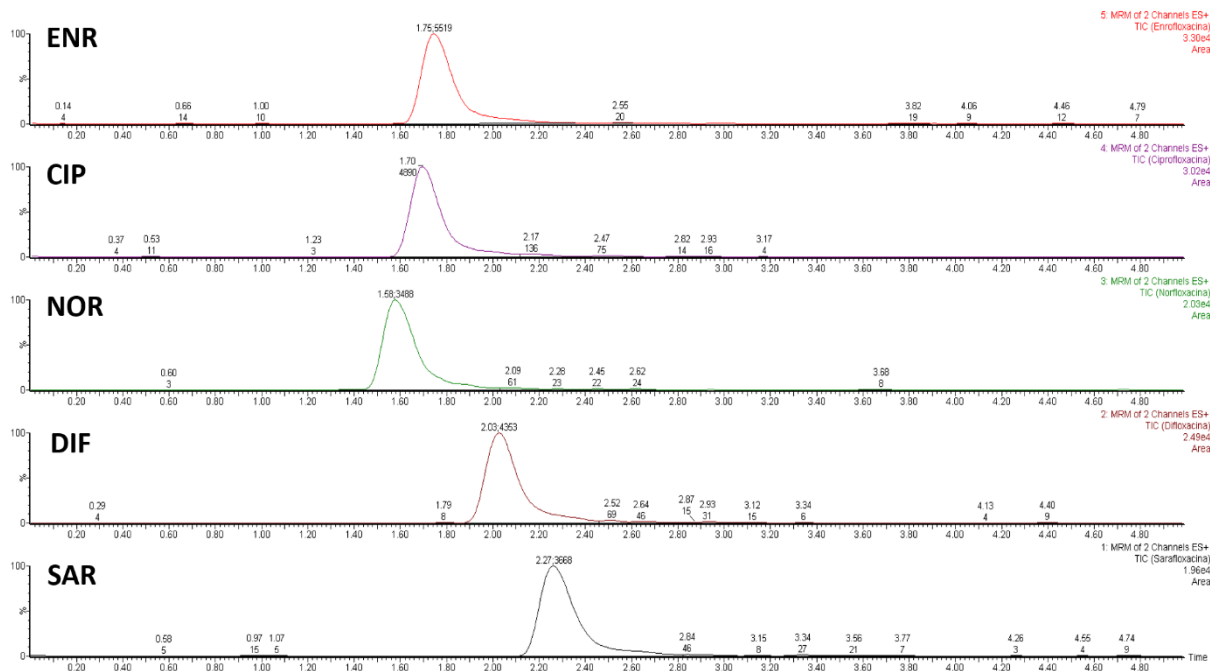


Figura 52. Cromatograma obtido para o P3 resultante da calibração direta.

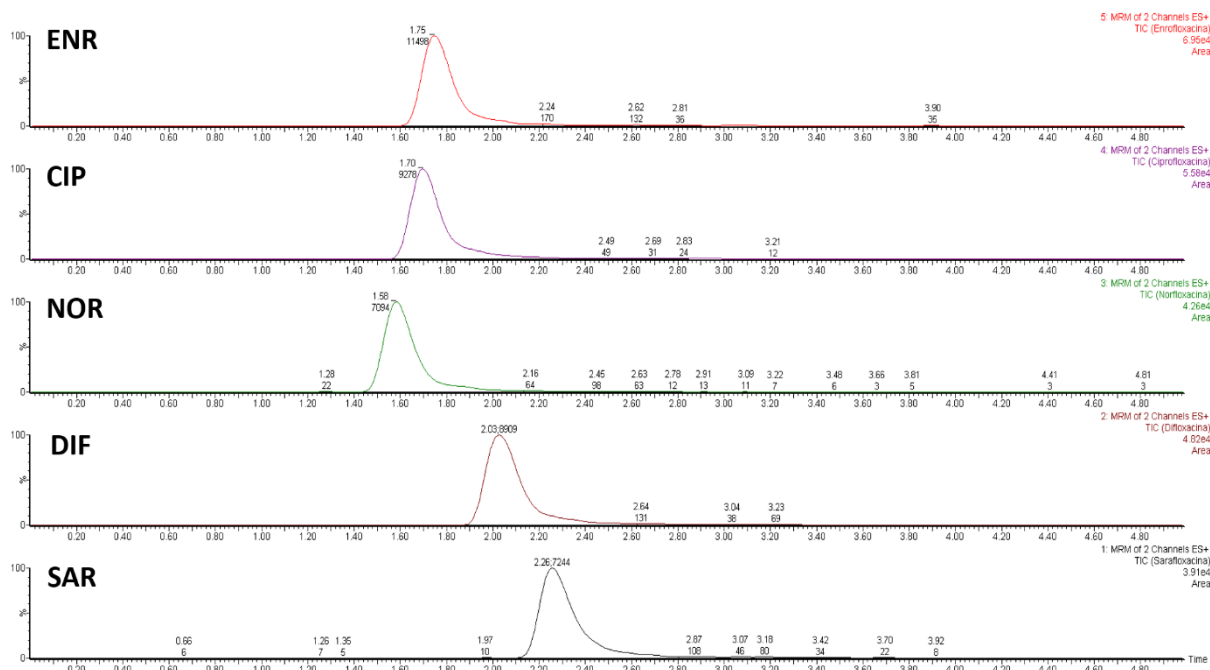


Figura 53. Cromatograma obtido para o P4 resultante da calibração direta.

Anexos

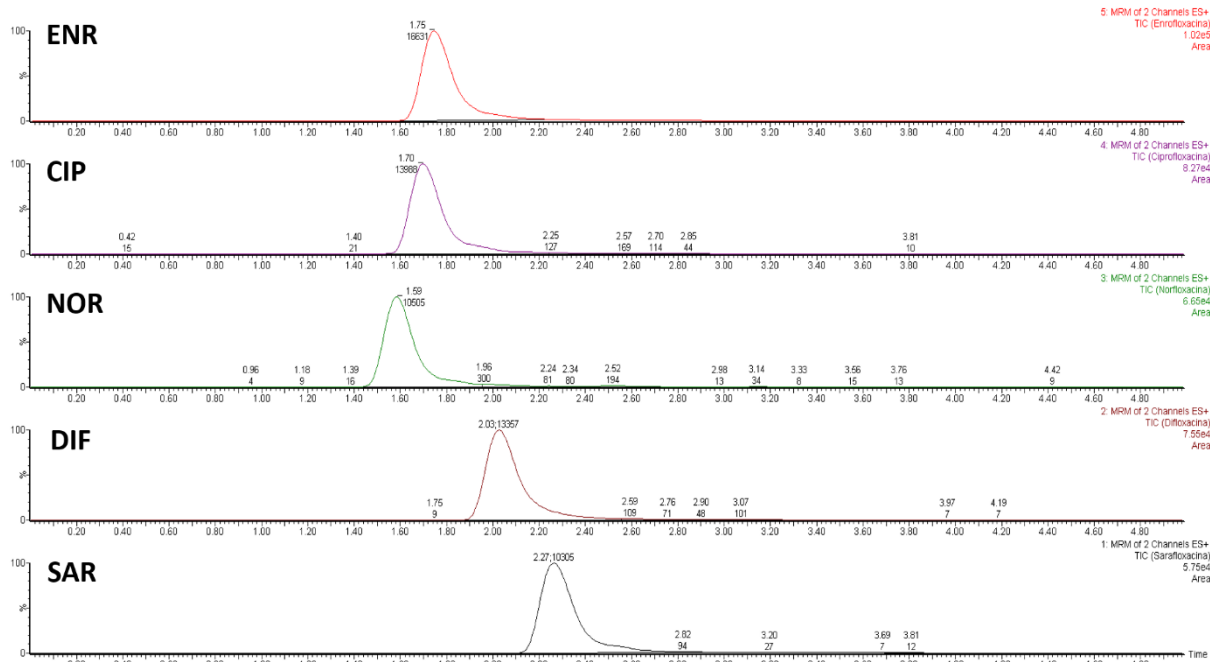


Figura 54. Cromatograma obtido para o P5 resultante da calibração direta.

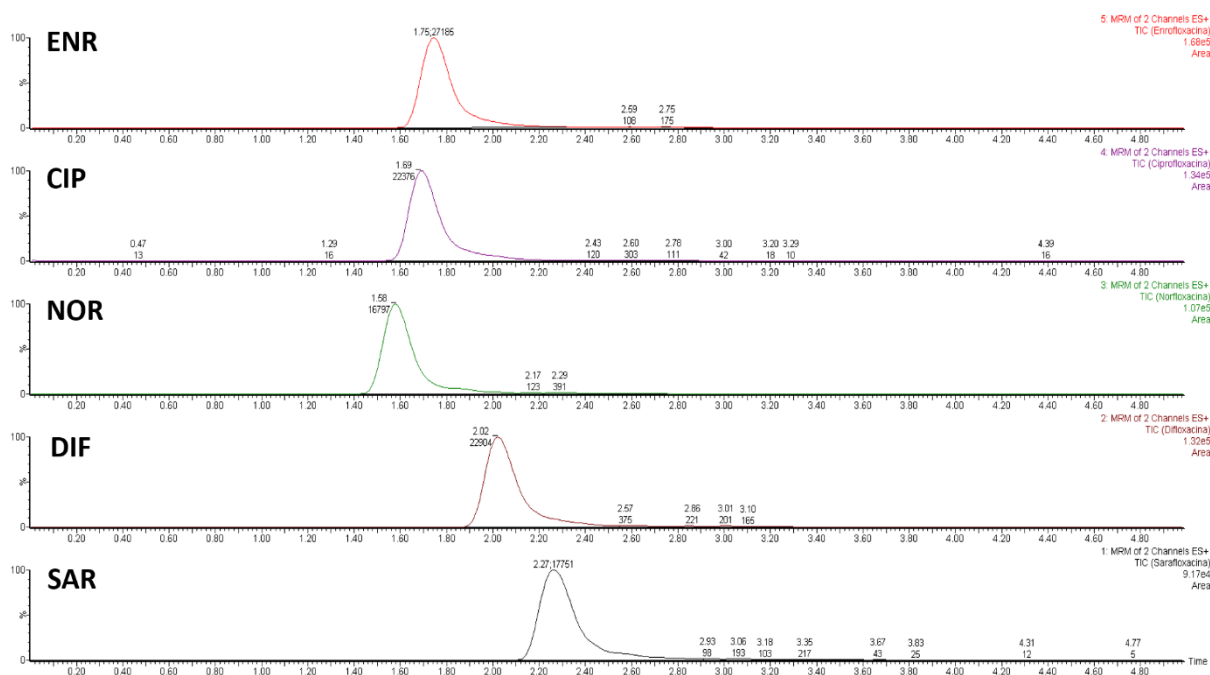


Figura 55. Cromatograma obtido para o P6 resultante da calibração direta.

A.2 Otimização ASE

A.2.1 Solvente Extrator

Tabela 29. Compilação da média das áreas obtidas nas 3 extrações realizadas para os diferentes solventes testados e respectivos DPR.

| Solventes | | ENR | NOR | CIP | DIF | SAR |
|-----------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|
| I | Área | 2522,2 | 1328,8 | 1496,6 | 1770,4 | 1446,6 |
| | DPR (%) | 16,1 | 9,9 | 5,2 | 8,5 | 4,0 |
| II | Área | 383,12 | 35,41 | 46,98 | 46,13 | 47,09 |
| | DPR (%) | 13,5 | 9,8 | 8,1 | 16,7 | 17,2 |
| III | Área | 259,19 | 74,24 | 101,52 | 8,326 | 21,76 |
| | DPR (%) | 3,6 | 12,9 | 17,0 | 53,5 | 21,4 |
| IV | Área | 407,10 | 42,32 | 39,53 | 18,73 | 48,78 |
| | DPR (%) | 3,7 | 22,0 | 14,6 | 22,1 | 13,0 |
| V | Área | 246,19 | 23,56 | 11,87 | 55,17 | 11,81 |
| | DPR (%) | 6,5 | 8,0 | 20,1 | 38,1 | 14,4 |

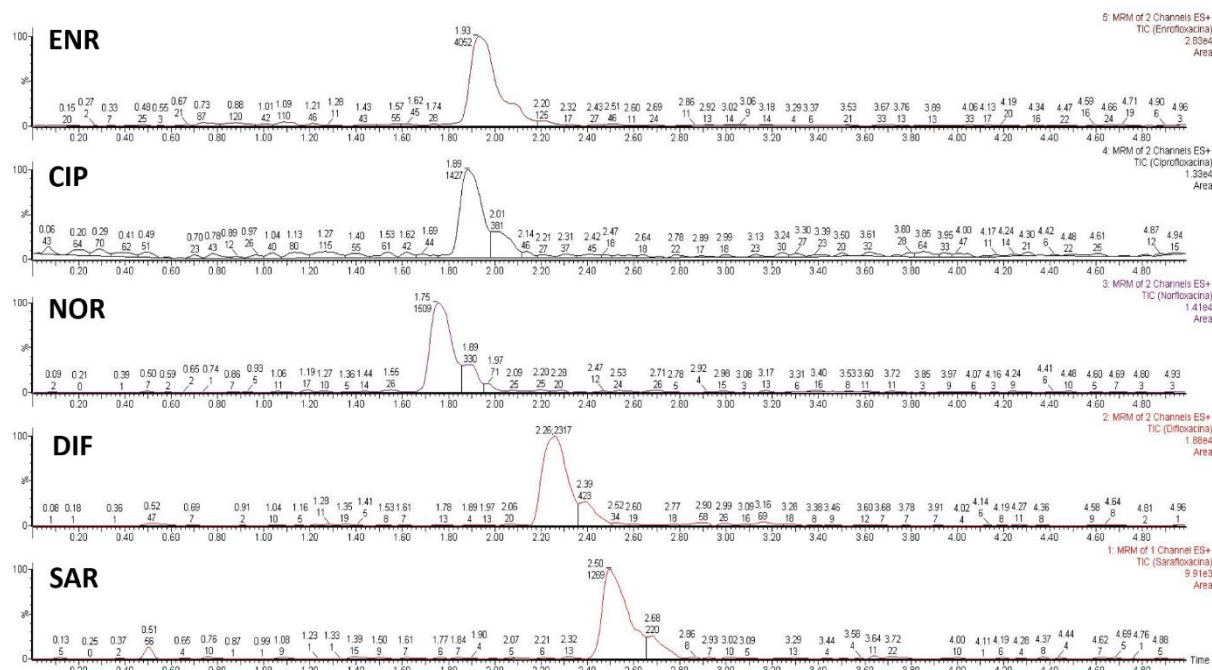


Figura 56. Cromatograma obtido após extração com o solvente I.

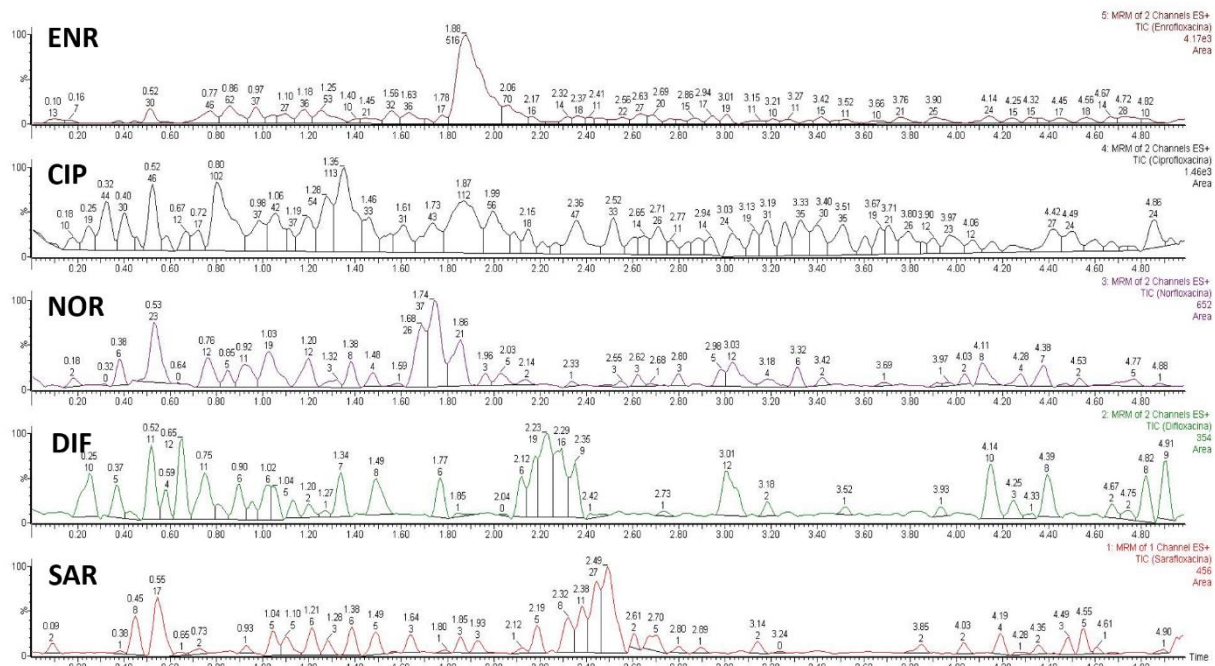


Figura 57. Cromatograma obtido após extração com o solvente II.

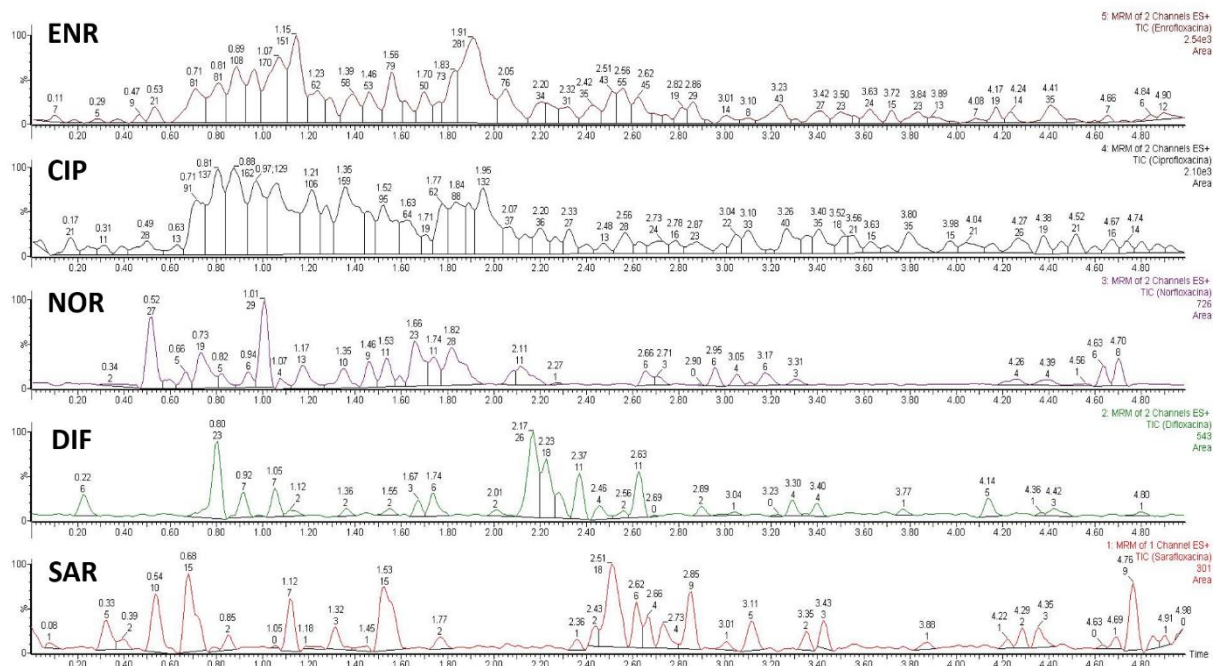


Figura 58. Cromatograma obtido após extração com o solvente III.

Anexos

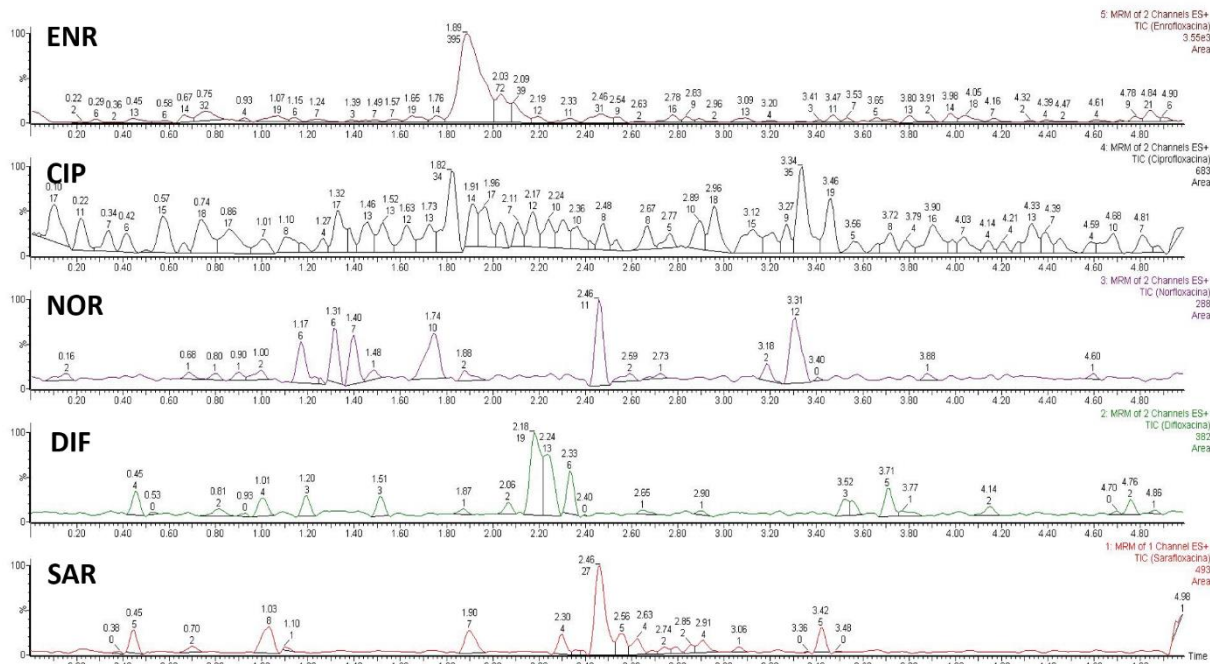


Figura 59. Cromatograma obtido após extração com o solvente IV.

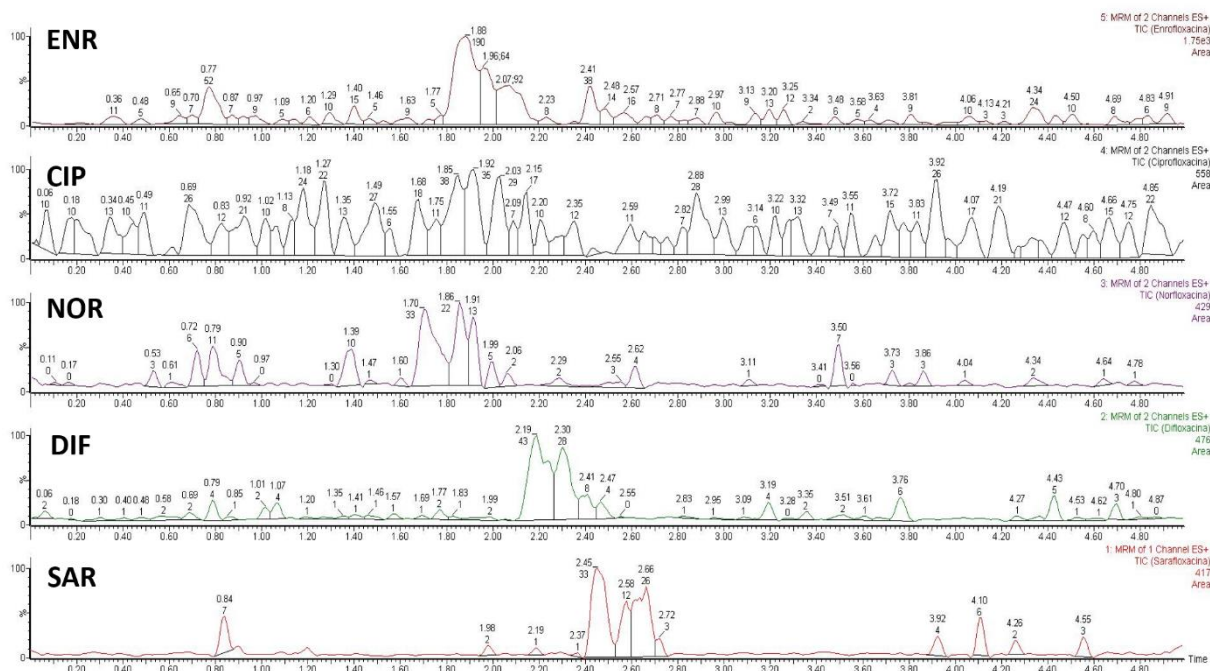


Figura 60. Cromatograma obtido após extração com o solvente V.

A.2.2 Temperatura de Extração

Tabela 30. Compilação da média das áreas obtidas nas 3 extrações realizadas para as diferentes temperaturas testadas e respectivos DPR.

| Temperatura | | ENR | NOR | CIP | DIF | SAR |
|-------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 45 | Área | 23443,6 | 9913,81 | 12271,8 | 22477,5 | 16417,4 |
| | DPR (%) | 1,2 | 1,1 | 1,4 | 4,8 | 2,6 |
| 65 | Área | 25839,1 | 12370,2 | 14948,5 | 21917,7 | 16828,7 |
| | DPR (%) | 1,5 | 1,0 | 2,2 | 2,4 | 2,4 |
| 85 | Área | 16647,6 | 9666,3 | 10148,0 | 16298,9 | 13338,7 |
| | DPR (%) | 1,7 | 1,8 | 0,7 | 2,4 | 2,3 |
| 100 | Área | 13888,6 | 7774,25 | 9093,19 | 10125,8 | 8456,47 |
| | DPR (%) | 12,8 | 13,6 | 12,9 | 13,9 | 12,9 |

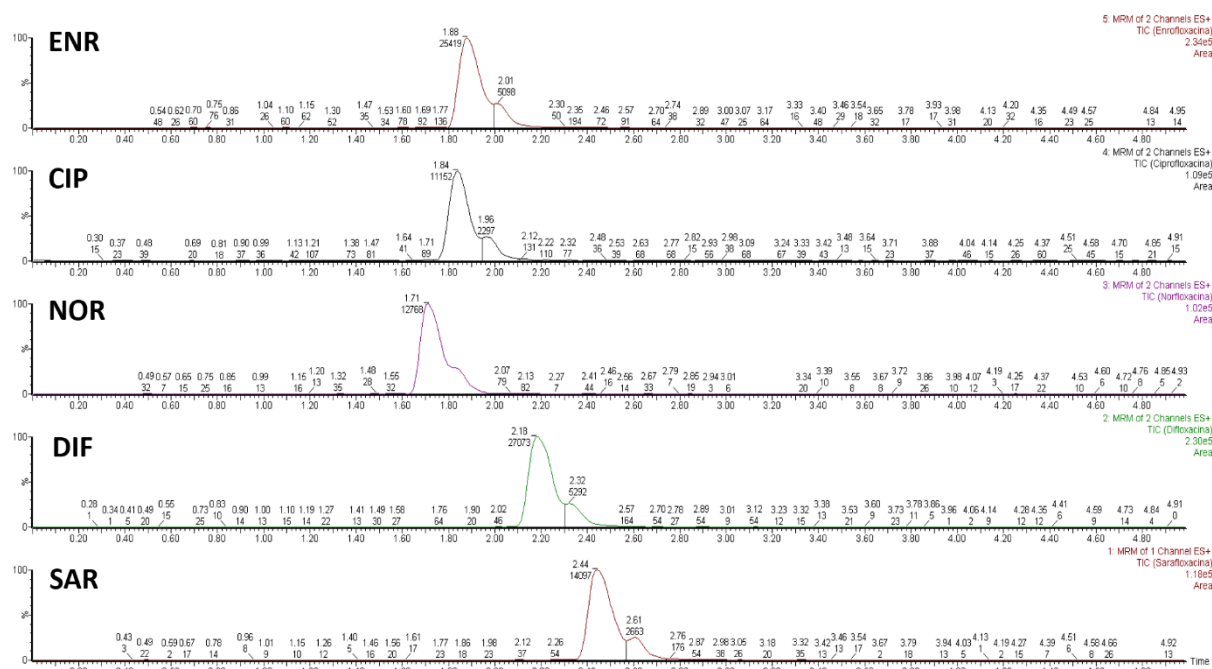


Figura 61. Cromatograma obtido após extração a 45 °C.

Anexos

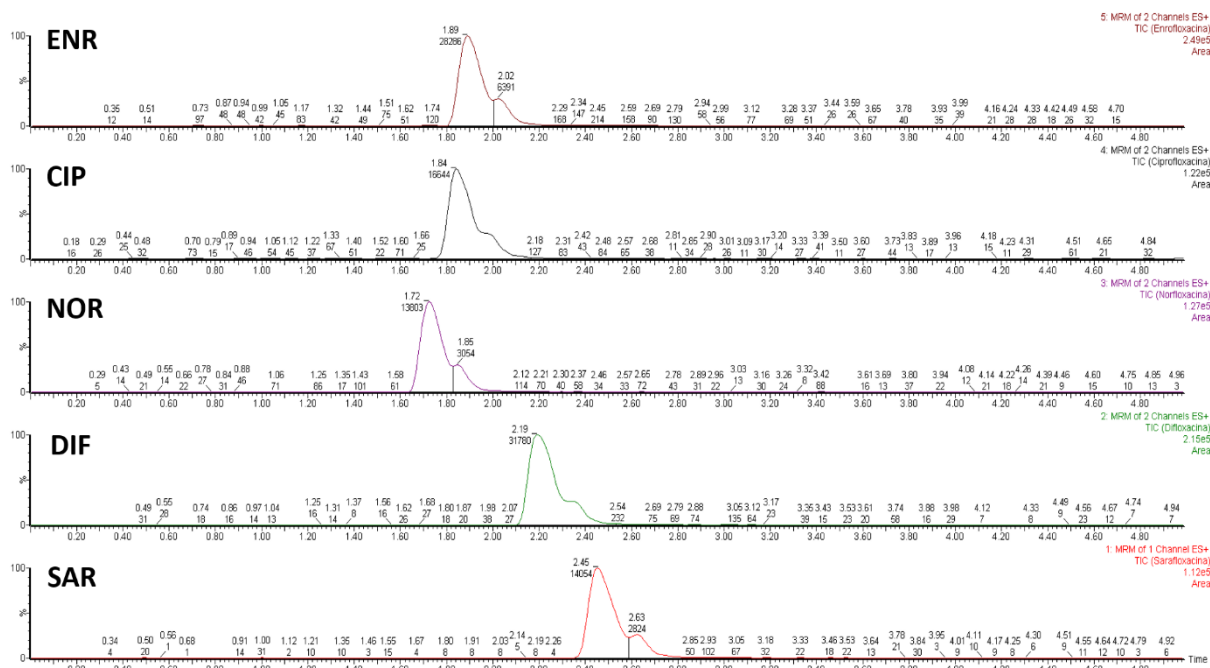


Figura 62. Cromatograma obtido após extração a 65 °C.

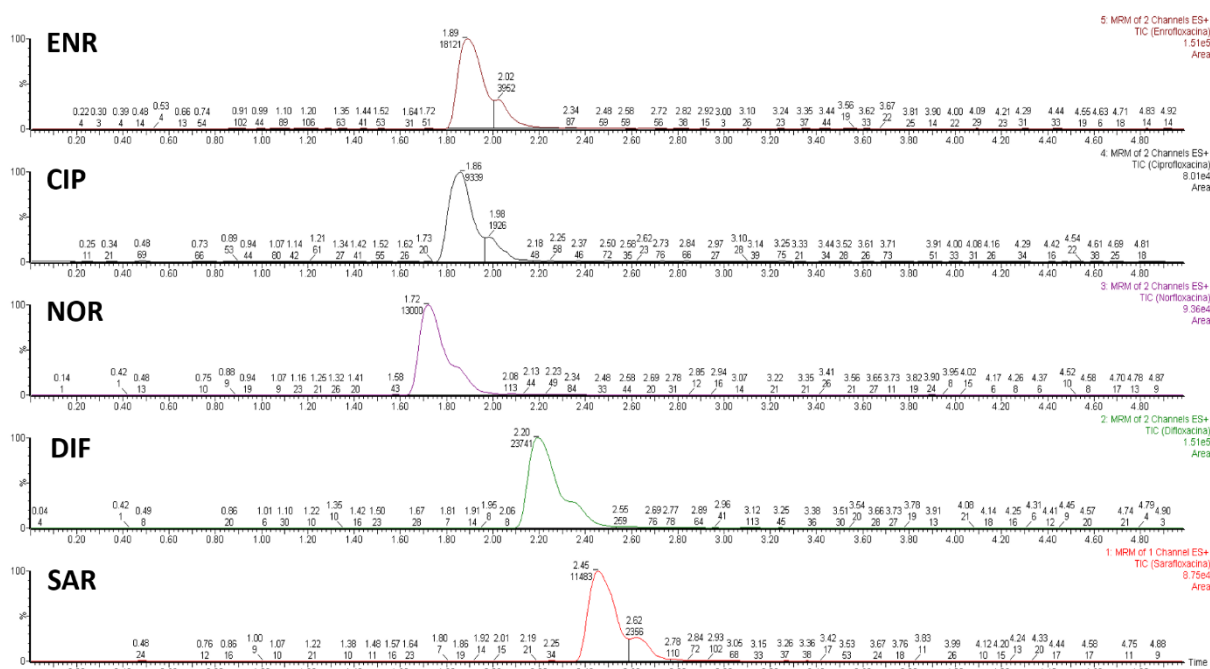


Figura 63. Cromatograma obtido após extração a 85 °C.

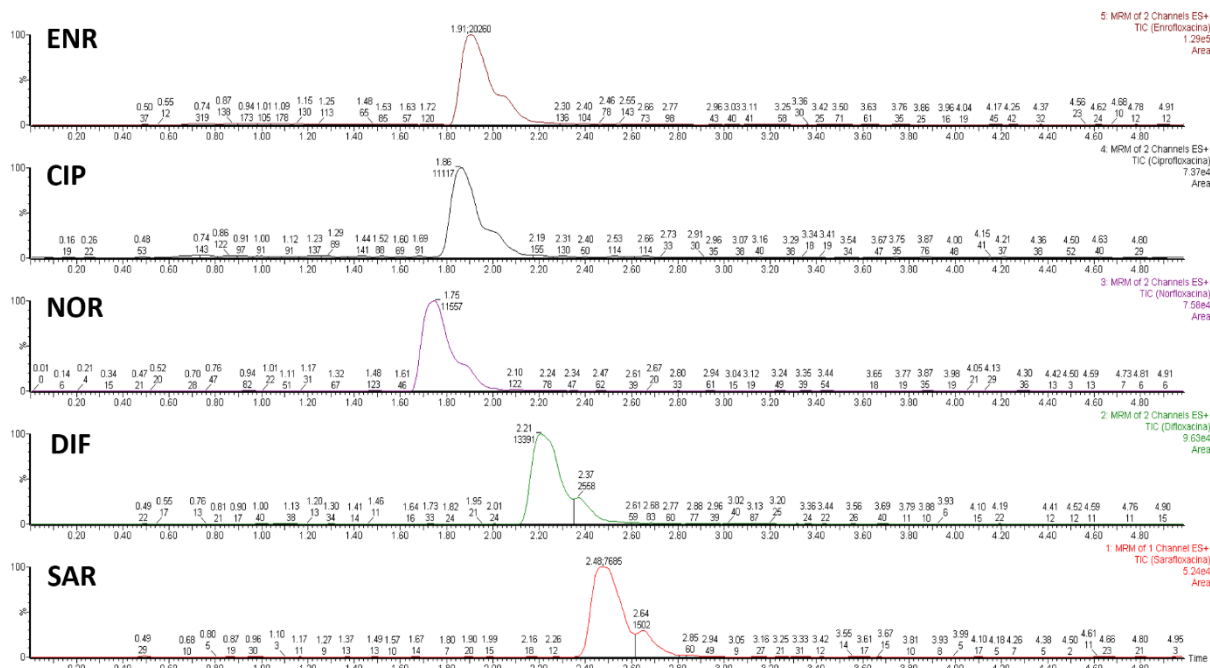


Figura 64. Cromatograma obtido após extração a 100 °C.

A.2.3 Número de Ciclos Estáticos

Tabela 31. Compilação da média das áreas obtidas nas 3 extrações realizadas para o diferente número de ciclos testados e respectivos DPR.

| Número de ciclos | | ENR | NOR | CIP | DIF | SAR |
|------------------|---------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 2 | Área | 5407,5 | 864,816 | 1042,82 | 6971,52 | 2120,35 |
| | DPR (%) | 7,9 | 4,1 | 9,9 | 7,4 | 6,7 |
| 3 | Área | 4909,97 | 666,567 | 821,227 | 7259,51 | 2227,56 |
| | DPR (%) | 0,5 | 2,3 | 2,5 | 2,2 | 3,4 |
| 4 | Área | 5211,77 | 859,135 | 1004,56 | 7080,49 | 2327,64 |
| | DPR (%) | 3,4 | 4,9 | 2,6 | 3,9 | 4,2 |
| 5 | Área | 8404,81 | 1296,26 | 1483,38 | 11213,5 | 3696,37 |
| | DPR (%) | 2,9 | 3,7 | 6,6 | 2,3 | 0,5 |
| 6 | Área | 8663,08 | 1979,03 | 2514,58 | 9755,07 | 4330,71 |
| | DPR (%) | 2,2 | 5,9 | 2,5 | 1,2 | 3,8 |
| 7 | Área | 6925,14 | 1463,922 | 1754,495 | 8461,012 | 3322,158 |
| | DPR (%) | 3,6 | 0,3 | 0,7 | 2,2 | 6,2 |
| 8 | Área | 5705,518 | 1130,402 | 1422,239 | 7007,788 | 2880,784 |
| | DPR (%) | 2,2 | 4,1 | 1,4 | 3,9 | 1,0 |
| 9 | Área | 4933,506 | 858,978 | 1132,152 | 6718,048 | 2492,509 |
| | DPR (%) | 2,4 | 3,7 | 1,0 | 0,5 | 3,5 |

Anexos

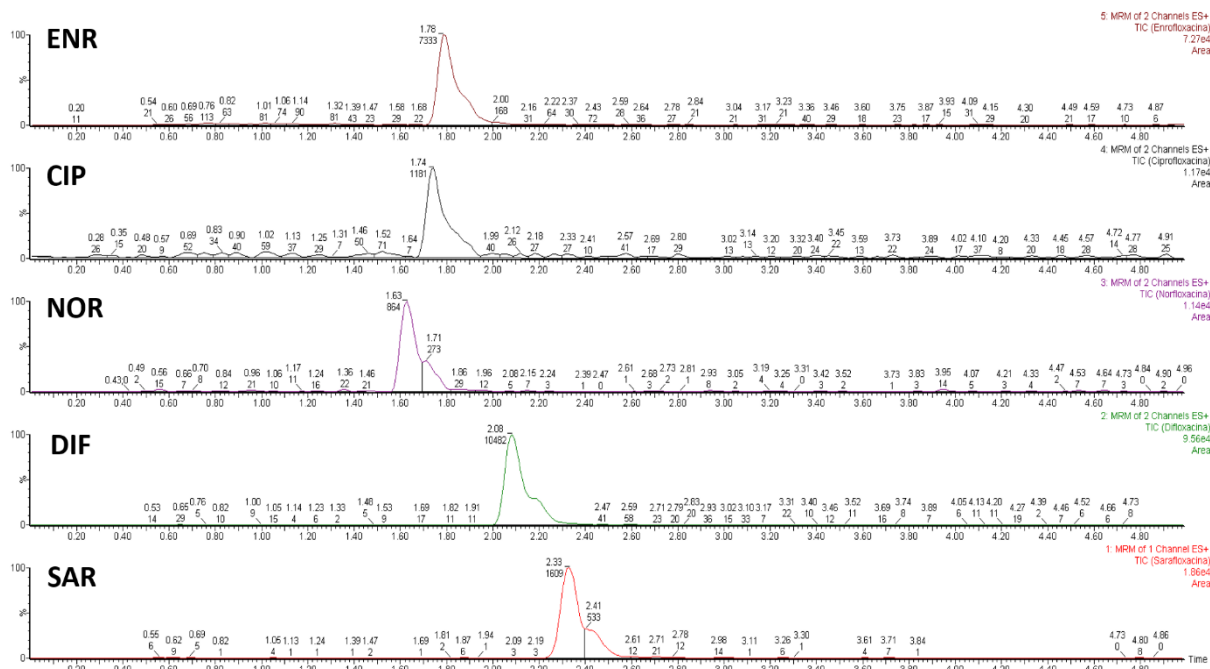


Figura 65. Cromatograma obtido após extração com 2 ciclos.

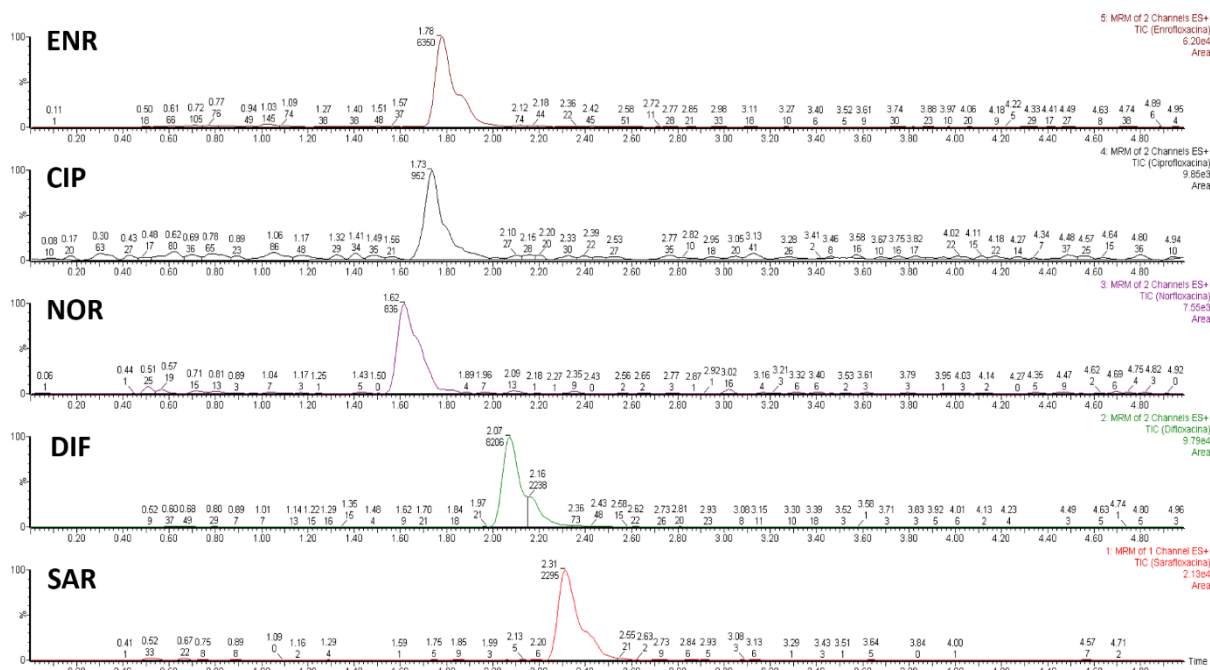


Figura 66. Cromatograma obtido após extração com 3 ciclos.

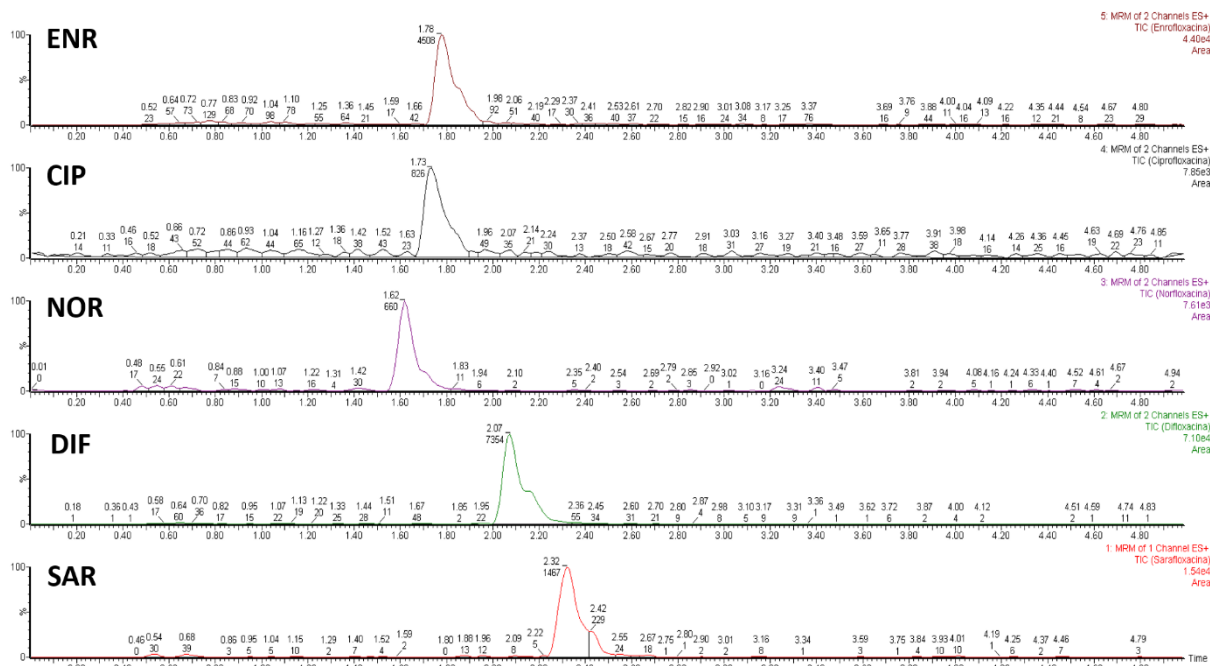


Figura 67. Cromatograma obtido após extração com 4 ciclos.

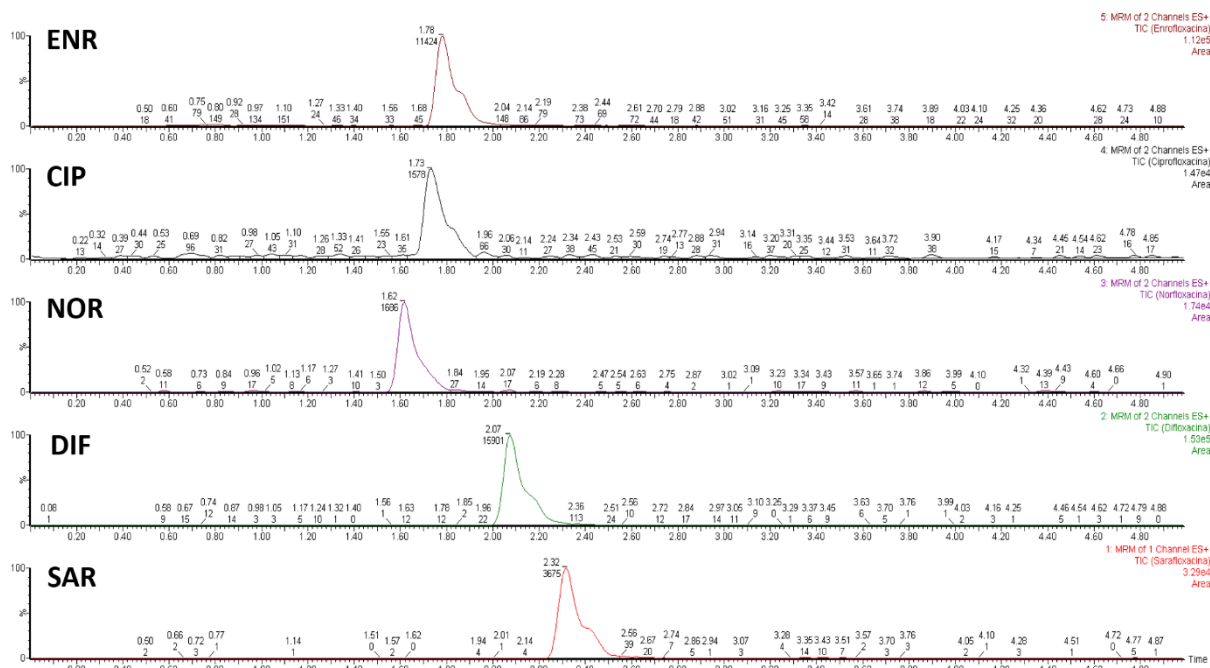


Figura 68. Cromatograma obtido após extração com 5 ciclos.

Anexos

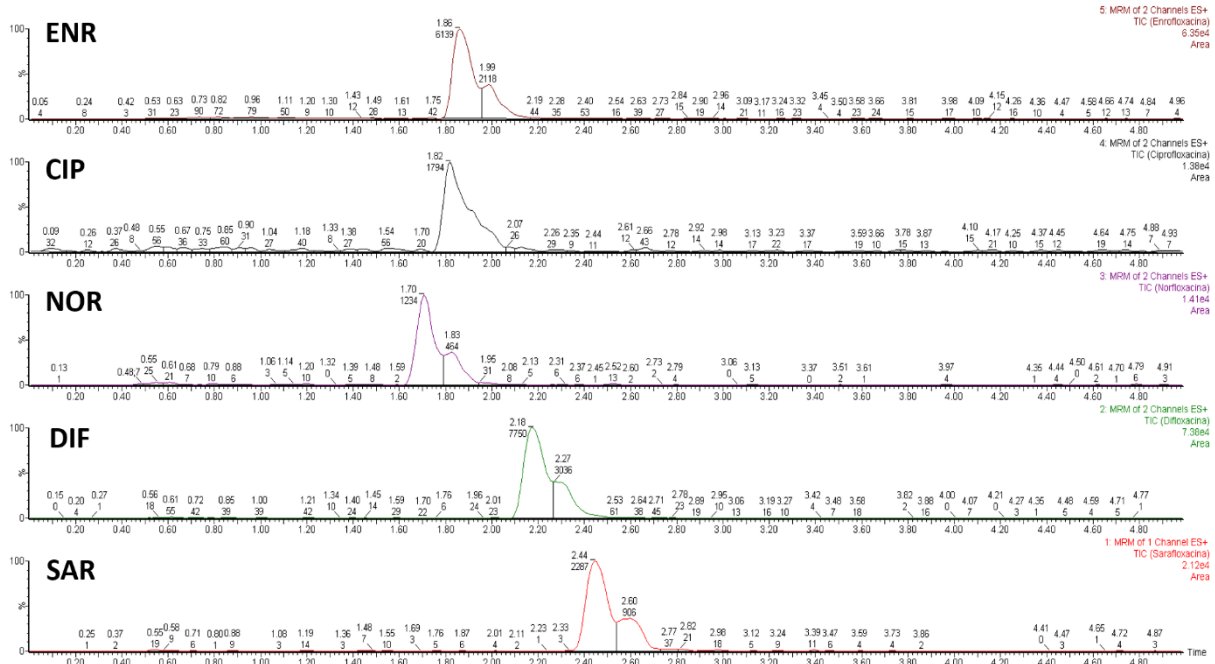


Figura 69. Cromatograma obtido após extração com 6 ciclos.

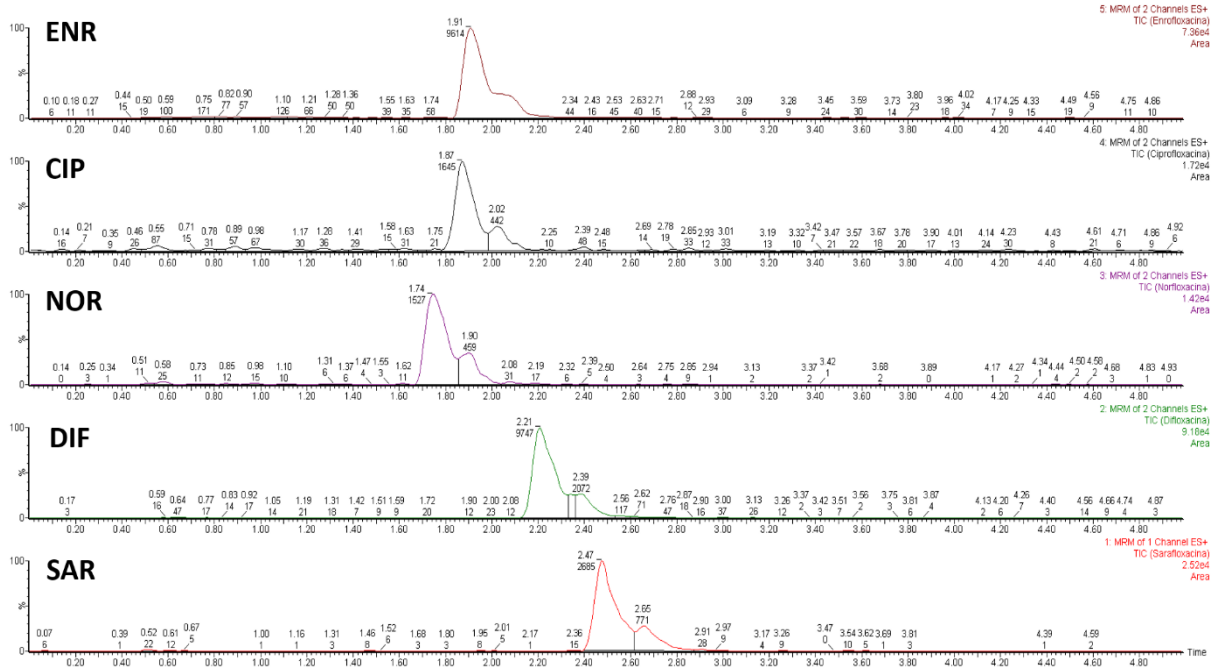


Figura 70. Cromatograma obtido após extração com 7 ciclos.

Anexos

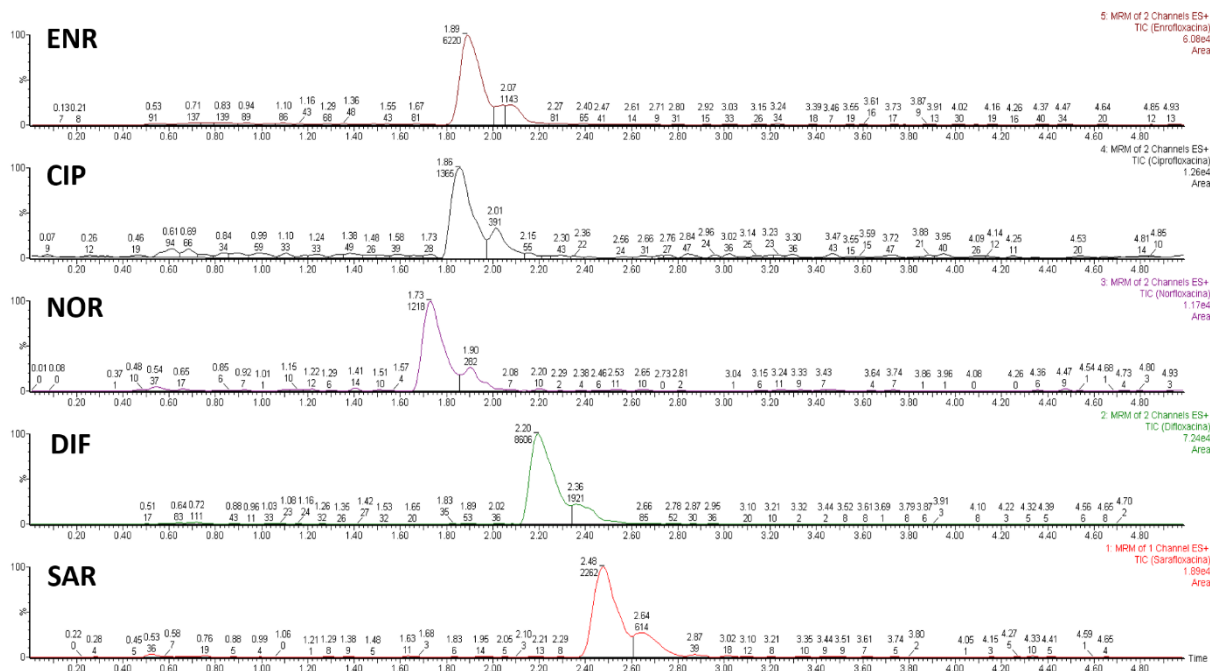


Figura 71. Cromatograma obtido após extração com 8 ciclos.

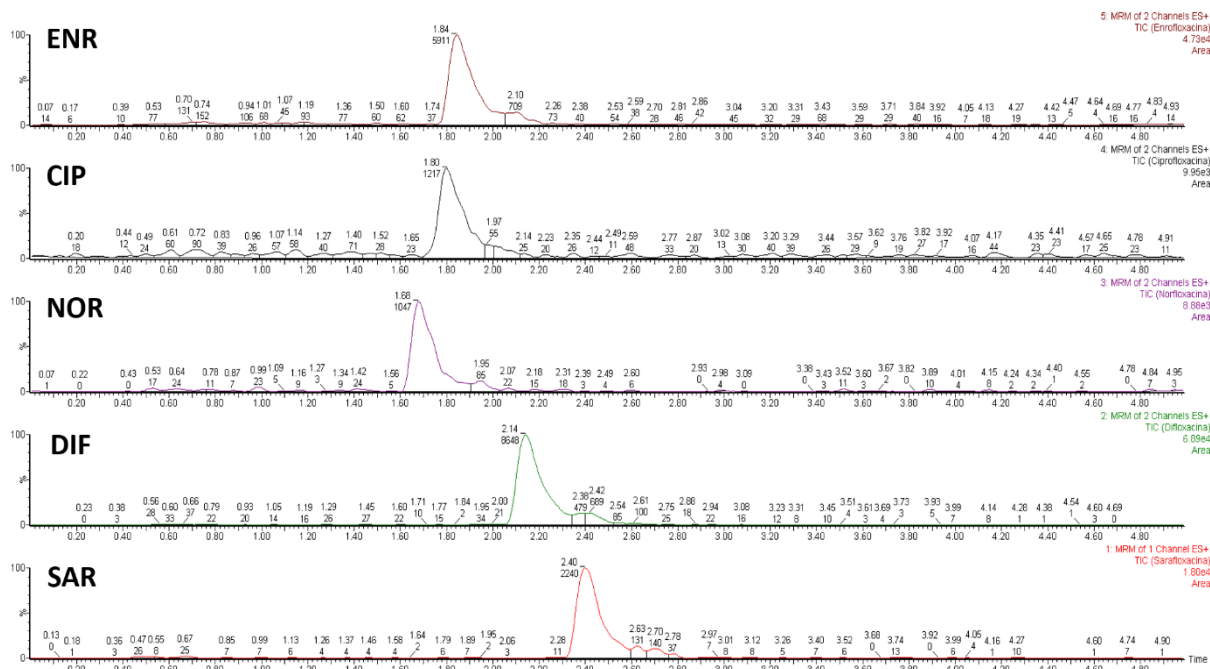


Figura 72. Cromatograma obtido após extração com 9 ciclos.

A.2.4 Tempo Estático

Tabela 32. Compilação da média das áreas obtidas nas 3 extrações realizadas para as diferentes durações de cada ciclo (tempo estático) testadas e respectivos DPR.

| Tempo estático | | ENR | NOR | CIP | DIF | SAR |
|----------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 3 min. | Área | 7813,57 | 1652,11 | 2125,98 | 9134,89 | 3820,81 |
| | DPR (%) | 1,6 | 2,1 | 2,2 | 1,4 | 1,9 |
| 5 min. | Área | 6821,11 | 1549,60 | 1949,23 | 7846,71 | 3314,00 |
| | DPR (%) | 3,8 | 7,9 | 8,5 | 4,5 | 3,8 |
| 8 min. | Área | 6148,41 | 1232,41 | 1495,87 | 7878,24 | 2970,36 |
| | DPR (%) | 1,1 | 3,4 | 5,5 | 1,8 | 3,6 |

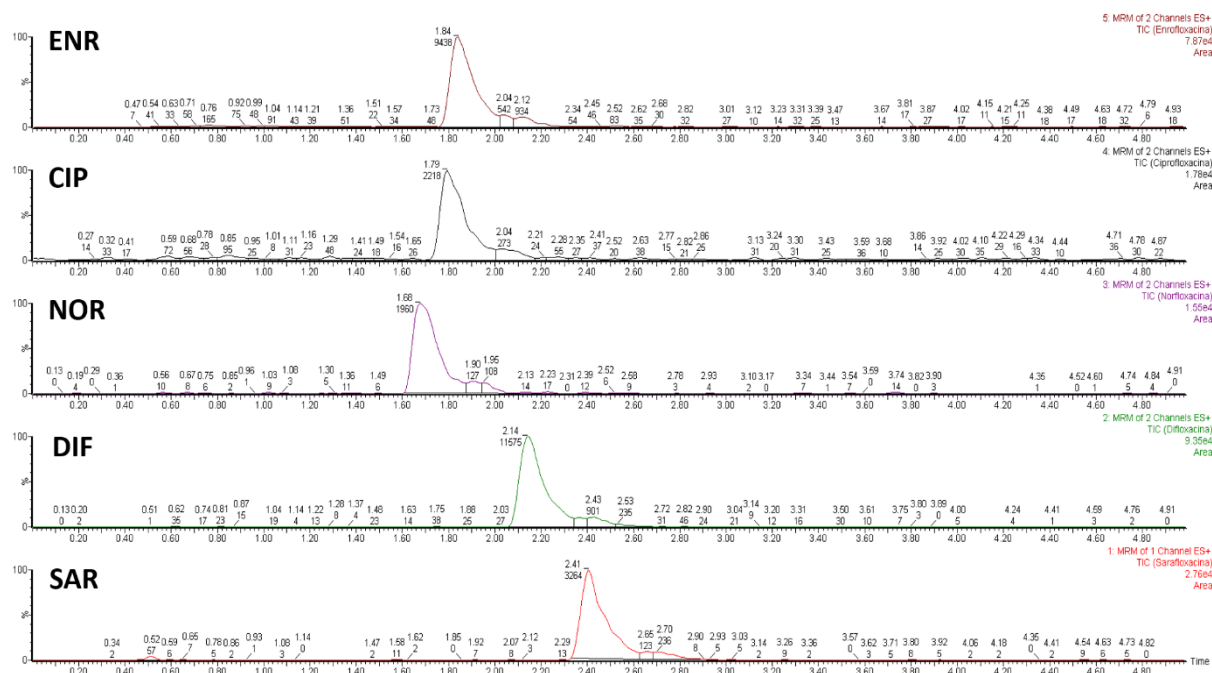


Figura 73. Cromatograma obtido após extração com tempo estático de 3 min.

Anexos

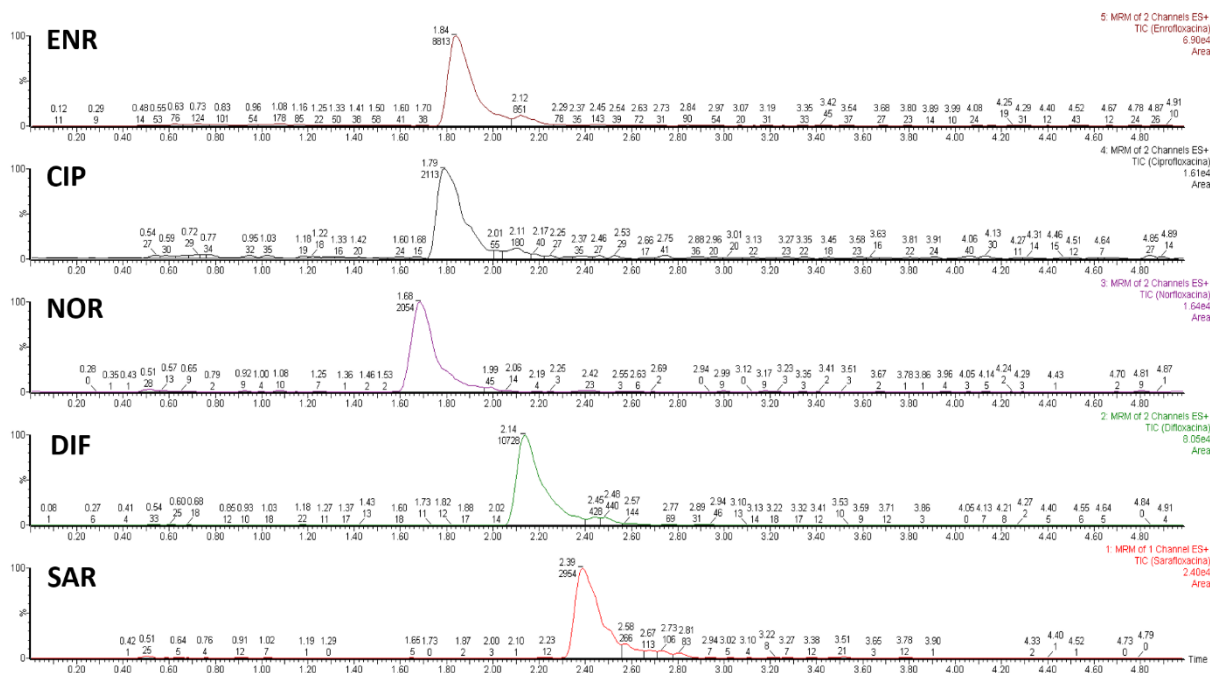


Figura 74. Cromatograma obtido após extração com tempo estático de 5 min.

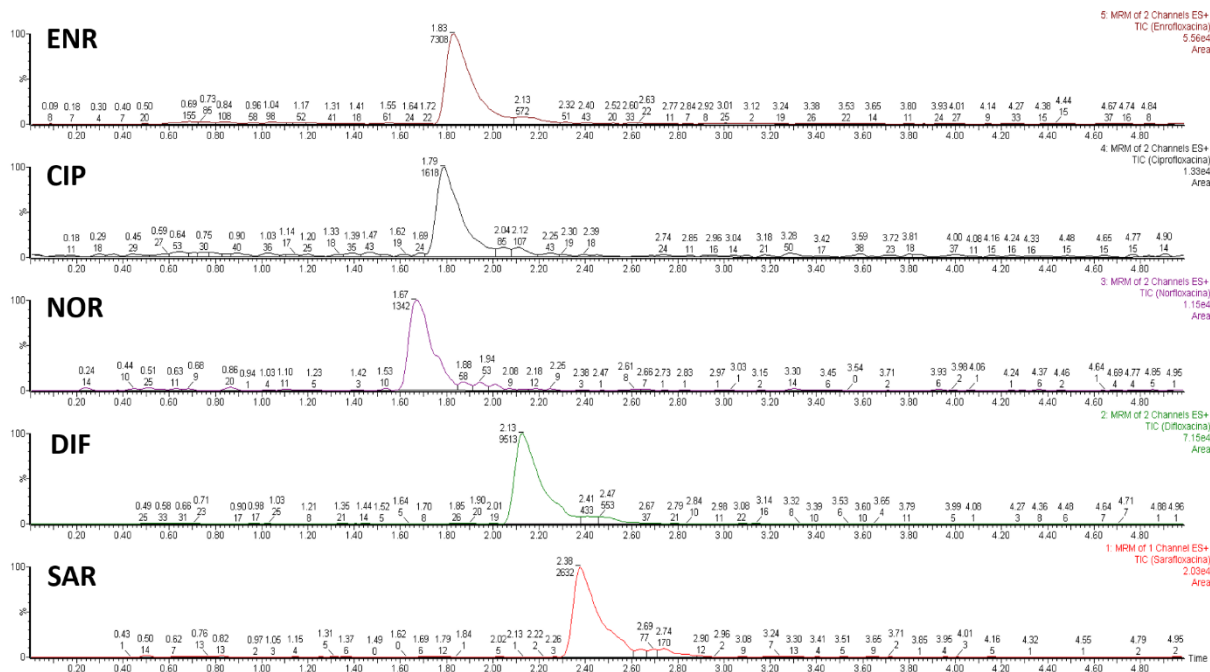


Figura 75. Cromatograma obtido após extração com tempo estático de 8 min.

A.3 Otimização SPE

A.3.1 Cartuchos

Tabela 33. Compilação da média das áreas obtidas nas 3 extrações realizadas para os diferentes cartuchos testados e respectivos DPR.

| Tempo estático | | ENR | NOR | CIP | DIF | SAR |
|----------------|---------|--------|-------|-------|--------|--------|
| HLB | Área | 1644,4 | 403,9 | 499,0 | 1870,4 | 1051,5 |
| | DPR (%) | 3,5 | 15,1 | 0,6 | 4,9 | 7,6 |
| MAX | Área | 457,1 | - | - | 932,2 | 77,6 |
| | DPR (%) | 5,6 | - | - | 3,8 | 11,0 |

A.3.2 Diluição da Amostra

Tabela 34. Compilação da média das áreas obtidas nas 3 extrações realizadas para as diferentes diluições da amostra testadas e respectivos DPR.

| Diluição da amostra | | ENR | NOR | CIP | DIF | SAR |
|---------------------|---------|--------|-------|-------|--------|-------|
| 5x | Área | 501,2 | 55,2 | 95,7 | 1035,4 | 462,4 |
| | DPR (%) | 10,8 | 73,9 | 15,4 | 2,1 | 3,2 |
| 10x | Área | 1237,4 | 279,2 | 311,4 | 1390,3 | 698,7 |
| | DPR (%) | 9,0 | 18,5 | 9,0 | 7,6 | 13,7 |
| 25x | Área | 1304,7 | 382,7 | 466,2 | 1358,9 | 800,2 |
| | DPR (%) | 5,1 | 5,3 | 8,4 | 3,5 | 1,6 |
| 50x | Área | 963,8 | 275,3 | 432,2 | 1168,7 | 709,0 |
| | DPR (%) | 14,8 | 12,4 | 2,0 | 4,6 | 4,7 |

Anexos

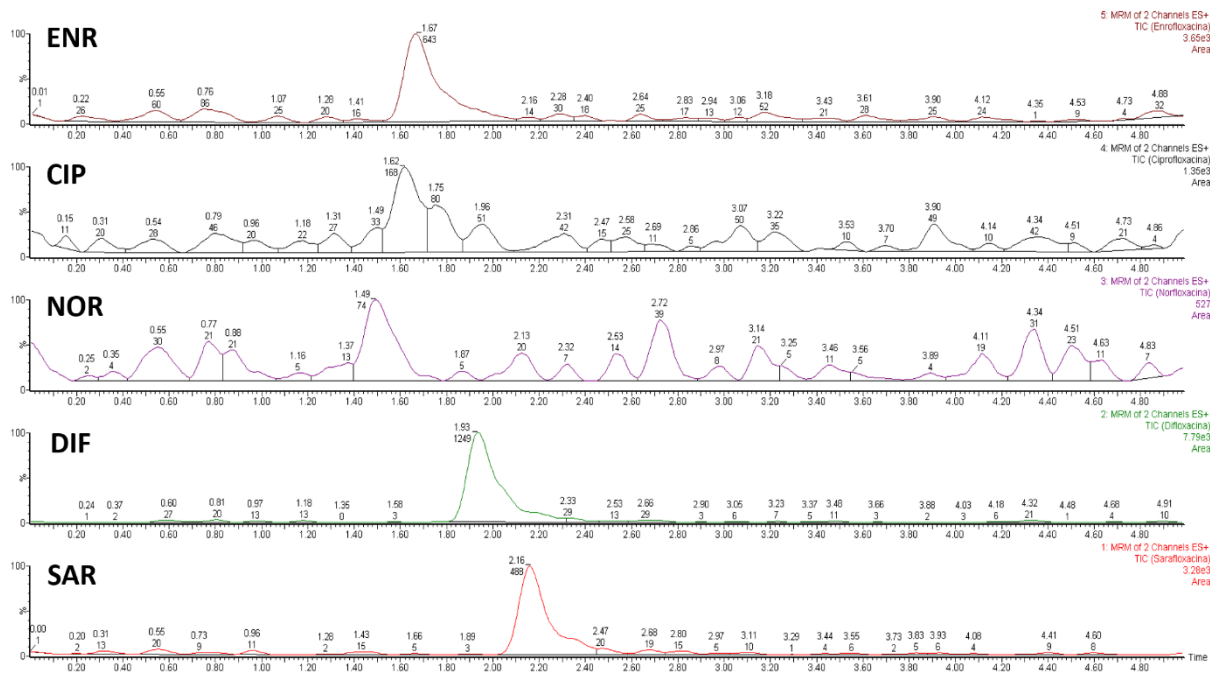


Figura 76. Cromatograma obtido após clean-up com uma diluição 5x da amostra.

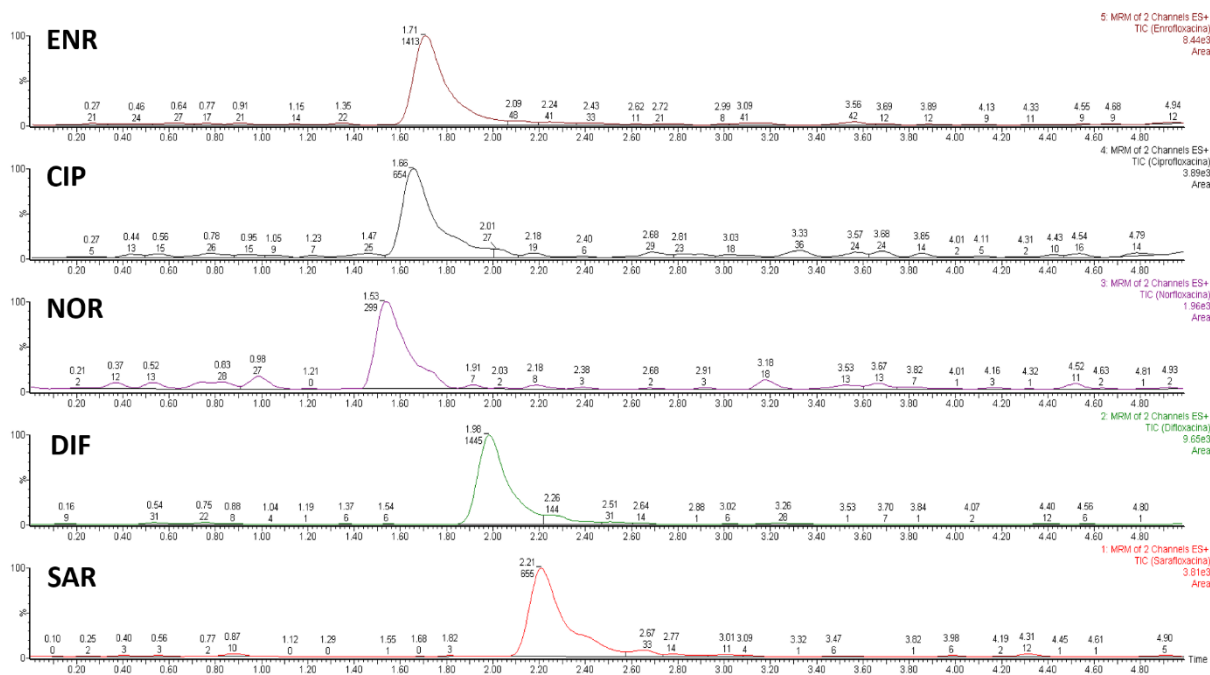


Figura 77. Cromatograma obtido após clean-up com uma diluição 10x da amostra.

Anexos

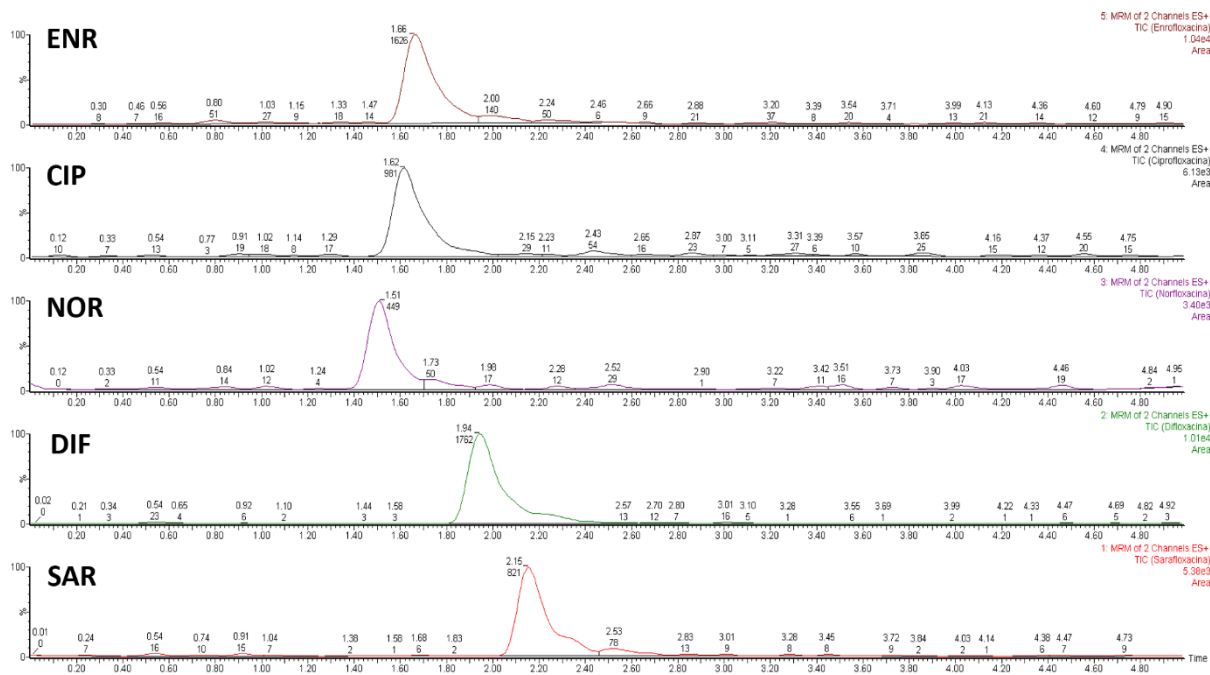


Figura 78. Cromatograma obtido após clean-up com uma diluição 25x da amostra.

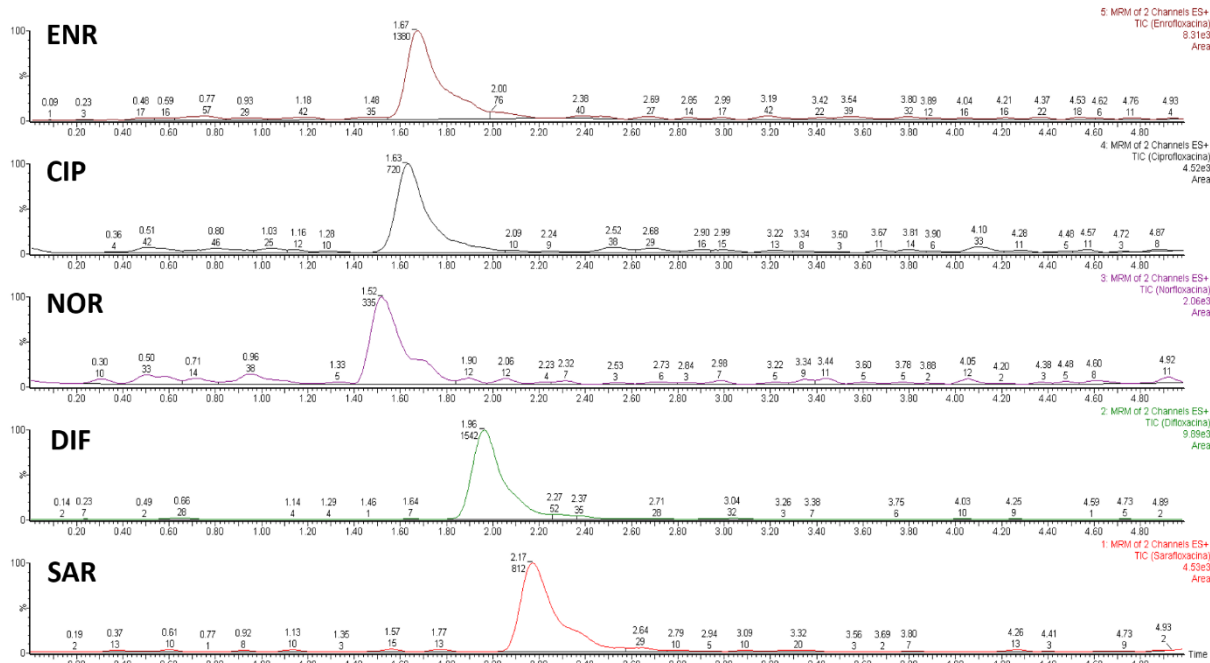


Figura 79. Cromatograma obtido após clean-up com uma diluição 50x da amostra.

A.3.3 Outros Aspectos

Tabela 35. Compilação da média das áreas obtidas nas 3 extrações realizadas para testar diferentes níveis a que se pode concentrar os analitos e respetivos DPR.

| Concentrar os analitos | | ENR | NOR | CIP | DIF | SAR |
|------------------------|---------|---------|--------|--------|---------|--------|
| 2x | Área | 997,2 | 303,7 | 312,4 | 797,2 | 464,3 |
| | DPR (%) | 2,8 | 16,5 | 11,0 | 4,2 | 11,9 |
| 5x | Área | 3819,8 | 1386,3 | 1297,9 | 4405,0 | 2532,3 |
| | DPR (%) | 4,8 | 2,5 | 10,2 | 4,8 | 5,4 |
| 10x | Área | 7389,4 | 2270,3 | 2173,8 | 6675,7 | 3519,3 |
| | DPR (%) | 2,2 | 4,1 | 4,3 | 1,7 | 4,2 |
| 100x | Área | 18977,8 | 5402,8 | 5278,9 | 20590,6 | 9623,9 |
| | DPR (%) | 5,4 | 10,9 | 4,0 | 6,4 | 7,1 |

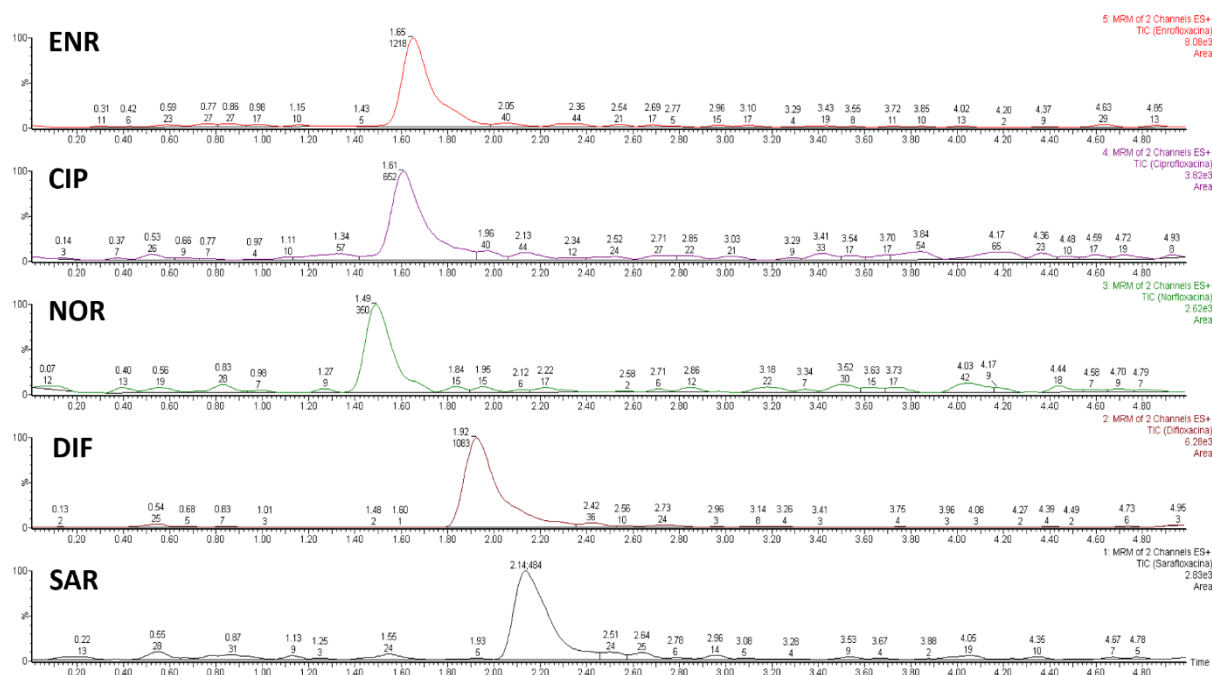


Figura 80. Cromatograma obtido após concentrar os analitos 2x.

Anexos

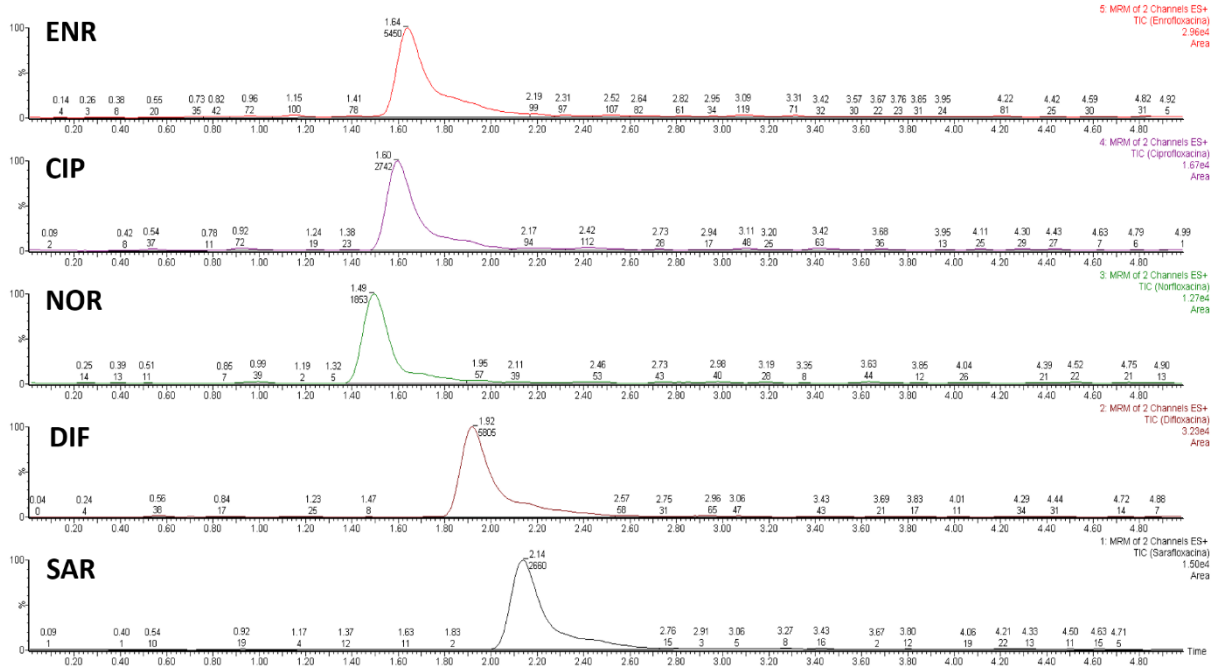


Figura 81. Cromatograma obtido após concentrar os analitos 5x.

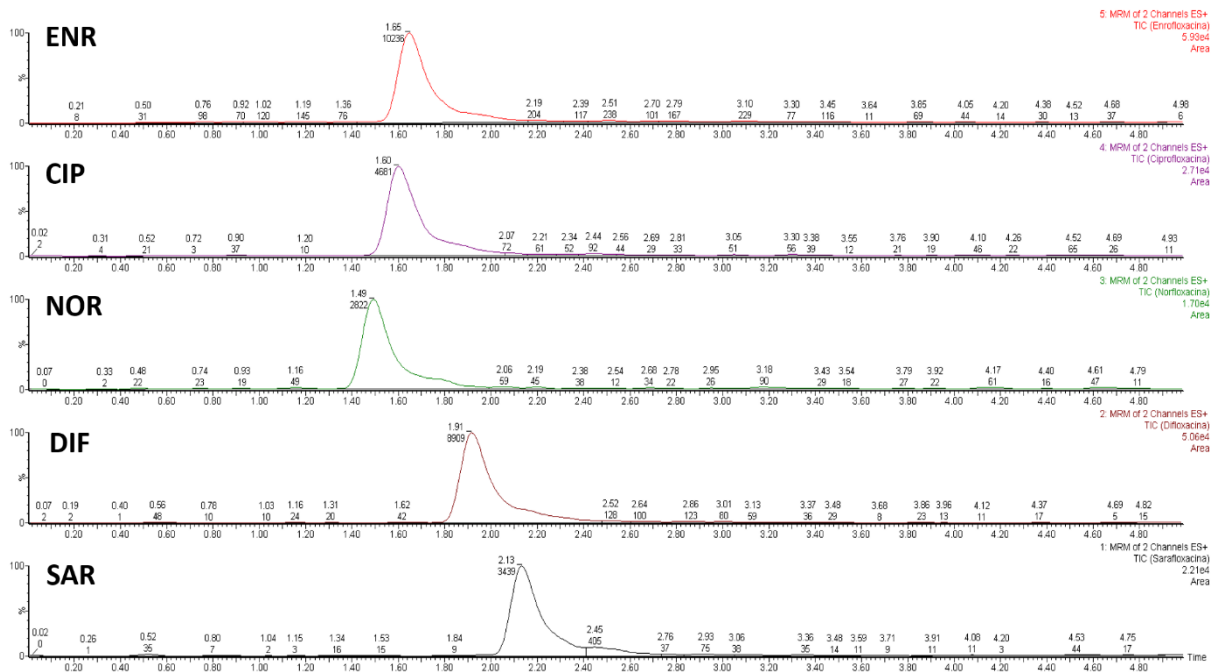


Figura 82. Cromatograma obtido após concentrar os analitos 10x.

Anexos

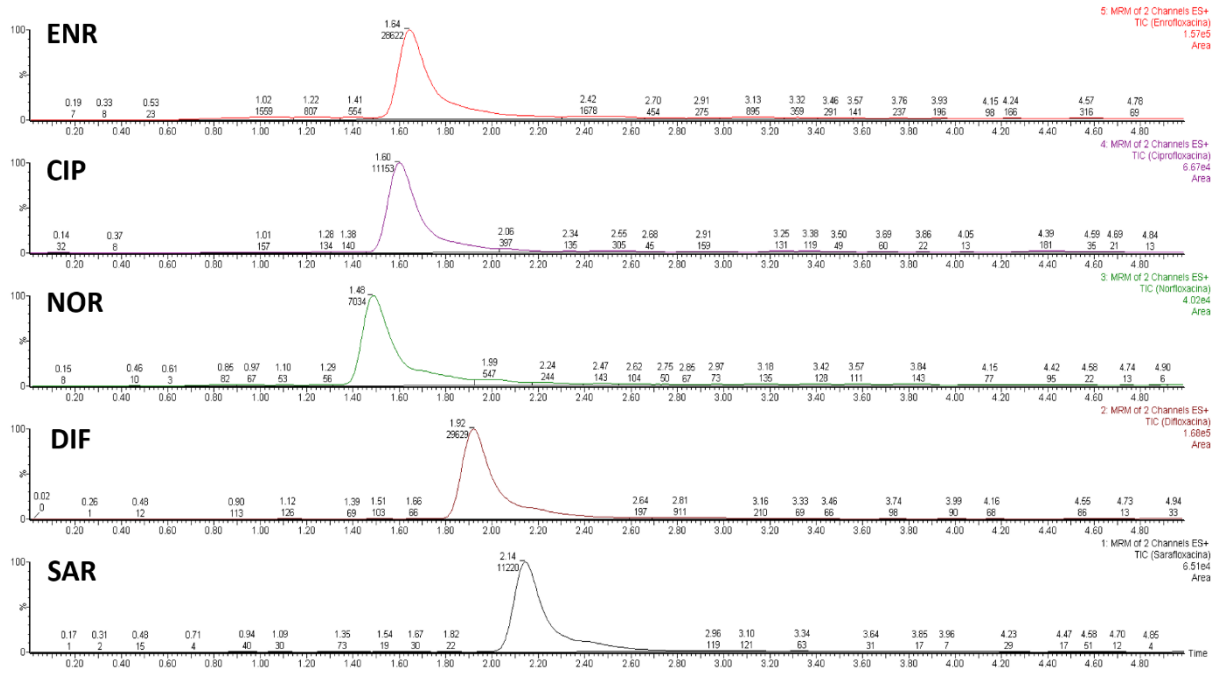


Figura 83. Cromatograma obtido após concentrar os analitos 100x.

Anexo B. Resultados e Discussão

B.1 Cromatogramas da Calibração

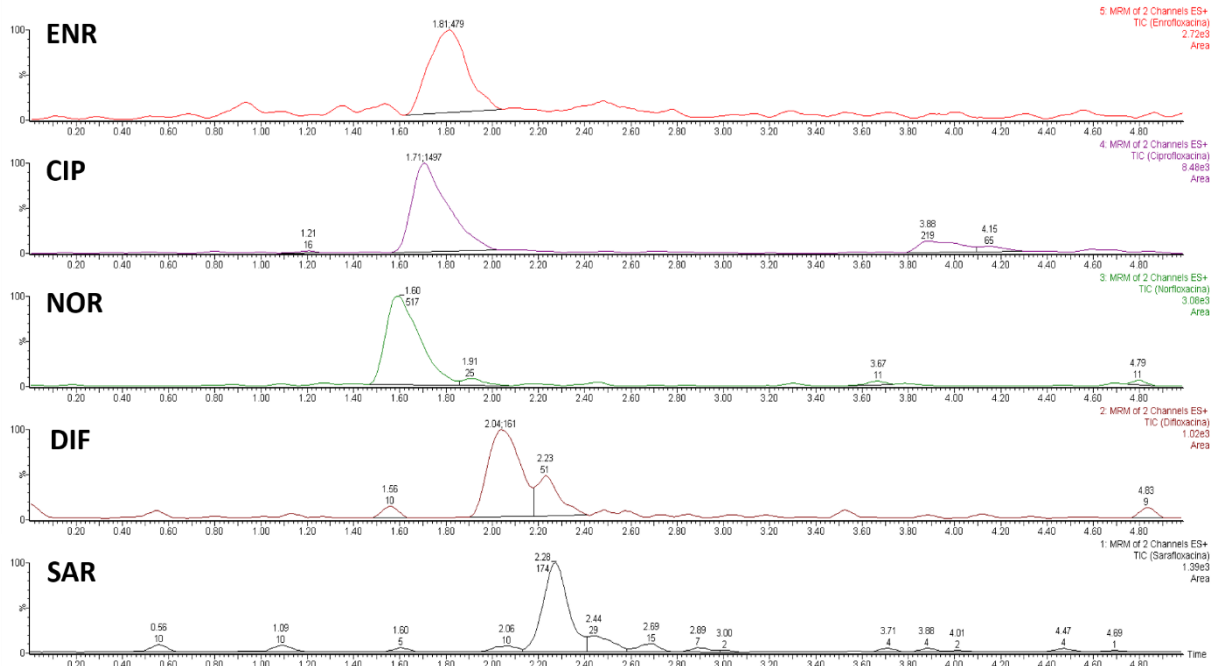


Figura 84. Cromatograma obtido para o P1 (12,5 µg/kg) na calibração utilizada para a validação do método.

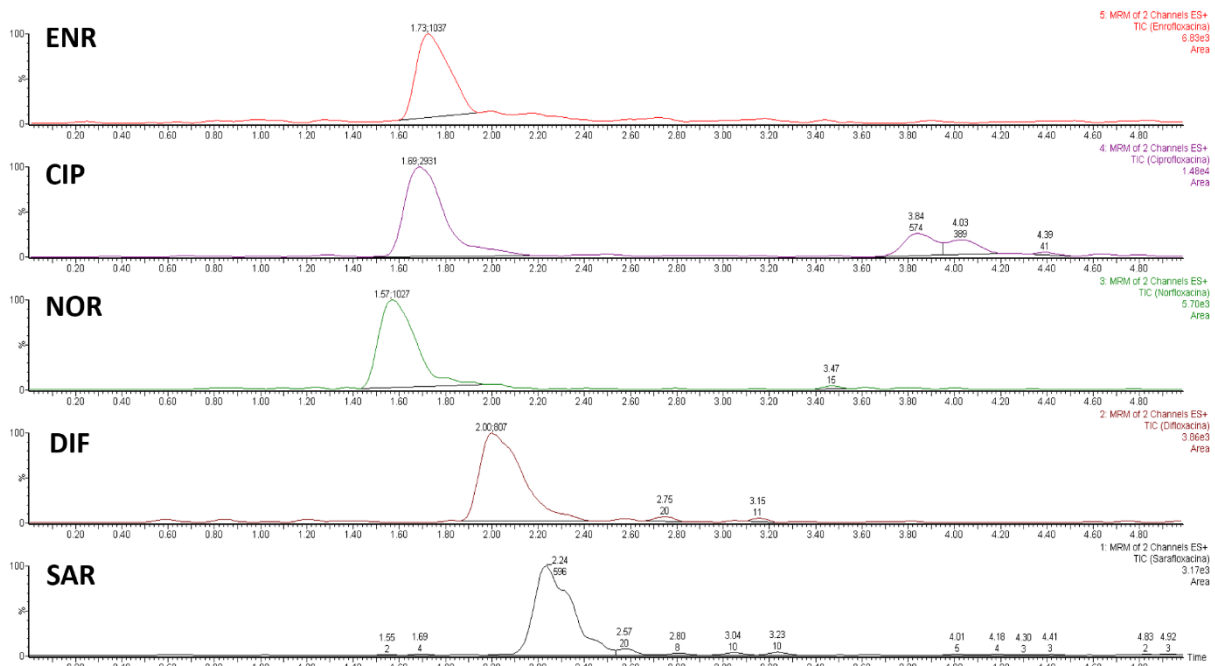


Figura 85. Cromatograma obtido para o P2 (25,0 µg/kg) na calibração utilizada para a validação do método.

Anexos

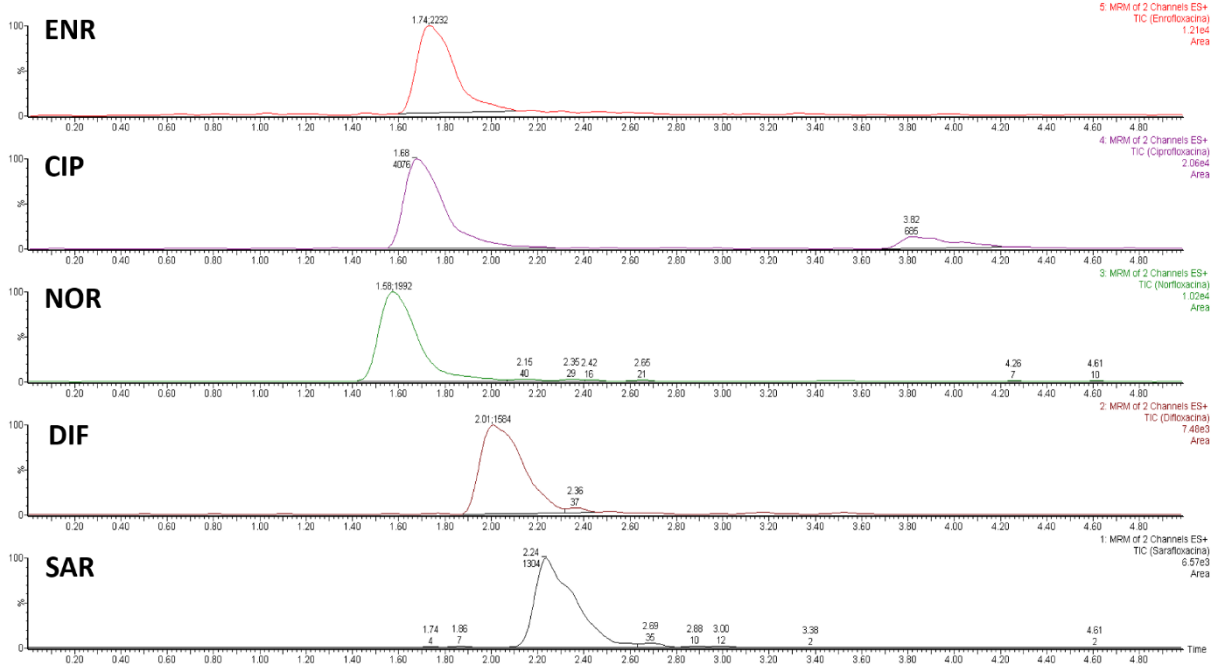


Figura 86. Cromatograma obtido para o P3 (50,0 µg/kg) na calibração utilizada para a validação do método.

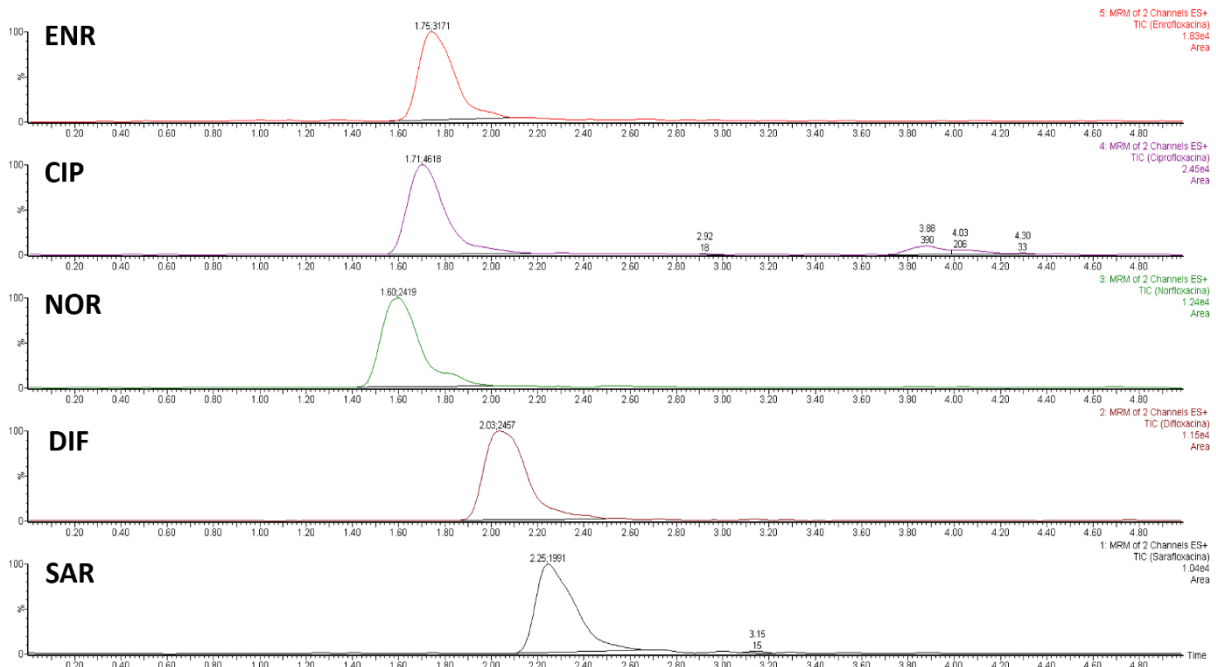


Figura 87. Cromatograma obtido para o P4 (100,0 µg/kg) na calibração utilizada para a validação do método.

Anexos

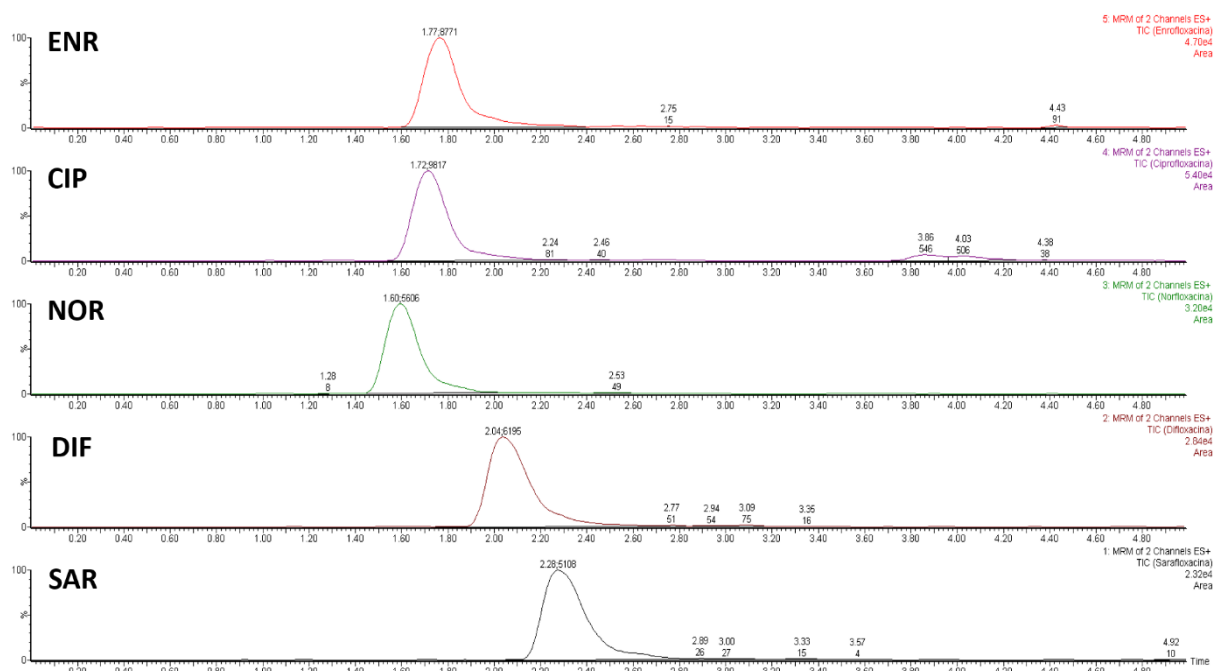


Figura 88. Cromatograma obtido para o P5 (150,0 µg/kg) na calibração utilizada para a validação do método.

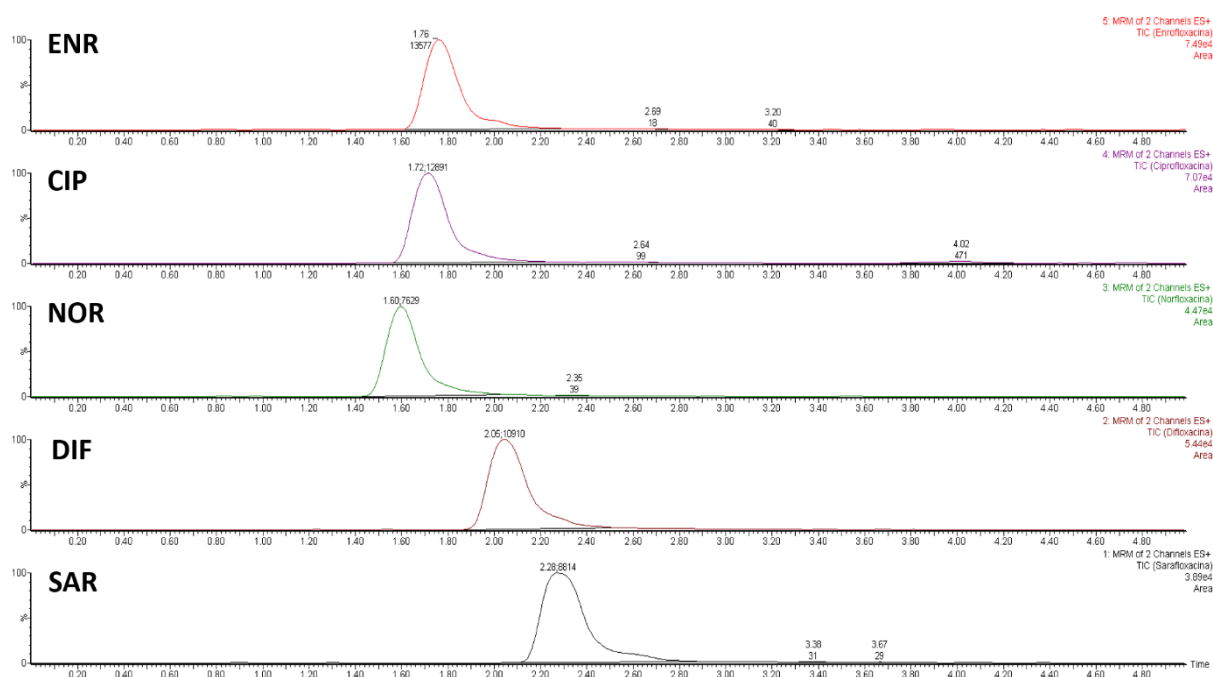


Figura 89. Cromatograma obtido para o P6 (250,0 µg/kg) na calibração utilizada para a validação do método.

B.2 Folhas de Validação

B.2.1 Enrofloxacina

| 1.2. Linearidade | | | |
|--|-----------------|-----------------------------|----------------------|
| Curva de Regressão Linear | | Curva Polinomial de 2º Grau | |
| Sy1 ² | 72639,16089 | Sy2 ² | 64498,371 |
| n-2 | 3 | n-3 | 2 |
| DS ² | 88920,74056 | Valor F tabelado | 15,977 |
| PG | 1,378651 | graus de liberdade | 4 |
| | | Probabilidade | 0,01 |
| <p>Decisão: A recta polinomial de 2º grau NÃO conduz a um ajuste significativamente melhor que a linear</p> | | | |
| 2. Calibração e características do método | | | |
| Declive (b) | 42,75925728 | | |
| Ordenada (a) | -219,1055179 | | |
| R | 0,998540459 | 0,9985405 | |
| R ² | 0,997083049 | | |
| Sy | 269,5165318 | | |
| Sxo | 6,30311537 | | |
| Vxo (%) | 6,469511198 | | |
| sb | 0,031227576 | | |
| sa | 4,14756502 | | |
| n-2 | 3 | | |
| t(n-2),95% | 3,182446305 | | |
| sb*t | 0,099380084 | | |
| sa*t | 13,19940297 | | |
| b= | 42,75925728 | +/- | 0,0993801 |
| a= | -219,1055179 | +/- | 13,199403 |
| | | | 0,2324177 CV% |

Figura 90. Folha de validação do método para a ENR no que diz respeito à regressão linear.

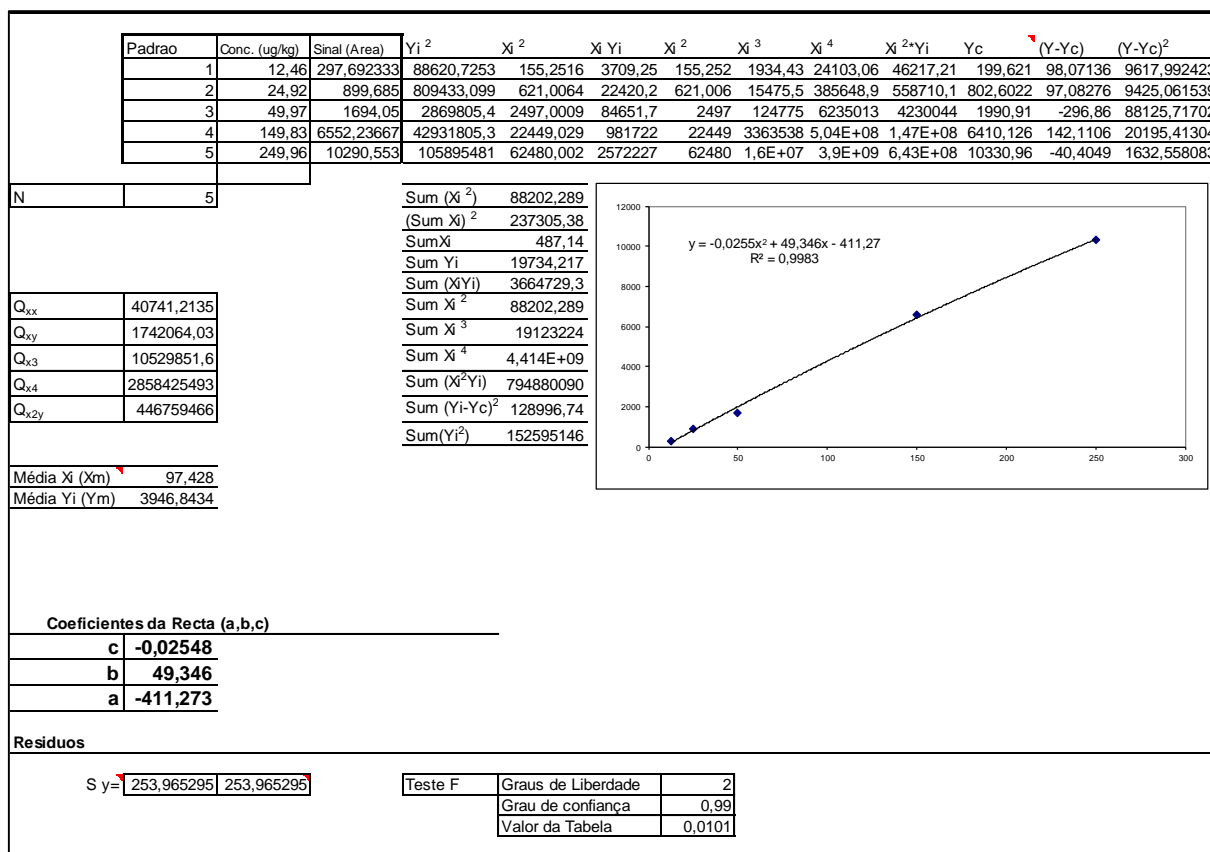


Figura 91. Folha de validação do método para a ENR no que diz respeito à curva polinomial.

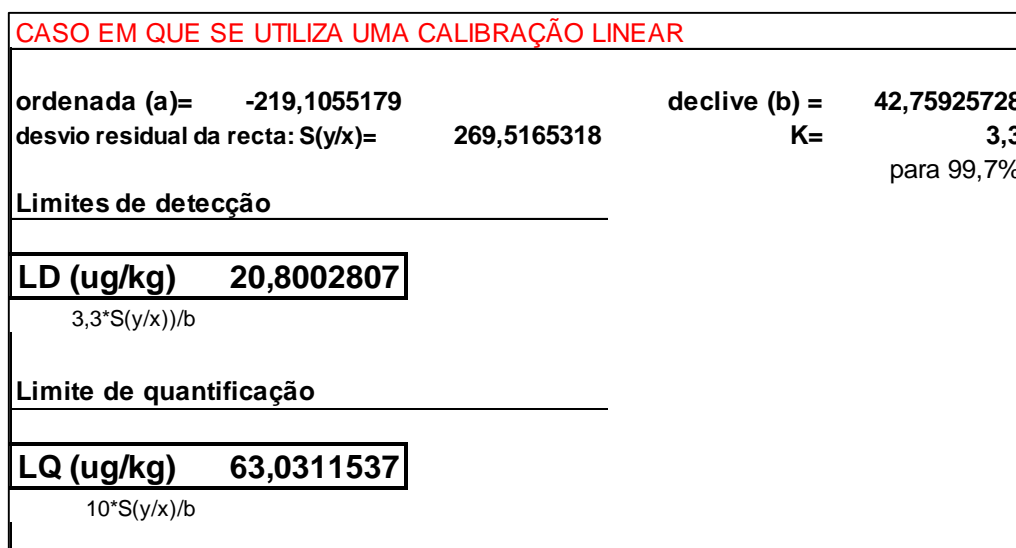


Figura 92. Folha de validação do método para a ENR no que diz respeito ao cálculo dos limites analíticos.

B.2.2 Norfloxacinina

| 1.2. Linearidade | | | |
|--|-----------------|------------------------------|---------------|
| Curva de Regressão Linear | | Curva Polinomial de 2º Grau | |
| Sy ¹ ² | 48012,86416 | Sy ² ² | 8791,3547 |
| n-2 | 3 | n-3 | 2 |
| DS ² | 126455,883 | Valor F tabelado | 15,977 |
| PG | 14,38412 | graus de liberdade | 4 |
| | | Probabilidade | 0,01 |
| <p>Decisão: A recta polinomial de 2º grau NÃO conduz a um ajuste significativamente melhor que a linear</p> | | | |
| 2. Calibração e características do método | | | |
| Declive (b) | 26,59145488 | | |
| Ordenada (a) | 176,342201 | | |
| R | 0,997509389 | 0,9975094 | |
| R ² | 0,995024982 | | |
| Sy | 219,1183793 | | |
| Sxo | 8,240180176 | | |
| Vxo (%) | 8,457712543 | | |
| sb | 0,040824392 | | |
| sa | 5,422189036 | | |
| n-2 | 3 | | |
| t(n-2),95% | 3,182446305 | | |
| sb*t | 0,129921436 | | |
| sa*t | 17,25582547 | | |
| b= | 26,59145488 | +/- | 0,1299214 |
| a= | 176,342201 | +/- | 17,255825 |
| | | | 0,4885834 CV% |

Figura 93. Folha de validação do método para a NOR no que diz respeito à regressão linear.

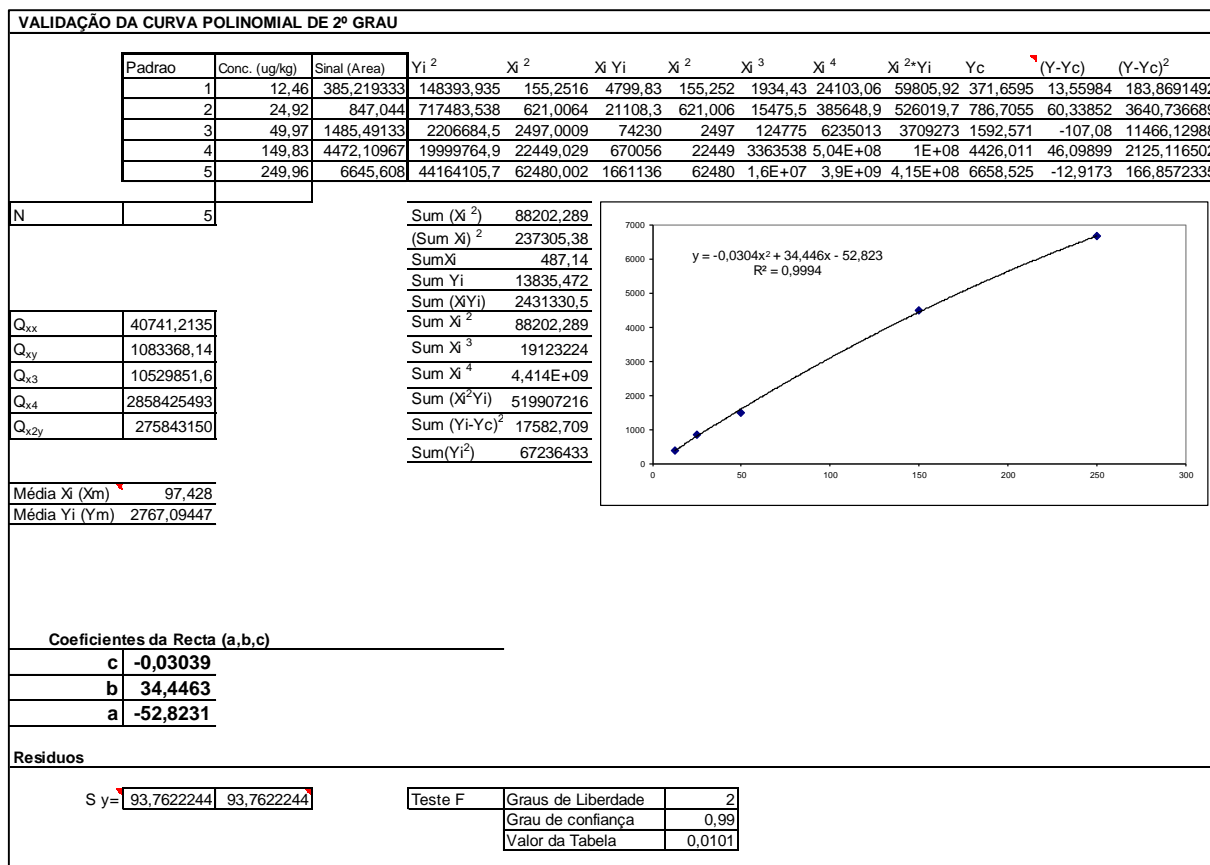


Figura 94. Folha de validação do método para a NOR no que diz respeito à curva polinomial.

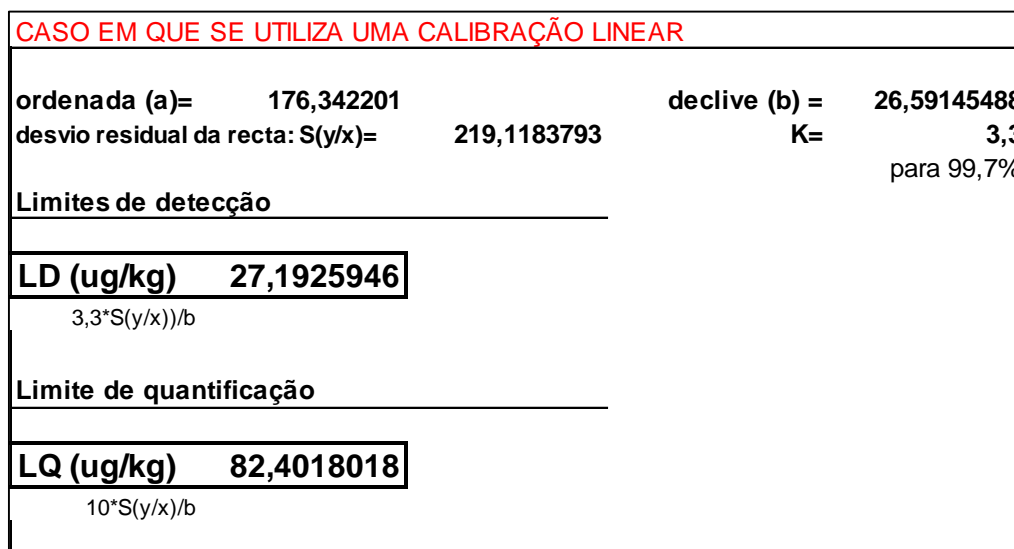


Figura 95. Folha de validação do método para a NOR no que diz respeito ao cálculo dos limites analíticos.

B.2.3 Ciprofloxacina

| 1.2. Linearidade | | | |
|--|-----------------|-----------------------------|---------------|
| Curva de Regressão Linear | | Curva Polinomial de 2º Grau | |
| Sy ¹ | 62447,77906 | Sy ² | 22360,712 |
| n-2 | 3 | n-3 | 2 |
| DS ² | 142621,9133 | Valor F tabelado | 15,977 |
| PG | 6,378237 | graus de liberdade | 4 |
| | | Probabilidade | 0,01 |
| <p>Decisão: A recta polinomial de 2º grau NÃO conduz a um ajuste significativamente melhor que a linear</p> | | | |
| 2. Calibração e características do método | | | |
| Declive (b) | 26,39428182 | | |
| Ordenada (a) | 696,7246442 | | |
| R | 0,99671594 | 0,9967159 | |
| R ² | 0,993442665 | | |
| Sy | 249,8955363 | | |
| Sxo | 9,467790713 | | |
| Vxo (%) | 9,717730748 | | |
| sb | 0,046906353 | | |
| sa | 6,229979188 | | |
| n-2 | 3 | | |
| t(n-2),95% | 3,182446305 | | |
| sb*t | 0,14927695 | | |
| sa*t | 19,82657425 | | |
| b= | 26,39428182 | +/- | 0,149277 |
| a= | 696,7246442 | +/- | 19,826574 |
| | | | 0,5655655 CV% |

Figura 96. Folha de validação do método para a CIP no que diz respeito à regressão linear.

| VALIDAÇÃO DA CURVA POLINOMIAL DE 2º GRAU | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|---------------|--------------|---|--------------------|---------|-----------------|-----------------|-----------------|--------------------|----------|----------|---------------------|------------------------|------------|-----------------------|-----------|--------------------|--------|--------|-----------|------------|-----------|---------------------|-----------|---------------------|----------|---------------------|-----------|--------------------------|----------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------|
| Padrao | Conc. (ug/kg) | Sinal (Area) | Yi ² | Xi ² | Xi Yi | Xi ² | Xi ³ | Xi ⁴ | Xi ² Yi | Yc | (Y-Yc) | (Y-Yc) ² | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | 12,46 | 791,376333 | 626276,501 | 155,2516 | 9860,55 | 155,252 | 1934,43 | 24103,06 | 122862,4 | 881,1527 | -89,7764 | 8059,79738 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 24,92 | 1467,173 | 2152596,61 | 621,0064 | 36562 | 621,006 | 15475,5 | 385648,9 | 911123,8 | 1298,932 | 168,2408 | 28304,98323 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | 49,97 | 2018,38133 | 4073863,21 | 2497,0009 | 100859 | 2497 | 124775 | 6235013 | 5039900 | 2108,523 | -90,1417 | 8125,523385 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4 | 149,83 | 4948,174 | 24484425,9 | 22449,029 | 741385 | 22449 | 3363538 | 5,04E+08 | 1,11E+08 | 4933,309 | 14,86471 | 220,9597361 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | 249,96 | 7116,229 | 50640715,2 | 62480,002 | 1778773 | 62480 | 1,6E+07 | 3,9E+09 | 4,45E+08 | 7119,417 | -3,1875 | 10,16018164 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| N | 5 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Q _{xx} | 40741,2135 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Q _{xy} | 1075335,07 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Q _{x3} | 10529851,6 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Q _{x4} | 2858425493 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Q _{x2y} | 273508978 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Média Xi (Xm) | 97,428 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Média Yi (Ym) | 3268,26673 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Coeficientes da Recta (a,b,c) | | | <table border="1"> <tr> <td>Sum (Xi²)</td> <td>88202,289</td> </tr> <tr> <td>(Sum Xi)²</td> <td>237305,38</td> </tr> <tr> <td>Sum Xi</td> <td>487,14</td> </tr> <tr> <td>Sum Yi</td> <td>16341,334</td> </tr> <tr> <td>Sum (XiYi)</td> <td>2667438,5</td> </tr> <tr> <td>Sum Xi²</td> <td>88202,289</td> </tr> <tr> <td>Sum Xi³</td> <td>19123224</td> </tr> <tr> <td>Sum Xi⁴</td> <td>4,414E+09</td> </tr> <tr> <td>Sum (Xi²Yi)</td> <td>56177587</td> </tr> <tr> <td>Sum (Yi-Yc)²</td> <td>44721,424</td> </tr> <tr> <td>Sum(Yi²)</td> <td>81977877</td> </tr> </table> | | | | | | | | | | Sum (Xi ²) | 88202,289 | (Sum Xi) ² | 237305,38 | Sum Xi | 487,14 | Sum Yi | 16341,334 | Sum (XiYi) | 2667438,5 | Sum Xi ² | 88202,289 | Sum Xi ³ | 19123224 | Sum Xi ⁴ | 4,414E+09 | Sum (Xi ² Yi) | 56177587 | Sum (Yi-Yc) ² | 44721,424 | Sum(Yi ²) | 81977877 |
| Sum (Xi ²) | 88202,289 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| (Sum Xi) ² | 237305,38 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Sum Xi | 487,14 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Sum Yi | 16341,334 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Sum (XiYi) | 2667438,5 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Sum Xi ² | 88202,289 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Sum Xi ³ | 19123224 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Sum Xi ⁴ | 4,414E+09 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Sum (Xi ² Yi) | 56177587 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Sum (Yi-Yc) ² | 44721,424 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Sum(Yi ²) | 81977877 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Resíduos | | | <table border="1"> <tr> <td>S y =</td> <td>149,534986</td> <td>149,53499</td> <td>Teste F</td> <td>Graus de Liberdade</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>Grau de confiança</td> <td>0,99</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>Valor da Tabela</td> <td>0,0101</td> </tr> </table> | | | | | | | | | | S y = | 149,534986 | 149,53499 | Teste F | Graus de Liberdade | 2 | | | | | Grau de confiança | 0,99 | | | | | Valor da Tabela | 0,0101 | | | | |
| S y = | 149,534986 | 149,53499 | Teste F | Graus de Liberdade | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | Grau de confiança | 0,99 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | Valor da Tabela | 0,0101 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Figura 97. Folha de validação do método para a CIP no que diz respeito à curva polinomial.

| CASO EM QUE SE UTILIZA UMA CALIBRAÇÃO LINEAR | | | |
|--|-------------------|---------------|-------------|
| ordenada (a)= | 696,7246442 | declive (b) = | 26,39428182 |
| desvio residual da recta: S(y/x)= | 249,8955363 | K= | 3,3 |
| | | | para 99,7% |
| Limites de detecção | | | |
| LD (ug/kg) | 31,2437094 | | |
| 3,3*S(y/x)/b | | | |
| Limite de quantificação | | | |
| LQ (ug/kg) | 94,6779071 | | |
| 10*S(y/x)/b | | | |

Figura 98. Folha de validação do método para a CIP no que diz respeito ao cálculo dos limites analíticos.

B.2.4 Difloxacina

| 1.2. Linearidade | | | |
|---|-----------------|-----------------------------|----------------------|
| Curva de Regressão Linear | | Curva Polinomial de 2º Grau | |
| Sy ² | 24516,30124 | Sy ² | 4999,7978 |
| n-2 | 3 | n-3 | 2 |
| DS ² | 63549,30812 | Valor F tabelado | 15,977 |
| PG | 12,71038 | graus de liberdade | 4 |
| | | Probabilidade | 0,01 |
| <p>Decisão: A recta polinomial de 2º grau NÃO conduz a um ajuste significativamente melhor que a linear</p> | | | |
| 2. Calibração e características do método | | | |
| Declive (b) | 33,64147273 | | |
| Ordenada (a) | -311,0539383 | | |
| R | 0,999203395 | 0,9992034 | |
| R ² | 0,998407424 | | |
| Sy | 156,5768222 | | |
| Sxo | 4,654279658 | | |
| Vxo (%) | 4,777147902 | | |
| sb | 0,023058736 | | |
| sa | 3,06260101 | | |
| n-2 | 3 | | |
| t(n-2),95% | 3,182446305 | | |
| sb*t | 0,073383189 | | |
| sa*t | 9,746563269 | | |
| b= | 33,64147273 | +/- | 0,0733832 |
| a= | -311,0539383 | +/- | 9,7465633 |
| | | | 0,2181331 CV% |

Figura 99. Folha de validação do método para a DIF no que diz respeito à regressão linear.

| VALIDAÇÃO DA CURVA POLINOMIAL DE 2º GRAU | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---------------|--------------|------------------------|-----------------|-----------------------|-------------------|---------------------|-----------------|--------------------------|-----------|--------------------------|---------------------|--|-------------------------------|--|--|---|---------|--|---|---------|--|---|----------|--|
| Padrao | Conc. (ug/kg) | Sinal (Area) | Yi ² | Xi ² | Xi Yi | Xi ² | Xi ³ | Xi ⁴ | Xi ² *Yi | Yc | (Y-Yc) | (Y-Yc) ² | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | 12,46 | 176,297 | 31080,6322 | 155,2516 | 2196,66 | 155,252 | 1934,43 | 24103,06 | 27370,39 | 204,5381 | -28,2411 | 797,558962 | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 24,92 | 638,565667 | 407766,111 | 621,0064 | 15913,1 | 621,006 | 15475,5 | 385648,9 | 396553,4 | 564,3641 | 74,20155 | 5505,87033 | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | 49,97 | 1249,709 | 1561772,58 | 2497,0009 | 62448 | 2497 | 124775 | 6235013 | 3120524 | 1308,014 | -58,3051 | 3399,482016 | | | | | | | | | | | | | |
| 4 | 149,83 | 4557,92733 | 20774701,6 | 22449,029 | 682914 | 22449 | 3363538 | 5,04E+08 | 1,02E+08 | 4541,255 | 16,67206 | 277,9575007 | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | 249,96 | 8210,33833 | 67409655,5 | 62480,002 | 2052256 | 62480 | 1,6E+07 | 3,9E+09 | 5,13E+08 | 8214,666 | -4,32745 | 18,72678918 | | | | | | | | | | | | | |
| N | 5 | | Sum (Xi ²) | 88202,289 | (Sum Xi) ² | 237305,38 | Sum Xi | 487,14 | Sum Yi | 14832,837 | Sum (XiYi) | 2815728,1 | | | | | | | | | | | | | |
| | | | Sum Xi ² | 88202,289 | Sum Xi ³ | 19123224 | Sum Xi ⁴ | 4,414E+09 | Sum (Xi ² Yi) | 618847443 | Sum (Yi-Yc) ² | 9999,5956 | | | | | | | | | | | | | |
| | | | Sum (Yi ²) | 90184976 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Q _{xx} | 40741,2135 | | Média Xi (Xm) | 97,428 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Q _{xy} | 1370594,42 | | Média Yi (Ym) | 2966,56747 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Q _{x3} | 10529851,6 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Q _{x4} | 2858425493 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Q _{x2y} | 357189401 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <table border="1"> <tr> <td colspan="3">Coeficientes da Recta (a,b,c)</td> </tr> <tr> <td>c</td> <td>0,02154</td> <td></td> </tr> <tr> <td>b</td> <td>28,0732</td> <td></td> </tr> <tr> <td>a</td> <td>-148,598</td> <td></td> </tr> </table> | | | | | | | | | | | | | | Coeficientes da Recta (a,b,c) | | | c | 0,02154 | | b | 28,0732 | | a | -148,598 | |
| Coeficientes da Recta (a,b,c) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| c | 0,02154 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| b | 28,0732 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| a | -148,598 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Resíduos | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| S y= 70,7092483 70,7092483 | | | Teste F | | Graus de Liberdade | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | Grau de confiança | 0,99 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | Valor da Tabela | 0,0101 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

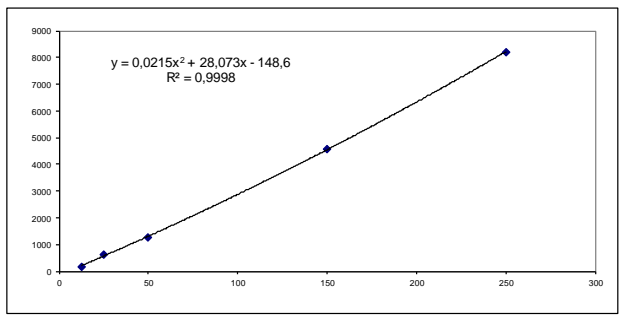


Figura 100. Folha de validação do método para a DIF no que diz respeito à curva polinomial.

| CASO EM QUE SE UTILIZA UMA CALIBRAÇÃO LINEAR | | | |
|--|-------------------|---------------|-------------|
| ordenada (a)= | -311,0539383 | declive (b) = | 33,64147273 |
| desvio residual da recta: S(y/x)= | 156,5768222 | K= | 3,3 |
| para 99,7% | | | |
| Limites de detecção | | | |
| LD (ug/kg) | 15,3591229 | | |
| 3,3*S(y/x)/b | | | |
| Limite de quantificação | | | |
| LQ (ug/kg) | 46,5427966 | | |
| 10*S(y/x)/b | | | |

Figura 101. Folha de validação do método para a DIF no que diz respeito ao cálculo dos limites analíticos.

B.2.5 Sarafloxacin

| 1.2. Linearidade | | | |
|--|-----------------|-----------------------------|----------------------|
| Curva de Regressão Linear | | Curva Polinomial de 2º Grau | |
| Sy ² | 9553,435336 | Sy ² | 9217,8002 |
| n-2 | 3 | n-3 | 2 |
| DS ² | 10224,70564 | Valor F tabelado | 15,977 |
| PG | 1,109235 | graus de liberdade | 4 |
| | | Probabilidade | 0,01 |
| <p>Decisão: A recta polinomial de 2º grau NÃO conduz a um ajuste significativamente melhor que a linear</p> | | | |
| 2. Calibração e características do método | | | |
| Declive (b) | 33,2805501 | | |
| Ordenada (a) | -296,5005685 | | |
| R | 0,999682584 | 0,9996826 | |
| R ² | 0,999365268 | | |
| Sy | 97,74167656 | | |
| Sxo | 2,93690087 | | |
| Vxo (%) | 3,014432063 | | |
| sb | 0,014550312 | | |
| sa | 1,932534406 | | |
| n-2 | 3 | | |
| t(n-2),95% | 3,182446305 | | |
| sb*t | 0,046305587 | | |
| sa*t | 6,150186979 | | |
| b= | 33,2805501 | +/- | 0,0463056 |
| a= | -296,5005685 | +/- | 6,150187 |
| | | | 0,1391371 CV% |

Figura 102. Folha de validação do método para a SAR no que diz respeito à regressão linear.

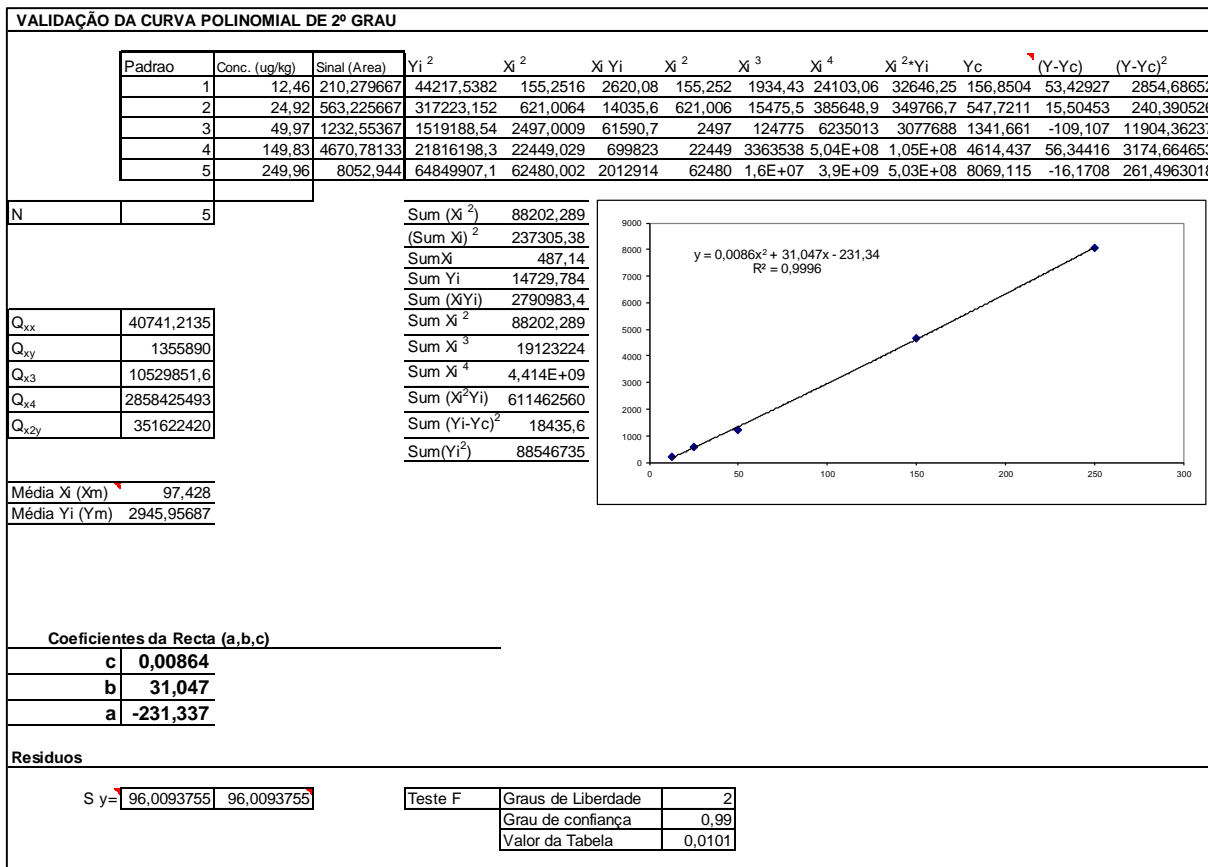


Figura 103. Folha de validação do método para a SAR no que diz respeito à curva polinomial.

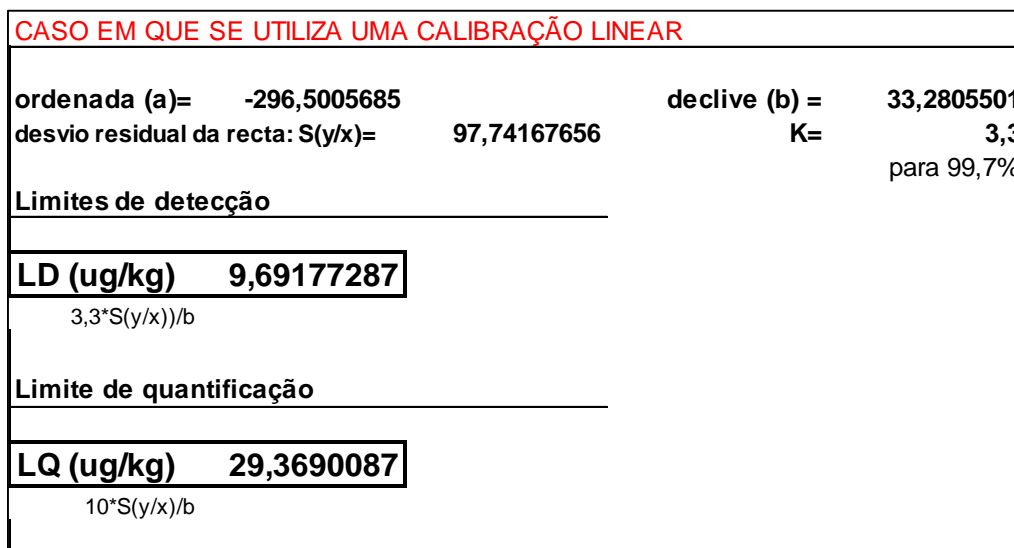


Figura 104. Folha de validação do método para a SAR no que diz respeito ao cálculo dos limites analíticos.

B.3 Quantificação das Amostras

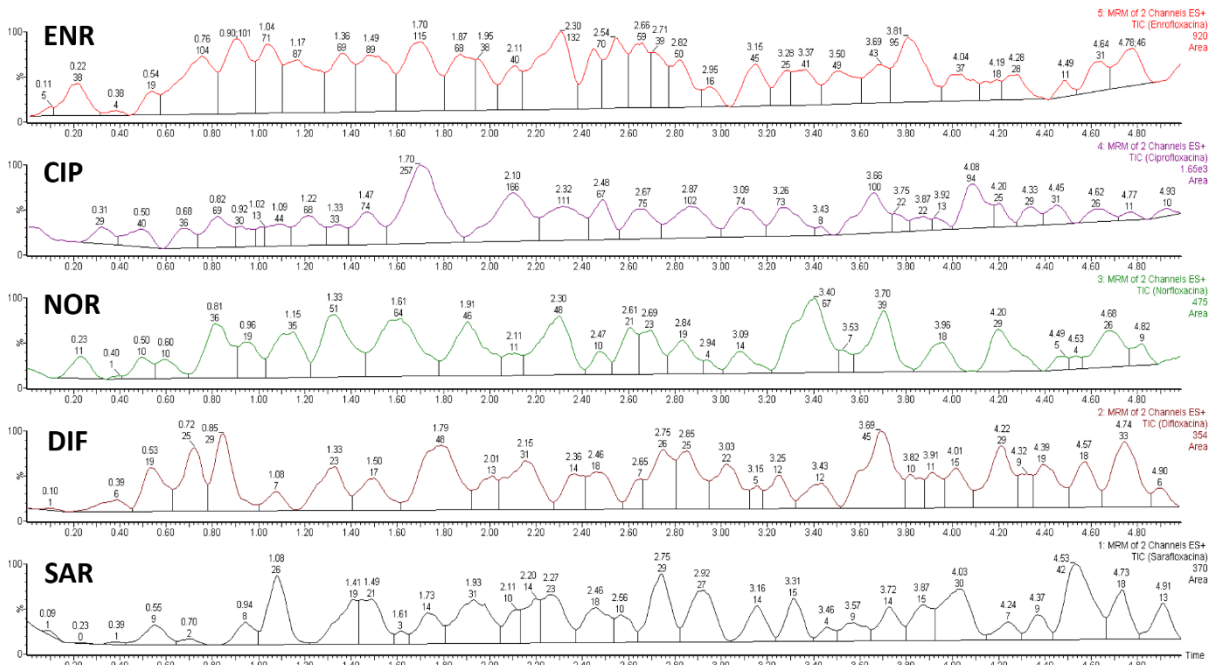


Figura 105. Cromatograma obtido após a análise do solo 1.

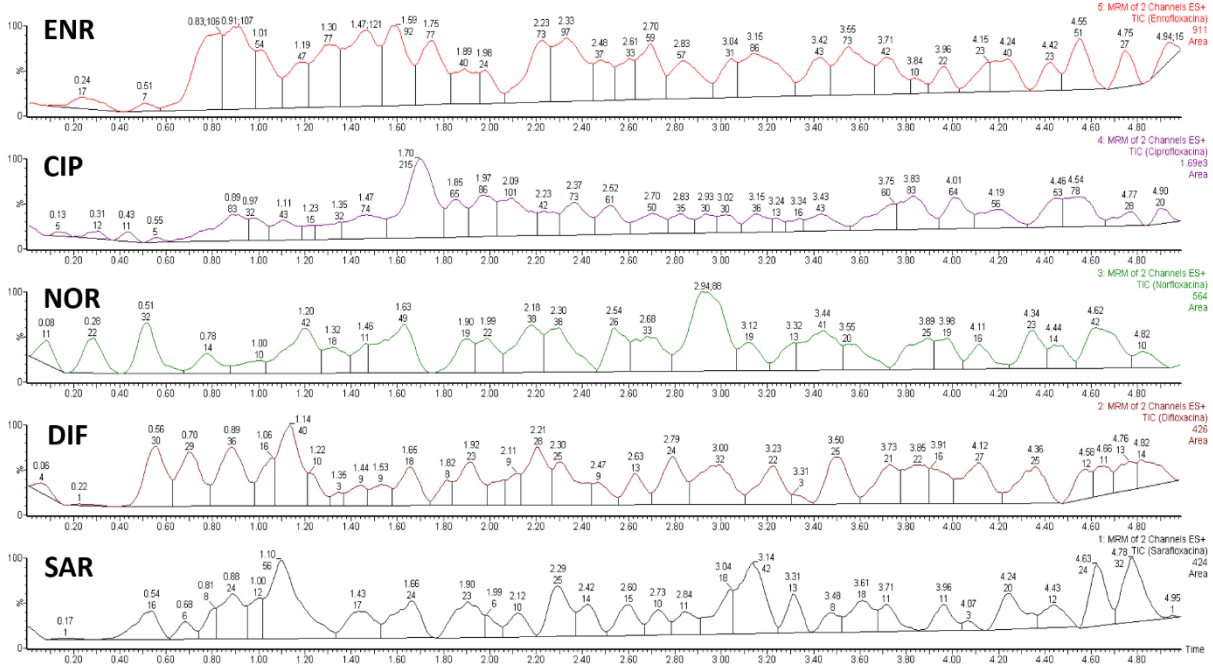


Figura 106. Cromatograma obtido após a análise do solo 2.

Anexos

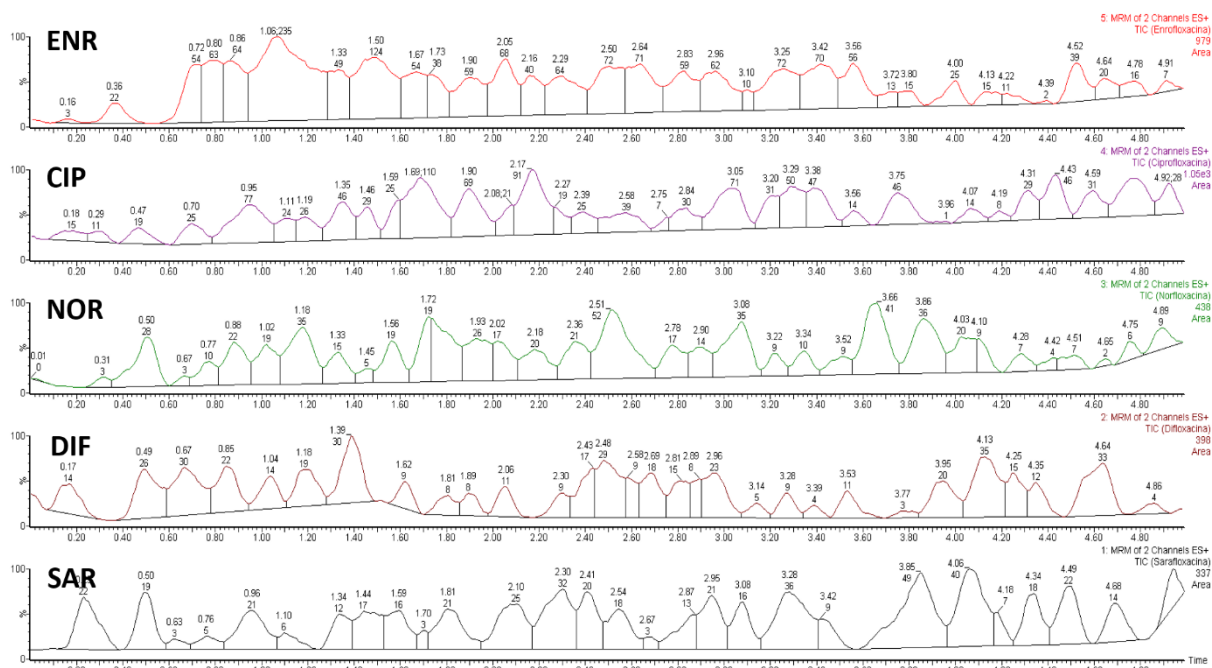


Figura 107. Cromatograma obtido após a análise do solo 3.

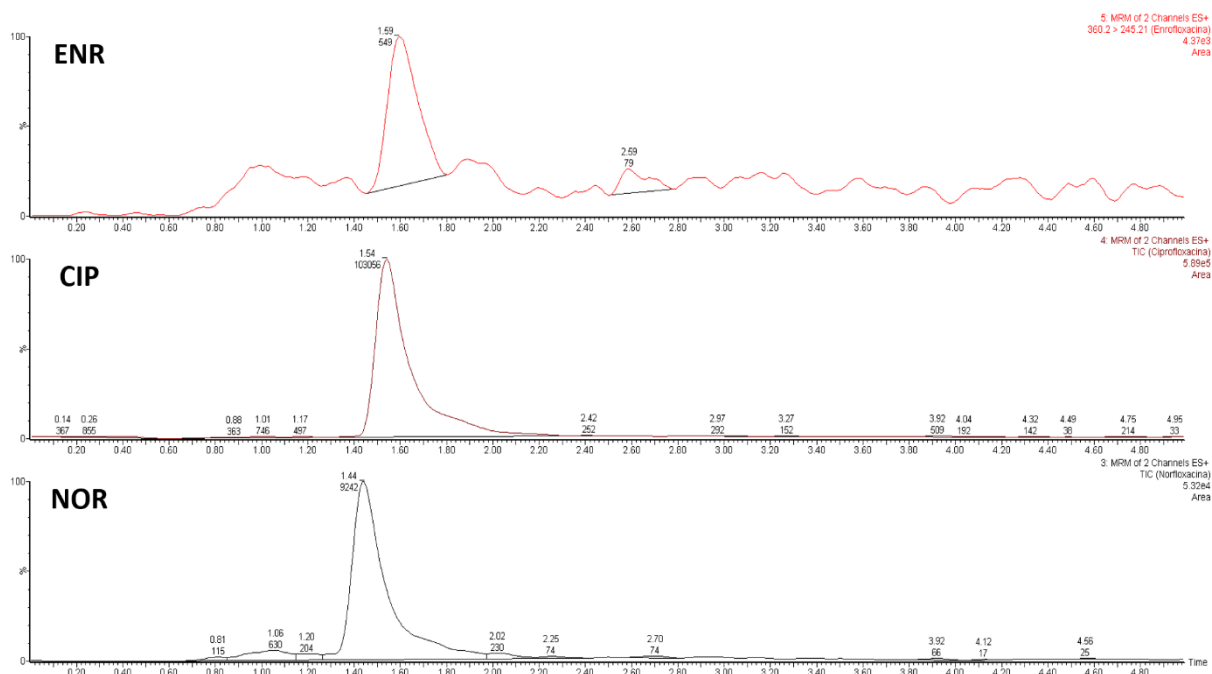


Figura 108. Cromatograma obtido (apenas para as FQs quantificáveis nesta amostra) após a análise da lama 1.

Anexos

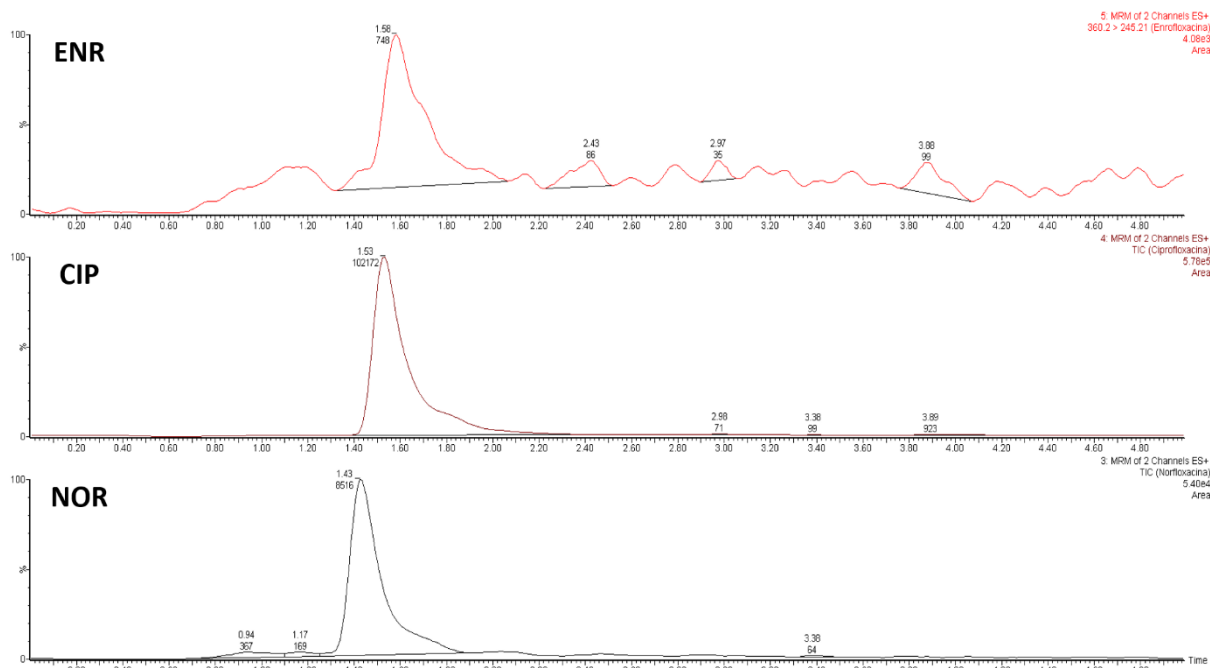


Figura 109. Cromatograma obtido (apenas para as FQs quantificáveis nesta amostra) após a análise da lama 2.

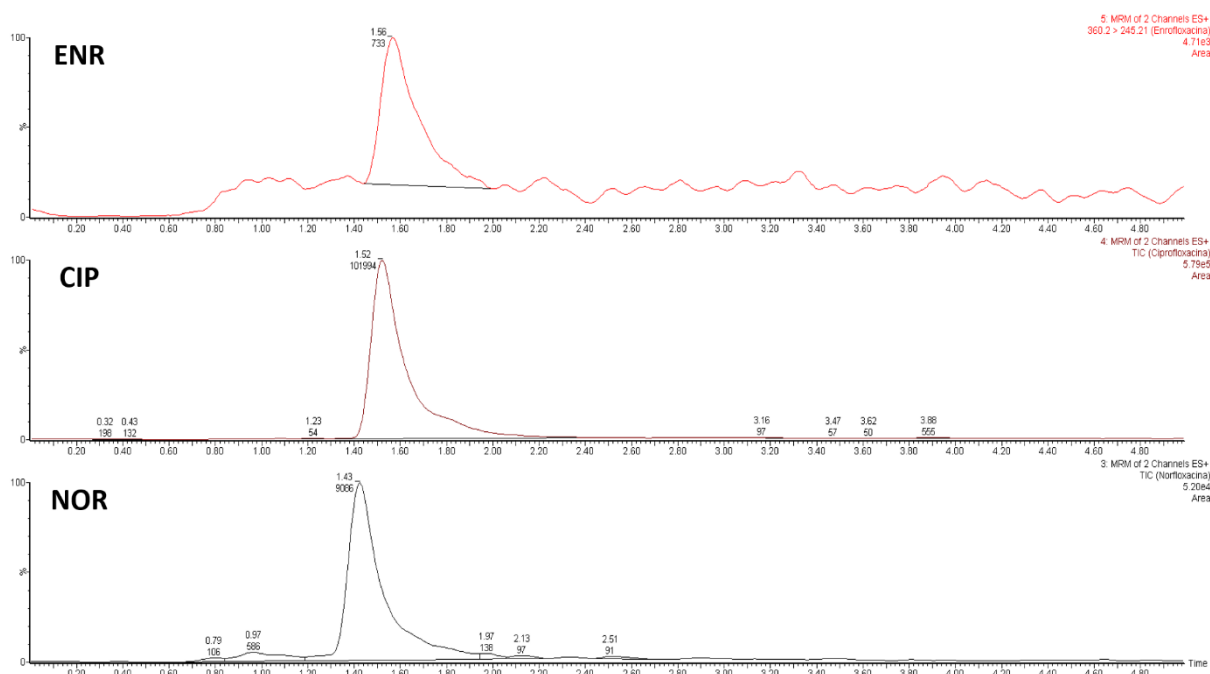


Figura 110. Cromatograma obtido (apenas para as FQs quantificáveis nesta amostra) após a análise da lama 3.

Anexos

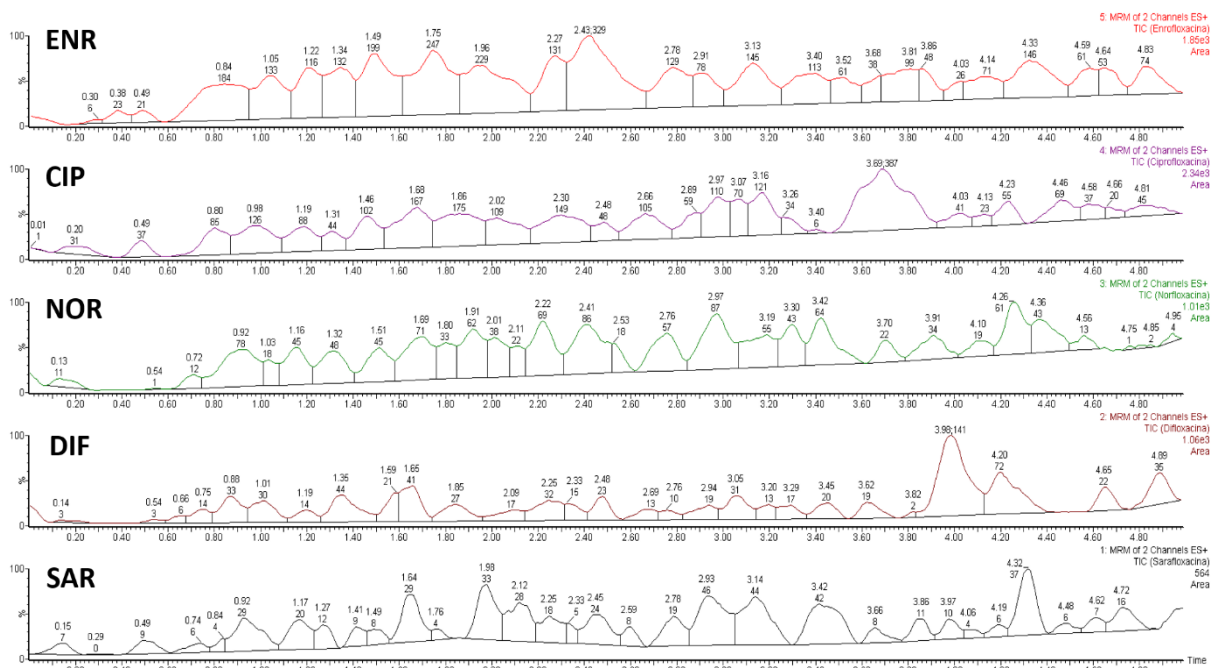


Figura 111. Cromatograma obtido após a análise do fertilizante 1.

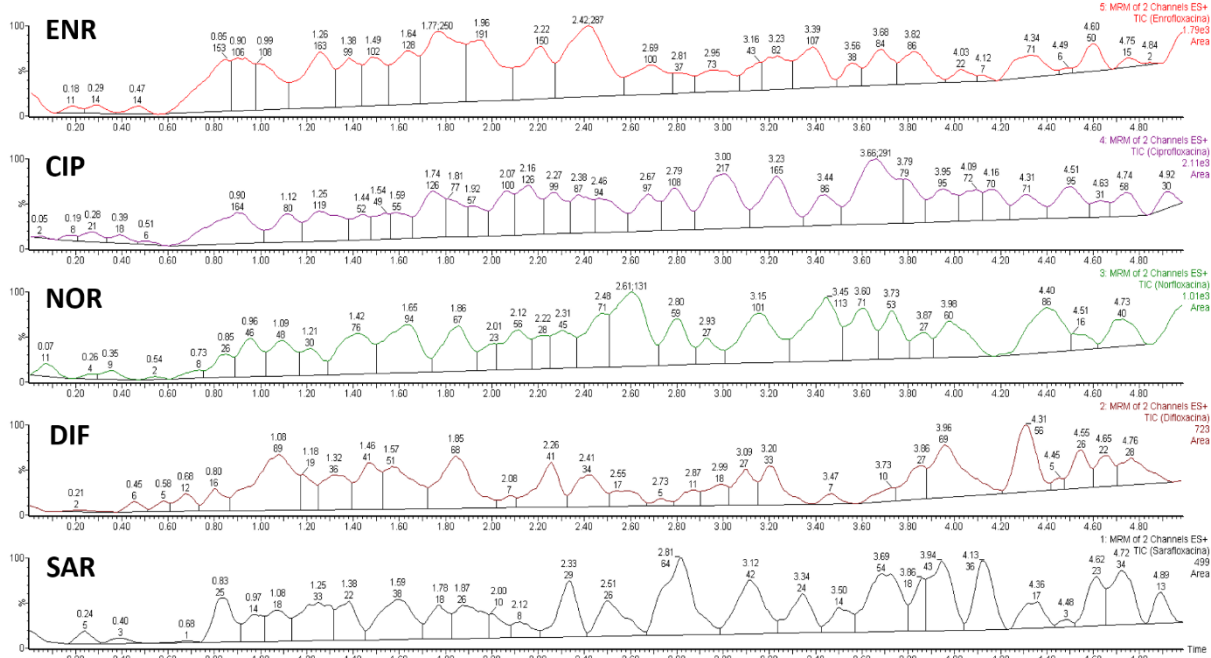


Figura 112. Cromatograma obtido após a análise do fertilizante 2.

Anexos

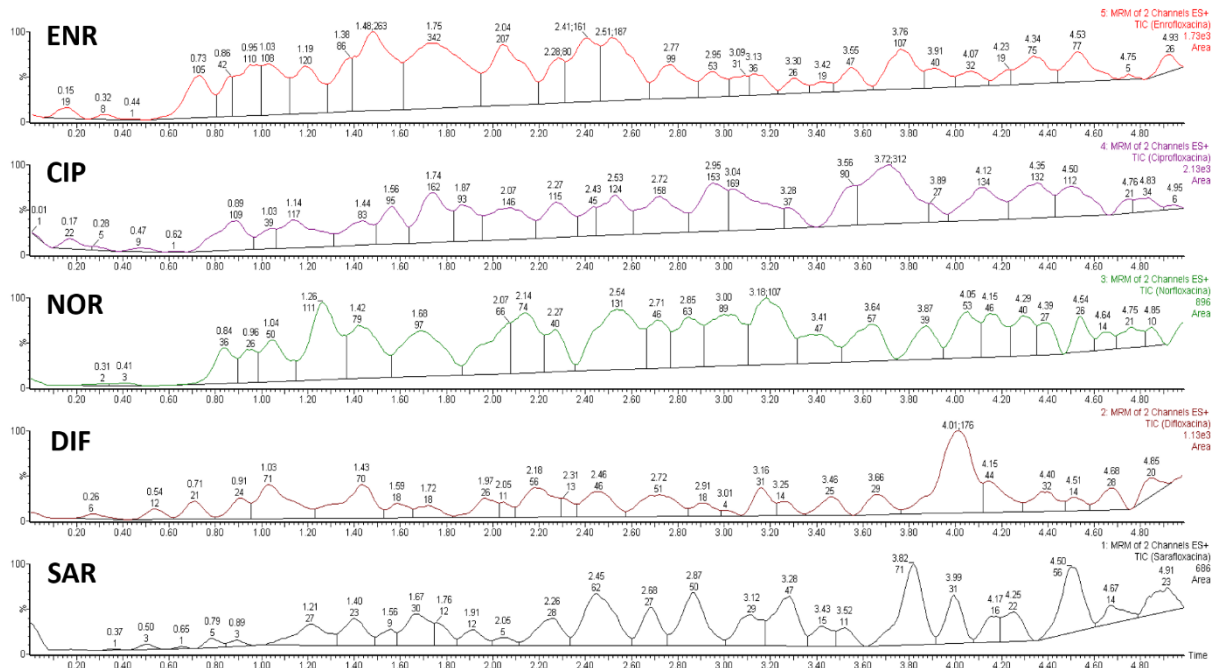


Figura 113. Cromatograma obtido após a análise do fertilizante 3.