



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS - EQA
CURSO DE QUÍMICA BACHARELADO

**MÉTODO VERDE PARA EXTRAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS DE
LODO DE ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ESGOTO (ETE)**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Álison Aline da Silva

Rio Grande

2018

**MÉTODO VERDE PARA EXTRAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS DE LODO DE
ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ESGOTO (ETE)**

Por

Álison Aline da Silva

Trabalho apresentado ao curso de Química Bacharelado da Universidade Federal do Rio Grande (FURG, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Bacharel em Química**.

Orientador(a): Ednei Gilberto Primel

Coorientador(a): Liziane Cardoso Marube

Rio Grande, RS, Brasil

2018

DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADE E AUTENTICIDADE

Eu, **Álison Aline da Silva**, declaro que este trabalho é de minha autoria, tendo sido elaborado com base nos recursos aos quais faço referência ao longo do texto e experiências no decorrer do referido trabalho.

Assinatura do Orientando

Rio Grande, 12 de dezembro de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel
Universidade Federal do Rio Grande - FURG

Avaliadora: Prof. Dr^a. Daiane Dias
Universidade Federal do Rio Grande - FURG

Avaliadora: Dr^a. Maristela Barnes Rodrigues Cerqueira
Universidade Federal do Rio Grande - FURG

*A persistência é o caminho do êxito.
(Charles Chaplin)*

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel**, pela orientação e auxílio no desenvolvimento do trabalho, compreensão, e pelos incentivos desde a iniciação científica.

À minha co-orientadora, **Dr^a Liziane**, por me ajudar a sair do zero neste trabalho e ter me dado tantas ideias para desenvolvê-lo. Agradeço também pela sua amizade durante todo o tempo que estive no laboratório, pelas sessões de psicologia, pelas suas conversas engraçadas e pela sua preocupação.

À **Dr^a. Sergiane**, por sua orientação desde o meu início no laboratório, sempre me auxiliando na resolução dos problemas e respondendo minhas dúvidas, acima de tudo agradeço o grande auxílio na finalização deste trabalho e por estar sempre disposta a me ajudar tanto profissionalmente quanto na vida pessoal. Além disso, pela sua amizade e empolgação para os jogos de vôlei e festas do laboratório.

À **Prof. Dr^a. Daiane Dias**, que além de participar da banca deste trabalho, contribuiu durante a graduação com a minha formação profissional. Muito obrigada!

À **Dr^a. Maristela**, além de participar da banca deste trabalho, sempre esteve a disposição para esclarecer dúvidas e dar sugestões, desde os tempos de seminário. Muito obrigada!

Aos meus pais, **Claudio (*in memoriam*) e Lorinda**, por terem me incentivado a estudar desde criança, pelo apoio nas minhas decisões e por todas as preocupações que tiveram comigo. Agradeço o carinho e amor que nunca me faltou, e por todos os esforços realizados para que hoje esse sonho pudesse se realizar. Amo vocês!

Ao meu namorado, **Davi**, pelo apoio e incentivo. Por suportar todas as minhas crises e me fazer manter a calma, por tornar minha vida em Rio Grande menos solitária, por todos os momentos de descontração que tivemos, incluindo os clássicos lanches de final de semana, as idas ao cinema, pelos jogos “zerados” e maratonas de série. Obrigada por tudo, te amo, uai!

Aos colegas do **LACOM**, pela amizade, conversas, churrascos e todos os momentos de descontração. Além disso, por todo o auxílio do time MSPD no preparo das amostras deste trabalho. Obrigada por todo o apoio!

Ao pessoal do **LAMCA**, por disponibilizar a centrífuga de microtubos todas as vezes que precisei. Valeu pessoal!

À **CORSAN**, por disponibilizar as amostras de lodo de ETE.

Às minhas amigas, **Thyelle e Larissa**, por serem eternamente as minhas “irmãzinhas que brigam”. Por terem se tornado a minha família em Rio Grande, por terem me ajudado a passar o primeiro ano longe de casa, sofremos as três juntas. Por todas as festas, as conversas madrugada adentro, os vídeos engraçados e as “brigas” a caminho do RU nos finais de semana. Obrigado por tudo isso, amo vocês!

Aos meus amigos, **Ana, Arlei, Chay, Lari, Namy e Thy**, por terem sido os melhores colegas de república desses quatro anos. Obrigada por todas as jantãs, filmes de terror, idas ao cinema e ao mercado, e fofocas no quarto da Lari. Tudo aquilo que fazíamos juntos era diversão e sempre guardarei na memória todos os momentos bons que compartilhamos. Amo vocês e sentirei muitas saudades!

À minha amiga e colega, **Cassiane**, minha “irmã de enxaqueca”. Por ter entrado na minha vida para me mostrar que eu tinha uma gêmea perdida em Sarandi, por todas as vezes que fomos “várzear” no morrinho no intervalo do almoço, por suportar minhas crises e loucuras, e principalmente por não desistir dessa pessoa grossa que sou. Obrigada pelo ombro amigo, por ouvir meus problemas e áudios infinitos no whats, e se preocupar comigo. Sofremos juntas nas disciplinas, choramos, mas também comemoramos muito as aprovações. Amo você e sentirei muita saudade de tudo isso!

À minha amiga e ex colega, **Carol**, pela sua amizade construída na primeira aula de cálculo do primeiro ano de curso e que levarei pra toda vida, por ser a melhor carioca que já conheci, por ter me apoiado tantas vezes não me deixando desistir das disciplinas, por todas as vezes que me ouviu falar incessantemente a caminho da FURG e rindo do meu sotaque, por ter me recebido tão bem na sua casa, e por todas as vezes que mesmo longe, compartilhamos as sofrências da faculdade pelo whats. Sei que a nossa amizade é para toda a vida. Amo você e sinto sua falta!

À mais nova amiga e colega de laboratório **Marisa**, obrigada por toda a ajuda neste trabalho, por todas as dicas e sugestões, e por estar disponível para tirar minhas dúvidas até mesmo pelo whats. Obrigada por tudo e sucesso!

À minha amiga **Karina**, por ser essa pessoa ogra, que logo ao entrar no laboratório me assustava e com a convivência se tornou essa pessoa super alto astral que és, por ser divertida e tornar os dias no laboratório mais leves, por me entender e sempre me incentivar a buscar o melhor. Pela sua preocupação e incentivo para este trabalho, mesmo estando na Espanha, pelas mensagens motivacionais e por participar dar melhores “indiadas” (EDEQ). Obrigada por tudo, saudades!

RESUMO

MÉTODO VERDE PARA EXTRAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS DE LODO DE ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ESGOTO (ETE)

Autor: Álisson Aline da Silva

Orientador: Ednei Gilberto Primel

Rio Grande, 12 de dezembro de 2018

O desenvolvimento de métodos para determinação de antibióticos em diferentes amostras torna-se cada vez mais importante no âmbito analítico, visto que estes compostos vêm se tornando biopersistentes no ambiente e pelo fato de que podem ser prejudiciais à saúde humana. Quando se trata da análise de antibióticos em lodo de ETE, o estudo torna-se muito importante, visto que, até o momento não existe legislação para o controle desses compostos em lodo, o qual muitas vezes é descartado em locais onde, se contaminado, acabam contaminando o meio ambiente. Nesse trabalho, estudou-se a técnica de Dispersão da Matriz em Fase Sólida assistida por Vórtex (VA-MSPD) para a extração de antibióticos de amostras de lodo de ETE utilizando água como solvente de extração e areia como suporte sólido. As determinações foram realizadas por Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas em série (LC-MS/MS). Todas as curvas analíticas apresentaram boa linearidade, com coeficientes de correlação (r) superiores a 0,99. Em relação à exatidão e precisão, o método apresentou recuperações entre 15 e 99%. A precisão foi expressa pelo RSD, apresentando valores menores que 32%. O efeito matriz (EM) foi de baixo a alto, variando de -54 a 781%. O método desenvolvido apresentou potencial para a determinação de antibióticos em amostras de lodo, tendo em vista as dificuldades de extração desses compostos, apresentando as vantagens de ser barato, utilizar suporte sólido e solvente verde, além de gerar menores volumes de resíduos quando comparados aos métodos tradicionalmente empregados.

Palavras chaves: antibióticos; lodo de ETE; método verde; VA-MSPD, LC-MS/MS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas da MSPD (adaptado de CALDAS et al., 2013b).....	26
Figura 2. Etapas da MSPD assistida por vórtex adaptado de CALDAS et al., 2013b.	27
Figura 3. Vista superior da ETE-CORSAN Parque Marinha, Rio Grande/RS (adaptado de Google Earth, 2018)	30
Figura 4. Leito de secagem.....	31
Figura 5. Cromatograma total de compostos no modo ESI+ e ESI- na condição otimizada para o padrão no extrato na concentração de 1 mg L ⁻¹	38
Figura 6. Cromatograma das transições de quantificação dos analitos no modo SRM empregando as condições da Tabela 5. Concentração da mistura 1 mg L ⁻¹	39
Figura 7. Estrutura dos analitos selecionados para o estudo	40
Figura 8. Efeito do suporte sólido na recuperação da MSPD de antibióticos em lodo de ETE. (Massa de amostra: 0,5 g; massa de suporte sólido: 0,5 g; volume de solvente (água ultrapura 100 °C, pH neutro): 5 mL; vórtex: 1 min; centrifugação: 5 min a 8000 rpm). As barras indicam valores de RSD. Médias seguidas por letras iguais, para o mesmo analito, não apresentam diferença estatística significativa (p>0,05) pelo teste de Tukey com significância de 95%	42
Figura 9. Efeito da temperatura do solvente na recuperação da MSPD de antibióticos em lodo de ETE. (Massa de amostra: 0,5 g; massa de suporte sólido (areia): 0,5 g; volume de solvente (água ultrapura, pH neutro): 5 mL; vórtex: 1 min; centrifugação: 5 min a 8000). As barras indicam valores de RSD. Médias seguidas por letras iguais, para o mesmo analito, não apresentam diferença estatística significativa (p>0,05) pelo teste de Tukey com significância de 95%	44
Figura 10. Efeito do pH do solvente (água ultrapura 100 °C) na recuperação da MSPD de antibióticos em lodo de ETE. (Massa de amostra: 0,5 g; massa de suporte sólido (areia): 0,5 g; volume de solvente: 5 mL de água ultrapura 100 °C; vórtex: 1 min; centrifugação: 5 min a 8000). As barras indicam valores de RSD. Médias seguidas por letras iguais, para o mesmo analito, não apresentam diferença estatística significativa (p>0,05) pelo teste de Tukey com significância de 95%	45
Figura 11. Efeito do tempo de agitação na recuperação da MSPD de antibióticos em lodo de ETE. (Massa de amostra: 0,5 g; massa de suporte sólido (areia): 0,5 g; volume de solvente: 5 mL de água ultrapura 100 °C (pH 2); centrifugação: 5 min a 8000 rpm. As barras indicam	

valores de RSD. Médias seguidas por letras iguais, para o mesmo analito, não apresentam diferença estatística significativa ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey com significância de 95%47

Figura 12. Efeito do solvente na recuperação da MSPD de antibióticos em lodo de ETE. (Massa de amostra: 0,5 g; massa de suporte sólido (areia): 0,5 g; volume de solvente: 5 mL; vórtex 3 min; centrifugação: 5 min a 8000 rpm. As barras indicam valores de RSD. Médias seguidas por letras iguais, para o mesmo analito, não apresentam diferença estatística significativa ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey com significância de 95%48

Figura 13. VA-MSPD otimizada para determinação de antibióticos em lodo de ETE (Autoria própria, 2018)49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Trabalhos que investigaram contaminações por alguns antibióticos em diferentes matrizes.....	21
Tabela 2. Trabalhos utilizaram MSPD para extração de PPCPs e drogas ilícitas	27
Tabela 3. Condições do detector MS/MS	31
Tabela 4. Modo de ionização, transições monitoradas, energias de cone e de colisão, e t_R para cada analito	32
Tabela 5. Gradiente de eluição empregado para análise de antibióticos por LC-MS/MS.....	32
Tabela 6. Propriedades físico-químicas dos analitos, assim como suas respectivas classes e CAS	40
Tabela 7. LOQ e LOD instrumentais e do método.....	49
Tabela 8. Curvas analíticas no solvente e no extrato, faixas de trabalho e coeficientes de correlação linear	50
Tabela 9. Efeito matriz (EM) para os analitos em estudo.	50
Tabela 10. Recuperação (R%) e precisão (RSD) para os analitos em estudo	52

LISTA DE SIGLAS

ABNT: Associação Brasileira de Normas Técnicas.

C₁₈: Sílica modificada com hidrocarboneto linear C₁₈, octadecilsilano.

CAS: *Chemical Abstract Service*.

CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente.

CORSAN: Companhia Riograndense de Saneamento.

ESI: Ionização por eletrospray, do inglês *Electrospray Ionization*.

ETE: Estação de Tratamento de Esgoto.

HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*).

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

IUPAC: União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*.

K_{oc}: coeficiente de partição de carbono orgânico.

K_{ow}: coeficiente de partição octanol-água.

LC-MS: Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas, do inglês *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*.

LC-MS/MS: Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série do inglês, *Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry*.

m/z: razão de massas por cargas elétricas.

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

MSPD: Dispersão da matriz em fase sólida, do inglês *Matrix Solid Phase Dispersion*.

MeCN: Acetonitrila.

MeOH: Metanol.

NBR: Norma Brasileira.

OMS: Organização Mundial de Saúde.

pH: Potencial hidrogeniônico.

pK_a: Potencial de dissociação ácida.

POA: Processos Oxidativos Avançados.

PPCPs: Fármacos e produtos de cuidado pessoal, do inglês *Pharmaceuticals and Personal Care Products*.

r: Coeficiente de correlação linear.

RSD: Desvio Padrão Relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*.

SPE: Extração em fase sólida, do inglês, *Solid Phase Extraction*.

SRM: Monitoramento de Reações Seleccionadas, do inglês *Selected Reaction Monitoring*.

USE: Extração Assistida por Ultrassom (USE, do inglês *Ultrasound-Assisted Extraction*)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	18
	2.1 Geral	18
	2.2 Específicos	18
3	REFERENCIAL TEÓRICO	19
	3.1 Antibióticos	19
	3.2 Excreção dos fármacos.....	20
	3.3 Contaminação por fármacos	20
	3.4 Lodo de estação de tratamento de esgoto	22
	3.5 Técnicas de preparo de amostras.....	23
	3.5.1 Química Analítica Verde	24
	3.5.2 Dispersão da matriz em fase sólida (MSPD).....	25
4	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	28
	4.1 Instrumentação	28
	4.2 Reagentes, solventes e materiais.....	29
	4.3 Preparo das soluções analíticas	29
	4.4 Seleção dos analitos	30
	4.5 Amostras de Lodo de ETE.....	30
	4.6 Condições cromatográficas.....	31
	4.6.1 Preparo da fase móvel.....	32
	4.7 Otimização do preparo de amostra por VA-MSPD para extração de antibióticos em lodo de ETE.....	32
	4.7.1 Avaliação do tipo de suporte sólido	33
	4.7.2 Avaliação da temperatura do solvente extrator	33
	4.7.3 Avaliação do pH do solvente extrator	33
	4.7.4 Avaliação do tempo de agitação por vórtex	34
	4.7.5 Avaliação da extração com diferentes solventes	34
	4.8 Validação do método	34
	4.8.1 Limite de Detecção e Limite de Quantificação	34
	4.8.2 Curvas analíticas e Linearidade.....	34
	4.8.3 Efeito Matriz.....	35
	4.8.4 Exatidão	35

4.8.5	Precisão.....	36
4.9	Tratamento estatístico dos dados.....	36
4.10	Resíduos.....	37
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1	Separação cromatográfica.....	38
5.2	Analitos selecionados.....	39
5.3	Otimização do preparo de amostra por VA-MSPD para extração de antibióticos de lodo de ETE.....	41
5.3.1	Avaliação do tipo de suporte sólido	41
5.3.2	Avaliação da temperatura do solvente extrator	43
5.3.3	Avaliação do pH do solvente extrator	45
5.3.4	Avaliação do tempo de agitação por vórtex	46
5.3.5	Avaliação da extração com diferentes solventes	47
5.3.6	VA-MSPD otimizada	48
5.4	Validação do método	49
5.4.1	Limites de quantificação e determinação	49
5.4.2	Curva analítica e linearidade	49
5.4.3	Efeito Matriz.....	50
5.4.4	Exatidão e precisão.....	51
6	CONCLUSÕES.....	53
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1 INTRODUÇÃO

A presença de resíduos de fármacos em matrizes ambientais tem gerado grande interesse de pesquisadores, devido a frequência com que estão sendo encontrados em efluentes e águas naturais, considerados contaminantes emergentes (VOSOUGH; ONILGHI; SALEMI, 2016). Uma das maiores características dos fármacos, principalmente dos antibióticos, é a persistência de suas propriedades terapêuticas, deste modo, a contaminação destes compostos em matrizes ambientais representa uma grande ameaça aos ecossistemas e à saúde humana, podendo gerar bioacumulação e, ainda, ocasionar resistência a antibióticos entre bactérias ambientais e patógenos humanos (YANG *et al.*, 2018).

O consumo de antibióticos vai além da saúde humana, são muito utilizados também na medicina veterinária e até mesmo na aquicultura (YANG *et al.*, 2018).

Os antibióticos podem atingir o meio ambiente por diversas fontes, sendo a principal delas a excreção humana, e por consequência os esgotos domésticos. As propriedades físico químicas destes compostos determinam as suas afinidades em estarem presentes em amostras de sedimento ou água, deste modo, muitos compostos apresentam grande tendência em se aderirem ao lodo durante os tratamentos nas Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs).

O lodo de ETE, vêm sendo utilizado para fins agrícolas e florestais, devido a sua riqueza em matéria orgânica, micro e macronutrientes que o tornam nutritivo para as plantas e um bom fertilizante. Entretanto, este resíduo apresenta contaminantes como metais potencialmente tóxicos, compostos orgânicos persistentes e emergentes, assim como microrganismos patogênicos ao homem (BETTIOL; CAMARGO, 2006), sendo necessário realizar um preparo de amostra eficiente para se determinar a presença desses contaminantes antes da sua utilização.

O preparo de amostras ambientais tem por objetivo isolar/concentrar os analitos de uma matriz para que possam ser determinados posteriormente, além de reduzir/eliminar os interferentes (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

Em 1989, a técnica de preparo de amostras de dispersão da matriz em fase sólida (MSPD, do inglês *Matrix Solid Phase Dispersion*) foi desenvolvida por Steven Barker e colaboradores para extração de fármacos em tecidos biológicos (BARKER; LONG; SHORT, 1989). A técnica surgiu como uma alternativa à extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid-Phase Extraction*), para extração de contaminantes em amostras sólidas e semissólidas, pois na SPE a amostra necessita estar em estado líquido e homogêneo (BARKER, 2000), e também como uma alternativa ao Soxhlet, uma técnica que consome grandes volumes de solventes orgânicos para

grandes quantidades de amostra e um longo tempo de extração (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

Buscando diminuir os problemas relacionados ao empacotamento do cartucho e o tempo de extração, foram realizadas modificações na técnica. Caldas e colaboradores (2013), desenvolveram a MSPD assistida por vórtex (VA-MSPD), que substituiu a etapa de empacotamento por uma etapa de agitação por vórtex (CALDAS *et al.*, 2013b), o que melhorou a dispersão da amostra no solvente extrator aumentando a superfície de contato.

Considerando o grande consumo mundial de antibióticos e os possíveis efeitos que eles podem causar ao homem e ao meio ambiente, esse trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e a validação de um método ambientalmente amigável empregando a VA-MSPD para extração e determinação de antibióticos em amostras de lodo de ETE. Durante o desenvolvimento do trabalho foram considerados os preceitos da Química Analítica Verde, buscando o uso de materiais adsorventes alternativos e a diminuição do uso de solventes tóxicos, utilizando água como solvente de extração, além da geração de resíduos de menor toxicidade.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Desenvolver um método para extração de antibióticos de lodo de ETE por VA-MSPD e determinação por Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas em série (LC-MS/MS, do inglês *Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry*), considerando os preceitos da Química Analítica Verde.

2.2 Específicos

- Selecionar os analitos para estudo, considerando a diversidade de propriedades físico-químicas, as diferentes aplicações e ocorrência em amostras ambientais;
- Otimizar um método para extração de antibióticos de lodos de ETE por VA-MSPD avaliando os principais parâmetros da técnica;
- Validar o método analítico desenvolvido, avaliando as seguintes figuras de mérito: curva analítica, linearidade, limites de detecção e quantificação, exatidão, precisão e efeito matriz;

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Antibióticos

Os antibióticos são uma das classes de medicamentos mais consumidos no mundo e frequentemente tem se relatado a presença destes contaminantes em efluentes de ETE (Tabela 1). O uso excessivo e indevido de antibióticos são fatores que contribuem para o surgimento e disseminação da resistência bacteriana. A Organização Mundial da Saúde (OMS) está ciente dos danos e um programa foi lançado em abril de 2011, intitulado “Contra a resistência aos medicamentos: sem ação hoje, sem medicamentos disponíveis amanhã” (ZHANGA *et al.*, 2018).

Embora a maioria dos antibióticos seja degradada eventualmente na natureza, o uso contínuo do antibiótico causou a chamada "pseudo-persistência". Em termos de efeitos tóxicos, os antibióticos no ambiente aquático podem aumentar a resistência dos microorganismos nocivos (SHI *et al.*, 2014).

Antibióticos são produtos metabólicos de microrganismos, sendo considerados como compostos químicos derivados de organismo vivo ou produzido por este e que é capaz, em baixas concentrações, de inibir processos vitais de micro-organismos (KOROLKOVAS; BURKHALTER, 2008).

Dentre as diversas classes de antibióticos, temos as sulfonamidas, também chamadas de sulfanilamidas ou sulfas, são fármacos derivados do ácido sulfanílico muito utilizados no tratamento de infecções bacterianas e que possuem baixa solubilidade em água (KOROLKOVAS; BURKHALTER, 2008). Seu mecanismo de ação se baseia na inibição da enzima diidropteroato-sintetase, essencial na síntese do ácido fólico, um intermediário importante na síntese do material genético bacteriano cuja ausência paralisa o desenvolvimento destes microrganismos (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

O cloranfenicol é um antibiótico de amplo espectro da classe dos anfenicóis. Este antibiótico age, principalmente, como bacteriostático, interferindo na síntese proteica bacteriana e é ativo contra gram-positivos, gram-negativos e anaeróbios (KOROLKOVAS; BURKHALTER, 2008; MELO *et al.*, 2012). Seu uso, fabricação e comercialização foram proibidos no Brasil de acordo com a Instrução Normativa 9/2003 (MAPA, 2003) devido aos efeitos colaterais que ele promove, como as alterações hematológicas e anemia aplásica (DEL FIOLE, 2007).

A eritromicina é um antibiótico da classe dos macrolídeos, sendo ativa contra a maior parte das bactérias Gram-positivas e alguns organismos Gram-negativos (KOROLKOVAS; BURKHALTER, 2008). Os antibióticos da classe dos macrolídeos são produzidos por espécies de *Streptomyces* e se caracterizam por um amplo anel contendo um grupo funcional lactona e uma sequência de duplas ligações conjugadas, que constituem sua fração cromófora.

3.2 Excreção dos fármacos

A excreção dos fármacos é dada pela saída destes do organismo, tanto na forma original quanto na forma de seus metabólitos. Os fármacos e compostos xenobióticos sofrem biotransformação antes da sua excreção pelo corpo. Os compostos hidrofílicos são excretados mais facilmente, pois as reações de biotransformação normalmente aumentam a hidrofilicidade destes para facilitar sua excreção (TANIGUCHI; GUENGERICH, 2014).

As vias de excreção de fármacos são: rins (urina), pulmões (expiração), leite, saliva, suor, e fezes (LARINI, 2008). O sistema renal e o cólon são as principais vias de excreção de fármacos. Através do cólon são eliminados os fármacos que não são absorvidos ao longo do tubo intestinal (DELUCIA *et al.*, 2014).

O sulfametoxazol é excretado aproximadamente 15% inalterado, enquanto que a eritromicina cerca de 60% e o cloranfenicol entre 5 e 10%, sendo que de 70 a 90% deste é excretado na forma de glicuronídeos, fração dos metabólitos que contém grupamentos fenol, carboxil ou álcool (HIRSCH *et al.*, 1999).

3.3 Contaminação por fármacos

Os fármacos são desenvolvidos para serem resistentes e para que suas propriedades terapêuticas sejam mantidas. Após a administração uma parte é excretada por humanos no esgoto doméstico e acabam não sendo removidas nas ETEs, tornando-se persistentes no meio ambiente (BILA; DEZOTTI, 2003).

O desenvolvimento desenfreado da produção de fármacos na Segunda Guerra Mundial intensificou a contaminação de recursos hídricos por compostos xenobióticos (AMÉRICO *et al.*, 2012). A geração nascida entre 1950 e 1960 foi a primeira a sofrer os efeitos desta exposição, no desenvolvimento intrauterino, principalmente devido ao estoque disponível

destas substâncias no tecido adiposo materno, apenas recentemente foi possível avaliar o impacto, em longo prazo, desta exposição na saúde humana (GHISELLI; JARDIM, 2007).

A presença de resíduos de fármacos em matrizes ambientais tem gerado grande interesse de pesquisadores, devido a frequência com que se vem encontrando esses compostos em efluentes de ETEs e águas naturais, por esse motivo eles são considerados contaminantes emergentes (VOSOUGH; ONILGHI; SALEMI, 2016). Em todo o mundo, análises em esgoto doméstico, águas superficiais e solos detectaram a presença de fármacos como antibióticos, anestésicos, hormônios, anti-inflamatórios entre outros (UEDA; TAVERNARO; MAROSTEGA, 2010).

Os antibióticos não são usados apenas como remédios para humanos, mas também são amplamente usados na criação de animais e na aquicultura. Quando lançados involuntariamente no meio ambiente representam uma grande ameaça aos ecossistemas e à saúde humana, podendo se acumular nas teias alimentares e, ainda, seus genes de resistência a antibióticos podem ser transferidos entre bactérias ambientais e patógenos humanos (YANG *et al.*, 2018).

Como pode ser observado na Tabela 1, os antibióticos vêm sendo detectados nas mais variadas matrizes, desde alimentos até amostras ambientais, e em concentrações de até 6000 ng L⁻¹.

Tabela 1. Trabalhos que investigaram contaminações por alguns antibióticos em diferentes matrizes

<i>Analito</i>	<i>Amostra</i>	<i>Concentração encontrada (ng g⁻¹ e ng L⁻¹)</i>	<i>País</i>	<i>Referência</i>
Cloranfenicol	Efluente de ETE	560	Alemanha	(HIRSCH <i>et al.</i> , 1999)
	Água de superfície	60		
	Sedimento	9,42	China	(JIA <i>et al.</i> , 2018)
	Água de superfície	32,6		
Eritromicina	Efluente de ETE	6000	Alemanha	(HIRSCH <i>et al.</i> , 1999)
	Água de superfície	1700		
	Água de superfície	190	Alemanha	(CHRISTIAN <i>et al.</i> , 2003)
	Lodo de ETE	55,8	China	(LI <i>et al.</i> , 2013)
	Sedimento	201	China	(JIA <i>et al.</i> , 2018)
	Água de superfície	300	EUA	(MAGEE <i>et al.</i> , 2018)
	Água do mar	3	Antártica	(HERNÁNDEZ <i>et al.</i> , 2019)

Tabela 1. Trabalhos que investigaram contaminações por alguns antibióticos em diferentes matrizes (continuação)

<i>Analito</i>	<i>Amostra</i>	<i>Concentração encontrada (ng g⁻¹ e ng L⁻¹)</i>	<i>País</i>	<i>Referência</i>
Sulfadiazina	Esterco de frango	20000	Áustria	(MARTÍNEZ-CARBALLO <i>et al.</i> , 2007)
	Esterco de Peru	91000	China	(LI <i>et al.</i> , 2013)
	Sedimento	7,10	China	(JIA <i>et al.</i> , 2018)
	Água de superfície	36,8		
Sulfametoxazol	Água de superfície	480	Alemanha	(HIRSCH <i>et al.</i> , 1999)
	Águas subterrâneas	470		
	Água de superfície	52	Alemanha	(CHRISTIAN <i>et al.</i> , 2003)
	Lodo de ETE	17	China	(LI <i>et al.</i> , 2013)
Efluente de ETE	2000			
Sulfametazina	Águas subterrâneas	160	Alemanha	(HIRSCH <i>et al.</i> , 1999)
	Milho	1200	Estados Unidos	(DOLLIVER; KUMAR; GUPTA, 2007)
	Alface			
	Batata			
	Lodo de ETE	11,7	China	(LI <i>et al.</i> , 2013)
Leite	<LOQ ^a	Brasil	(ARIAS <i>et al.</i> , 2018)	

^aLOQ, Limite de Quantificação (5 µg kg⁻¹)

3.4 Lodo de estação de tratamento de esgoto

A água residual das atividades humanas apresenta diferentes características que variam de acordo com a sua utilização, o que a torna imprópria para consumo e retorno ao meio ambiente sem condicionamento ou tratamento. Como exemplos de águas residuais estão os esgotos domésticos, efluentes de processos industriais e líquidos percolados em células de aterros sanitários (PEREIRA; SOARES, 2006).

Ainda que o tratamento de esgoto seja importante na prevenção de problemas como contaminação e o aparecimento de doenças, este ainda é inexistente em muitos municípios brasileiros (AISSE, 2000). Embora tenha ocorrido um avanço no número de municípios cobertos pelo saneamento básico em todas as regiões do Brasil no período entre 2000 e 2008, o esgotamento sanitário era o serviço que apresentava a menor abrangência municipal, atingindo um percentual de 55,2% para todo o país em 2008 (IBGE, 2011).

Os esgotos urbanos são os principais poluidores de mananciais e necessitam de tratamento (BETTIOL; CAMARGO, 2006). São muitos os processos disponíveis para tratamento de efluentes; e geralmente em uma ETE existem as etapas de floculação, sedimentação e tratamento biológico (aeróbico e/ou anaeróbico) (ROCHA; ROSA; CARDOSO, 2009). No processo de tratamento de águas residuais o lodo é o principal resíduo gerado e não possui destinação final adequada devido às suas características de alta toxicidade e alta densidade de microrganismos (NOUHA *et al.*, 2018).

Este lodo contém nutrientes como nitrogênio e fósforo, e grande quantidade de carbono orgânico que é útil quando o solo está esgotado ou tende a erosão, essa riqueza em matéria orgânica e nutrientes são as duas principais razões que tornam a utilização de lodo de ETE em solos adequada. Estima-se que cerca de 40% do lodo produzido na União Europeia seja utilizado em terras para uso agrícola e aproximadamente 12% são utilizadas em compostos que provavelmente também serão aplicadas ao solo (florestas, jardins, etc.) (IVANOVÁ *et al.*, 2018).

O uso do lodo para fins agrícolas e florestais é benéfico devido a sua riqueza em matéria orgânica, micro e macronutrientes que o tornam nutritivo para as plantas e um bom fertilizante. Entretanto, este resíduo apresenta contaminantes como metais tóxicos, compostos orgânicos persistentes e emergentes, assim como microrganismos patogênicos ao homem (BETTIOL; CAMARGO, 2006).

A Resolução Nº 375, de 29 de agosto de 2006, do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2006) estabelece critérios e procedimentos para o uso, em áreas agrícolas, de lodo de esgoto gerado em estação de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados, visando benefícios à agricultura e evitando riscos à saúde pública e ao ambiente. Nesta resolução, regulamenta-se a presença de metais pesados, compostos persistentes e agentes patogênicos.

De acordo com uma análise cienciométrica de dados realizada por Castro e colaboradores (2015), a realidade brasileira para a disposição do lodo de esgoto, é a produção vegetal ou a recomposição de áreas degradadas, presentes em 91,7% das publicações encontradas, com destaque a aplicação agrícola (82,1%) e, em especial na produção de milho (19,9%) (CASTRO; SILVA; SCALIZE, 2015).

3.5 Técnicas de preparo de amostras

O preparo de amostras ambientais tem por objetivo isolar/concentrar os analitos de uma matriz para que possam ser determinados posteriormente, além de reduzir/eliminar os interferentes. Dessa forma, além de realizar uma limpeza (*clean up*) pode proporcionar um fator de enriquecimento dos analitos (pré concentração) (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

A otimização do preparo de amostras é muito importante na obtenção de resultados precisos e exatos. O método deve ser rápido, barato, de fácil execução e compatível com o instrumento de determinação (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015). Nos últimos anos vêm se modernizando as técnicas de preparo de amostras, visando desenvolver métodos miniaturizados, mais rápidos e simples, diminuição do consumo de solventes e o emprego de materiais alternativos e/ou renováveis, melhorando o custo benefício (CALDAS *et al.*, 2013a).

A escolha da técnica de preparo de amostras, dentre os diferentes tipos existentes, é baseada nas propriedades físico-químicas da amostra (analitos, interferentes e matriz), tais como a polaridade, solubilidade, estabilidade térmica e química, coeficiente de partição, entre outros, além da viabilidade de execução desta.

3.5.1 Química Analítica Verde

A Química Verde é uma abordagem que visa reduzir os riscos aos seres humanos e o meio ambiente. Químicos de todo o mundo vêm usando sua criatividade e inovação no desenvolvimento de novos métodos sintéticos, condições de reação, ferramentas analíticas, catalisadores e processos sob o novo paradigma da Química Verde (ANASTAS, 1999).

A Química Analítica Verde surgiu nos anos 2000 e buscando melhorias na qualidade das análises químicas, esforços continuam sendo feitos para reduzir o impacto negativo destas sobre o meio ambiente e para permitir a implementação de princípios de desenvolvimento sustentável para laboratórios analíticos (GAŁUSZKA; MIGASZEWSKI; NAMIEŚNIK, 2013). A Química Analítica Verde possui 12 princípios, que são eles:

1. Técnicas analíticas diretas devem ser aplicadas para evitar o tratamento da amostra.
2. O tamanho mínimo da amostra e o número mínimo de amostras são objetivos.
3. Medições *in situ* devem ser realizadas.
4. A integração de processos analíticos e operações economiza energia e reduz o uso de reagentes.
5. Métodos automatizados e miniaturizados devem ser selecionados.
6. Derivatização deve ser evitada.

7. A geração de um grande volume de resíduos analíticos deve ser evitada e a gestão adequada dos resíduos analíticos deve ser fornecida.
8. Métodos multi-analitos ou multi-parâmetros são preferidos versus métodos usando um analito de cada vez.
9. O uso de energia deve ser minimizado.
10. Os reagentes obtidos a partir de fontes renováveis devem ser preferidos.
11. Os reagentes tóxicos devem ser eliminados ou substituídos.
12. A segurança do operador deve ser aumentada. (GAŁUSZKA; MIGASZEWSKI; NAMIEŚNIK, 2013)

3.5.2 *Dispersão da matriz em fase sólida (MSPD)*

Na década de 1980 técnicas de preparo de amostra para matrizes líquidas tiveram um acentuado desenvolvimento. No entanto, para amostras sólidas e semissólidas, as quais apresentam elevada complexidade, a extração por Soxhlet continuava sendo a principal técnica utilizada (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

Se intensificaram então, os estudos para o desenvolvimento de novos métodos analíticos para amostras de alimentos, biológicas e ambientais, até que em 1989 a técnica de preparo de amostras MSPD foi desenvolvida por Steven Barker e colaboradores para extração de fármacos em tecidos biológicos (BARKER; LONG; SHORT, 1989). A técnica surgiu como uma alternativa à SPE, para extração de contaminantes em amostras sólidas e semissólidas, pois na SPE a amostra necessita estar em estado líquido e homogêneo para ser eluída no cartucho para evitar o bloqueio dos espaços vazios do suporte sólido (BARKER, 2000). Surgiu também como uma alternativa ao Soxhlet, uma técnica que consome cerca de 250 mL de solventes orgânicos para grandes quantidades de amostra e um tempo de extração de 8 à 48 h (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

A instrumentação necessária para o emprego da técnica necessita somente de gral, pistilo, tubos para empacotamento da mistura e um sistema de vácuo que é opcional, além de ter compatibilidade com as técnicas de determinação mas comumente usadas (CALDAS *et al.*, 2013a).

O princípio básico da MSPD (Figura 1) está baseado na pesagem da amostra viscosa, sólida ou semissólida em um gral, que pode ser de porcelana, ágata ou vidro, seguido da maceração da amostra com o suporte sólido. A dispersão é realizada por um tempo suficiente

para que ocorra a completa homogeneização da amostra no suporte sólido e a ruptura da estrutura física da amostra em pequenas partículas. Após a dispersão, a amostra e o suporte sólido formam uma fase única, que é então empacotada em uma coluna vazia, na qual é colocada uma frita (filtro de polietileno) antes e após o empacotamento. As colunas mais empregadas são seringas vazias ou tubos de SPE. Após esta etapa, é realizada a eluição e o extrato está pronto para análise (BARKER, 2000; CALDAS *et al.*, 2013a). Caso o extrato obtido não possuir a condição adequada para injeção no cromatógrafo, pode ser necessário realizar operações como filtração, derivatização, concentração, centrifugação, entre outras (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

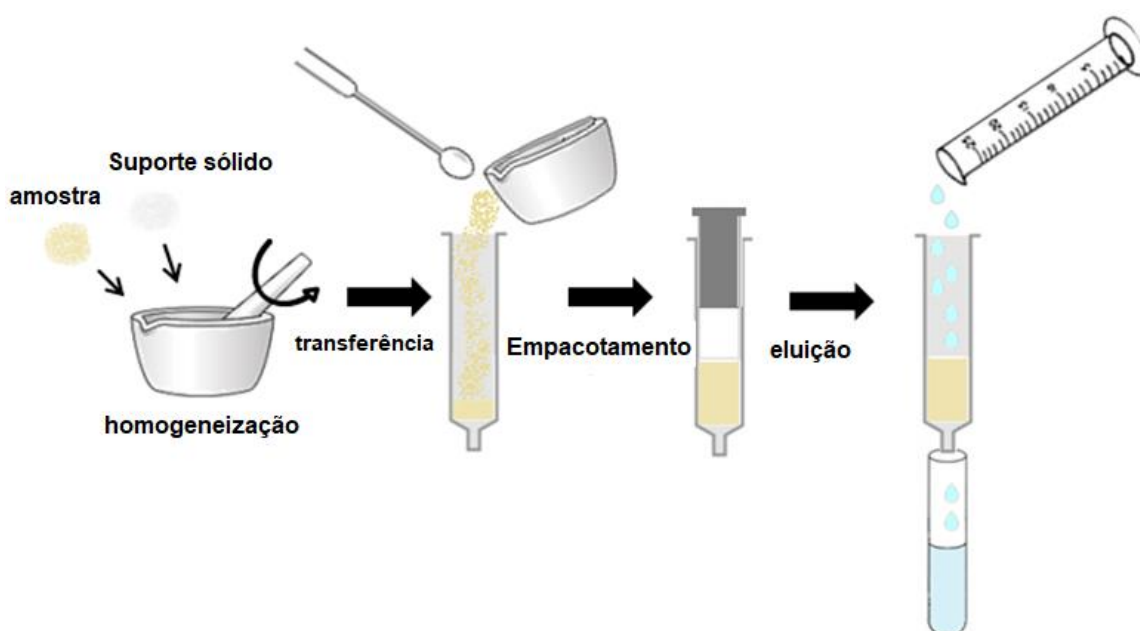


Figura 1. Etapas da MSPD (adaptado de BARKER; LONG; SHORT, 1989)

Dentre as vantagens da MSPD estão a utilização de uma pequena quantidade de amostra, redução do uso de solventes orgânicos e do tempo de extração. Já dentre as limitações estão a reprodutibilidade na homogeneização e empacotamento dos cartuchos, e a dificuldade de automação (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

Buscando diminuir os problemas relacionados ao empacotamento do cartucho e o tempo de extração, foram realizadas modificações na técnica. Caldas e colaboradores (2013), desenvolveram a MSPD assistida por vórtex (VA-MSPD), que substituiu a etapa de empacotamento por uma etapa de agitação por vórtex (Figura 2) (CALDAS *et al.*, 2013b), o que melhorou a dispersão da amostra no solvente extrator aumentando a superfície de contato.

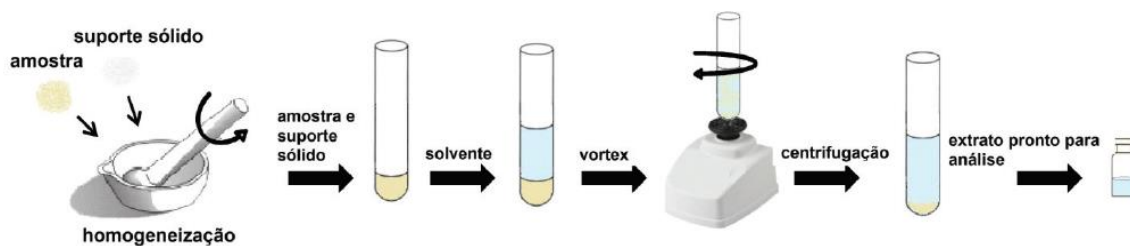


Figura 2. Etapas da MSPD assistida por vórtex adaptado de CALDAS et al., 2013b.

A MSPD vem sendo empregada para uma grande diversidade de fármacos e produtos de cuidado pessoal (PPCPs, do inglês *Pharmaceuticals and Personal Care Products*), em uma variedade de matrizes (Tabela 2).

Tabela 2. Trabalhos utilizaram MSPD para extração de PPCPs e drogas ilícitas

<i>Classes de Analitos</i>	<i>Amostra</i>	<i>Suporte sólido</i>	<i>Solvente</i>	<i>Técnica de determinação</i>	<i>Recuperação</i>	<i>Referência</i>
Quinolonas	Ovo inteiro	Areia	Água (ácido fórmico) aquecida a 100 °C	LC-MS/MS	89 – 103%	(BOGIALLI et al., 2009)
12 fármacos	Sedimento	C18 e Florisil	Acetonitrila 5% de ácido oxálico	LC-MS/MS	80%	(PAVLOVIĆ et al., 2012)
148 produtos farmacêuticos e drogas ilícitas	Lodo de ETE liofilizado	Extração assistida por ultrassom	Metanol/água (pH 2,5, FA 0,5% e 0,1% EDTA), (50:50)	LC-MS/MS	50 – 110%	(GAGO-FERRERO et al., 2015)
Sulfonamidas	Lodo de ETE	Nano-sílica–C18	Água/metanol (60:40)	HPLC-DAD	91 – 94,5%	(VOSOUGH; ONILGHI; SALEMI, 2016)
23 PPCPs, 4 produtos de degradação	Lodo de esgoto	Sem suporte	Metanol	HILIC-MS/MS	50 - 120%	(CERQUEIRA et al., 2018)
β-Lactâmicos	Músculo de porco	Polimérico	Acetonitrila/água (50:50) 0,1% AF	UPLC–MS/MS	92 – 111%	(HUANG et al., 2019)

4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

O desenvolvimento desse trabalho consistiu no desenvolvimento e validação de um método verde para a determinação de antibióticos em amostras de lodo de ETE. Para o preparo de amostra, utilizou-se a técnica de VA-MSPD e para a determinação a técnica de LC-MS/MS.

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos e Metais (LACOM), da Escola de Química e Alimentos (EQA), na Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

4.1 Instrumentação

- Balança Analítica modelo FA2104N, Bioprecisa (Curitiba, Brasil);
- Bomba à vácuo Tecnal TE-058 (Piracicaba, Brasil);
- Micropipetas com capacidade variável (100 – 1000 µL) Labmate (Varsóvia, Polônia);
- pHmetro Hanna pH20pH21 – eletrodo de vidro combinado (São Paulo, Brasil);
- Sistema de filtração em membrana Phenomenex (Torrance, EUA);
- Sistema de purificação de água Milli-Q Direct-Q UV3® Millipore (Millipore, Bedford, EUA);
- Sistema gerador de nitrogênio Peak Scientifics (Instruments Ltda., Escócia);
- Ultrassom Quimis modelo Q335D (Diadema, Brasil);
- Vórtex modelo Certomat® MV-B. Braun (Bioteck Internacional, Alemmar – Comercial e Industrial S. A.);
- Centrífuga de tubos microprocessada modelo Quimis® Q222T (QUIMIS aparelhos científicos);
- Liofilizador (Liotop – L101) (Brasil);
- Cromatógrafo líquido Alliance Separations Module 2695 (Waters, EUA) equipado com: Amostrador automático, bomba quaternária, forno para coluna e sistema de degaseificação. Detector MS, Micromass® Quatro Micro™ API (Waters, Inglaterra) com fonte API, com ionização por Eletrospray; sistema de aquisição de dados através do *software* MassLynx e QuanLynx 4.0 (Waters, Inglaterra).
- Coluna analítica XTerra® MS C18 3,5 µm 144 Å (50 × 3 mm d.i.) (Waters, EUA);

4.2 Reagentes, solventes e materiais

- Acetonitrila (MeCN) e metanol (MeOH), grau HPLC (J.T Baker, Mallinckrodt, EUA);
- Água destilada;
- Água ultrapura, purificada em sistema Direct-Q UV3[®] Millipore (resistividade 18,2 MΩ cm);
- Detergente Extran[®] neutro (Merck, Brasil);
- Frascos de vidro (vial), capacidade de 2 mL;
- Filtros 2204525 100CW PVDF-45/25 (0,45 μm, 25 mm) (Analítica, Brasil);
- Gás argônio analítico 5.0 usado como gás de colisão no sistema LC-ESI-MS/MS (White Martins, Brasil);
- Padrões analíticos: Cloranfenicol (Sigma-Aldrich, EUA); Sulfametoxazol (United States Pharmacopeia, USP); Sulfadiazina, Sulfametazina e Eritromicina (Dr. Erenstofer GmbH, Alemanha);
- Sorventes: C18 Bondesil (Varian, EUA), areia da praia do Bojuru caracterizada por Santos (2017), concha de mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei*) caracterizada por Rombaldi e colaboradores (2015) e terra diatomácea;
- Tubos de prolipropileno, com tampas rosqueáveis, capacidade de 15 mL (Sarstedt, Alemanha);
- Vidrarias em geral (balões volumétricos, pipetas volumétricas, béquer etc.);

4.3 Preparo das soluções analíticas

As soluções estoque na concentração de 1000 mg L⁻¹ de cada analito foram preparadas pela dissolução dos padrões sólidos em metanol grau HPLC, sendo posteriormente armazenadas em frascos âmbar e estocadas a -18 °C, seguindo a Farmacopeia Brasileira (ANVISA, 2010). Os padrões utilizados são de alto teor de pureza, superior a 99%. Partindo das soluções estoque, foram preparadas soluções trabalho na concentração de 100 mg L⁻¹ de cada substância em metanol grau HPLC. Foi preparado uma solução trabalho contendo a mistura dos analitos na concentração de 10 mg L⁻¹ e a partir desta foram realizadas as diluições para o estudo e validação do método.

4.4 Seleção dos analitos

Para a seleção dos analitos, realizou-se uma revisão na literatura, observando-se a ocorrência de antibióticos em lodo e matrizes ambientais. Observou-se também suas propriedades físico-químicas, como a solubilidade em água, o coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}) e o coeficiente de partição de carbono orgânico (K_{oc}).

4.5 Amostras de Lodo de ETE

Para otimização e validação do método, as amostras de lodo de ETE foram coletadas nos leitos de secagem da ETE da CORSAN, localizada no bairro Parque Marinha, no município de Rio Grande, RS conforme Figura 3 e Figura 4. A ETE Parque Marinha atende cerca de 3500 residências e trata em média 400 000 m³ de esgoto/mês empregando o processo de lodo ativado com uso de cloreto férrico.



Figura 3. Vista superior da ETE-CORSAN Parque Marinha, Rio Grande/RS (adaptado de Google Earth, 2018)



Figura 4. Leito de secagem

A amostragem foi realizada conforme as recomendações da ABNT NBR 10007/2004 empregando uma pá. As amostras foram armazenadas em bandeja de alumínio e transportadas até o laboratório em caixa de isopor, posteriormente foram armazenadas em ultra freezer e liofilizadas por 48 h, em seguida foram homogeneizadas com maceração e peneiradas (peneira de 32 mesh, 0,5 mm de abertura).

4.6 Condições cromatográficas

As condições referentes ao LC-MS/MS para os analitos em estudo foram definidas em outro trabalho realizado no laboratório (ARIAS *et al.*, 2018), sendo apenas aplicadas e discutidas nesse trabalho. As condições do detector MS/MS são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Condições do detector MS/MS

<i>Condição</i>	
Gás de dessolvatação	N ₂
Temperatura da fonte de íons	120 °C
Temperatura do gás de dessolvatação	400 °C
Vazão do gás de dessolvatação	500 L h ⁻¹
Vazão do gás do cone	50 L h ⁻¹

As condições de detecção por espectrometria de massas foram definidas de forma a se obter maior sensibilidade analítica. Buscaram-se duas transições características de fragmentação para cada analito, sendo a mais intensa utilizada para quantificação e a segunda mais intensa utilizada para confirmação, sendo as determinações realizadas no modo de Monitoramento de Reações Seleccionadas (SRM). A Tabela 4 apresenta o modo de ionização,

transições monitoradas, energias de cone e de colisão, e t_R (tempo de retenção) para cada analito.

Tabela 4. Modo de ionização, transições monitoradas, energias de cone e de colisão, e t_R para cada analito

<i>Analito</i>	<i>t_R (min)</i>	<i>ESI</i>	<i>Voltagem do cone (V)</i>	<i>Transição de quantificação (eV)</i>	<i>Transição de confirmação (eV)</i>
Sulfadiazina	4,55	+	19	251,22>156 (13)	251,22>92 (27)
Sulfametazina	6,06	+	27	279,24>186,1 (17)	279,24>92 (17)
Eritromicina	7,09	+	25	734,54>158,2 (29)	734,54>115,2 (53)
Sulfametoxazol	7,13	+	25	254,22>92 (15)	254,22>156 (27)
Cloranfenicol	7,41	-	29	321,07>151,9 (21)	321,07>257,1 (11)

A separação foi obtida com a utilização de uma coluna analítica XTerra® MS C18 3,5 μm 144 Å (50 \times 3 mm d.i.) e fase móvel composta por água ultrapura e acetonitrila, ambos acidificados à 0,1% com ácido fórmico, em modo de eluição por gradiente (Tabela 5).

Tabela 5. Gradiente de eluição empregado para análise de antibióticos por LC-MS/MS

<i>Tempo (min)</i>	<i>Acetonitrila 0,1% HCOOH</i>	<i>Água 0,1% HCOOH</i>	<i>Vazão (mL min⁻¹)</i>
0	5	95	0,2
12	95	5	0,4
13	95	5	0,4
13,5	5	95	0,2
20	5	95	0,2

4.6.1 Preparo da fase móvel

A fase móvel utilizada foi acetonitrila e água ultrapura (resistividade 18,2 M Ω cm), ambos os solventes foram acidificados com 0,1% de ácido fórmico. Os componentes da fase móvel foram filtrados, através de membranas de nylon (0,45 μm), e degaseificadas em banho de ultrassom durante 30 minutos, à temperatura ambiente (21 °C).

4.7 Otimização do preparo de amostra por VA-MSPD para extração de antibióticos em lodo de ETE

Os experimentos realizados para a escolha das melhores condições de extração dos antibióticos empregando VA-MSPD seguiram as etapas descritas na Figura 2. Todas as etapas

da otimização foram realizadas em triplicata e cada triplicata foi injetada 3 vezes no LC-MS/MS. Em todos os ensaios as amostras foram fortificadas em um nível de concentração de $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$.

4.7.1 Avaliação do tipo de suporte sólido

Foram avaliados diferentes suportes sólidos, sendo eles C18, areia da praia do Bojuru (RS), concha de mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei*), terra diatomácea e ainda matriz sem suporte. A água ultrapura (5 mL, 100 °C) foi selecionada previamente como solvente de extração baseada no método de Bogialli (2009) para extração de antibióticos quinolona de amostras de ovo (BOGIALLI *et al.*, 2009). As condições iniciais de massa de suporte sólido e de amostra, tempo de agitação em vórtex e centrifugação foram baseadas no método de Cerqueira e colaboradores (2018) para extração de AS e AAS de lodo de ETE (CERQUEIRA *et al.*, 2018). Deste modo 0,5 g de amostra foram macerados com 0,5 g de suporte sólido por 5 minutos, seguido da extração com 5 mL de água ultrapura (100 °C) em um tubo de 15 mL de polipropileno e agitação em vórtex por 1 minuto, seguida por uma etapa de centrifugação a 8000 rpm durante 5 minutos. O extrato foi filtrado em filtro de PVDF de 0,45 μm e 25 mm de diâmetro e centrifugado em microtubos por 10 minutos a 10000 rpm. Uma alíquota de 1 mL do extrato foi retirada para análise cromatográfica.

4.7.2 Avaliação da temperatura do solvente extrator

Selecionado o suporte sólido, foi avaliado a temperatura da água ultrapura utilizada como solvente extrator. Foram avaliadas as temperaturas: ambiente (21 °C), 50, 75 e 100 °C, conforme um trabalho realizado por Bogialli e colaboradores (2003) para extração de antibióticos sulfonamidas de leite e ovos (BOGIALLI *et al.*, 2003), seguindo o procedimento descrito anteriormente (item 4.7.1)

4.7.3 Avaliação do pH do solvente extrator

Selecionados o suporte sólido e a temperatura da água ultrapura utilizada como solvente extrator, foi avaliado o pH da água ultrapura. Foram avaliados o pH 6 e pH 2 (acidificada com ácido fosfórico) seguindo o procedimento do item 4.7.1.

4.7.4 Avaliação do tempo de agitação por vórtex

Selecionados o suporte sólido, a temperatura e o pH da água ultrapura utilizada como solvente extrator, foi avaliado o tempo de agitação em vórtex. Foram avaliados 1 e 3 minutos seguindo o procedimento do item 4.7.1.

4.7.5 Avaliação da extração com diferentes solventes

Selecionados o suporte sólido, a temperatura e o pH da água ultrapura utilizada como solvente extrator, foi avaliado a extração com etanol, como uma alternativa verde ao metanol que é tradicionalmente utilizado, e com acetonitrila que é comumente utilizada na extração de antibióticos, conforme a Tabela 2. Ambos os solventes polares como o solvente utilizado no desenvolvimento do método (água), seguindo o procedimento do item 4.7.1.

4.8 Validação do método

O método foi validado avaliando-se as seguintes figuras de mérito: limite de detecção (LOD, do inglês *limit of detection*), limite de quantificação (LOQ, do inglês *limit of quantification*), curvas analíticas (calibração externa no solvente e no extrato), linearidade, efeito matriz (EM), exatidão (recuperação) e precisão (repetibilidade e precisão intermediária) (INMETRO, 2016; SANTE, 2017).

4.8.1 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Os LODs e LOQs foram estimados pela relação sinal/ruído (s/n) calculados pelo *software* do equipamento e foi estabelecido uma razão $s/n \geq 3$ para o LOD e $s/n \geq 10$ para o LOQ. Os limites de quantificação foram obtidos através da padronização no extrato e os limites de detecção foram obtidos levando em consideração a massa de amostra e volume de solvente.

4.8.2 Curvas analíticas e Linearidade

As curvas analíticas foram preparadas em cinco níveis de concentração, iniciando pelo LOQ de cada analito. Foi preparada uma solução contendo a mistura dos 5 analitos de concentração de 10 mg L⁻¹ e através de diluições sucessivas dessa solução foram preparadas as curvas no solvente (água pH 2) e no extrato da matriz (extraído por VA-MSPD).

Os dados de regressão linear foram obtidos com auxílio do *software* (Masslynx 4.0 Waters) do equipamento. A linearidade foi avaliada através do valor do coeficiente de correlação linear (r).

4.8.3 Efeito Matriz

O EM foi avaliado por meio da comparação entre os coeficientes angulares das curvas preparadas no extrato da matriz e no solvente (ECONOMOU *et al.*, 2009) através da Equação 1.

$$EM (\%) = \left(\frac{a_{\text{extrato}}}{a_{\text{solvente}}} \times 100 \right) - 100 \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

a_{extrato} : coeficiente angular da curva preparada no extrato da matriz.

a_{solvente} : coeficiente angular da curva preparada no solvente (água pH 2).

Se os valores encontrados para o efeito matriz estiverem na faixa de $\pm 20\%$, o efeito matriz é considerado baixo; se estiverem entre ± 20 e $\pm 30\%$, o efeito matriz é considerado médio; e se estiverem abaixo de -50% ou acima de $+50\%$, o efeito matriz é considerado alto (ECONOMOU *et al.*, 2009).

4.8.4 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada por meio da adição de quantidades conhecidas dos analitos em amostras de lodo de ETE, sendo feito um branco da amostra para avaliar a presença de algum dos analitos. As fortificações foram realizadas em três níveis de concentração, 1, 5 e 10 vezes o LOQ de cada analito, sendo os ensaios realizados em triplicata para cada nível e as replicatas injetadas três vezes no equipamento ($n = 9$).

As amostras 1, 5 e 10 LOQ foram fortificadas pela adição de uma solução de 200 LOQ. Sendo mantidas em repouso por 30 minutos e em seguida submetidas ao procedimento de extração.

A exatidão foi avaliada em termos de recuperação, conforme é demonstrado na Equação 2.

$$R(\%) = \frac{A_{\text{fortificado}}}{A_{\text{extrato}}} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

R = Recuperação

$A_{\text{fortificação}}$: Média das áreas da amostra fortificada

A_{extrato} : Média das áreas do padrão no extrato

4.8.5 Precisão

A precisão do método foi avaliada por meio da repetibilidade, expressa pelo desvio padrão relativo (RSD). Dessa forma, as amostras foram fortificadas em dois níveis de concentração, 5 e 10 vezes o LOQ de cada analito, sendo os ensaios realizados em triplicata para cada nível e a replicata injetada três vezes no equipamento ($n = 9$) no mesmo dia, pelo mesmo analista e nas mesmas condições cromatográficas. Para os cálculos do RSD utilizou-se a Equação 3.

$$RSD(\%) = \frac{s}{\bar{X}} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

s = Estimativa do desvio padrão absoluto

\bar{X} = Média das replicatas

4.9 Tratamento estatístico dos dados

Para avaliação dos resultados de recuperação durante a padronização do método, foram realizadas análises de variância (ANOVA), com teste de post-hoc de Tukey realizado com o auxílio do *software* BioEstat, versão 5.0.

4.10 Resíduos

Os resíduos gerados neste trabalho (aproximadamente 1 L) foram recolhidos, armazenados em frascos vidros âmbar, rotulados de acordo com as normas definidas pela comissão de resíduos da EQA, armazenados para posterior recolhimento e tratamento pela FURG. Devido a baixa toxicidade do resíduo, composto por água e areia, é possível que se aplique um método de degradação dos antibióticos presentes como os Processos Oxidativos Avançados (POA) (MELO *et al.*, 2009) para posterior descarte.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Separação cromatográfica

O gradiente utilizado permitiu a separação dos analitos em estudo em um tempo total de análise de 20 minutos. A Figura 5, apresenta o cromatograma total de íons empregando o modo de eluição por gradiente.

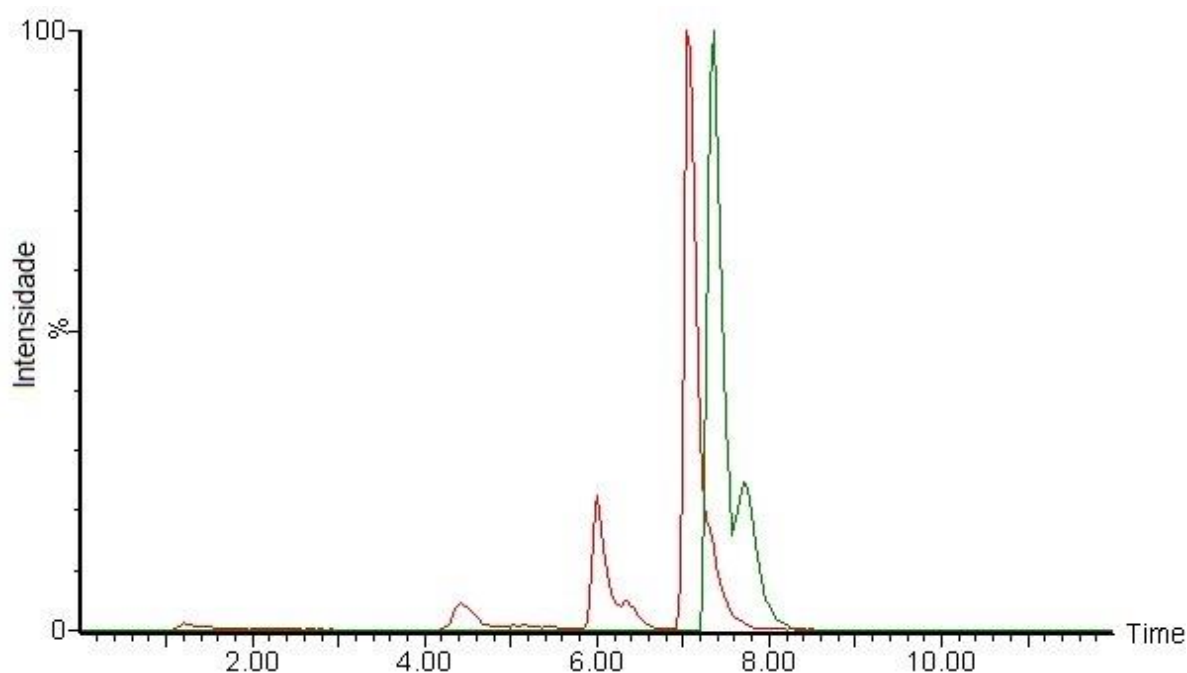


Figura 5. Cromatograma total de compostos no modo ESI+ e ESI- na condição otimizada para o padrão no extrato na concentração de 1 mg L^{-1}

Embora não tenha sido obtida uma separação completa para todos os analitos em estudo, o uso do detector de massas em série torna a análise altamente seletiva, pela possibilidade de trabalho no modo SRM, permitindo a diferenciação entre picos que possuem o mesmo tempo de retenção. A Figura 6 mostra os cromatogramas dos analitos no modo SRM.

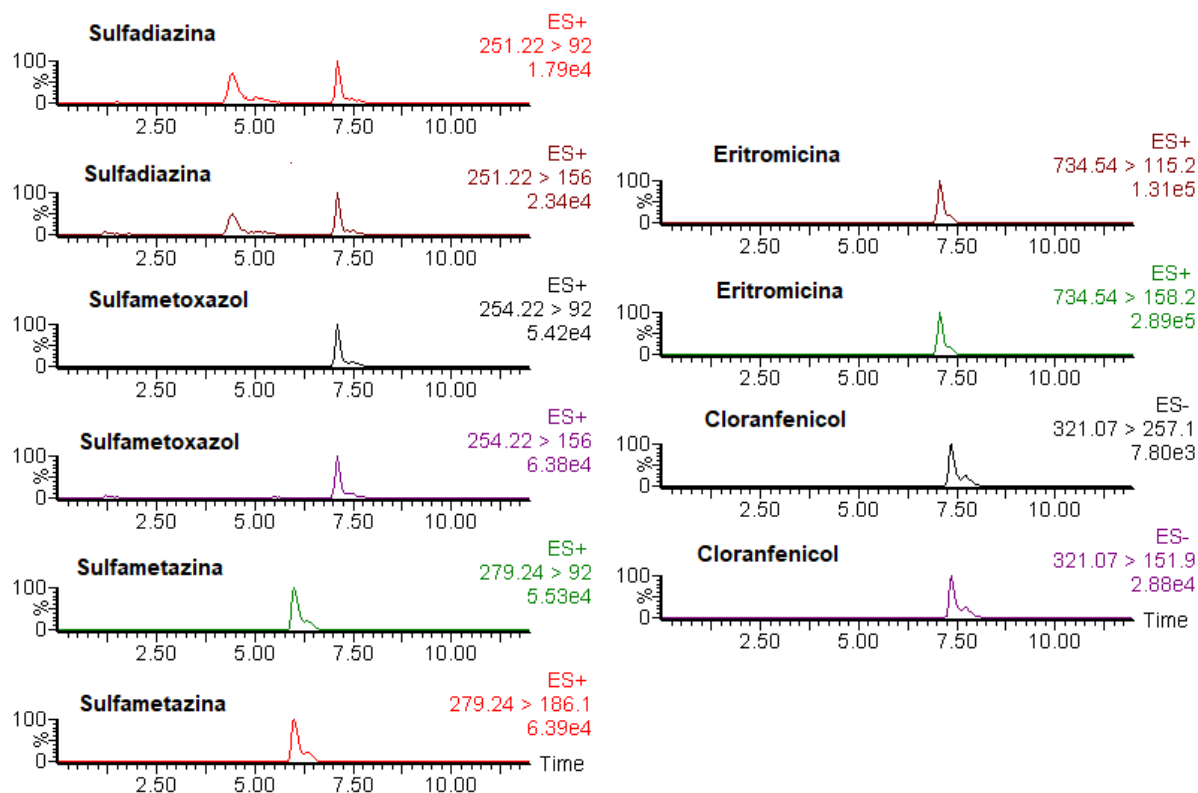


Figura 6. Cromatograma das transições de quantificação dos analitos no modo SRM empregando as condições da Tabela 5. Concentração da mistura 1 mg L⁻¹

5.2 Analitos selecionados

As estruturas dos analitos selecionados são apresentadas na Figura 7. A Tabela 6 apresenta as classes químicas dos antibióticos selecionados, o número de CAS e as propriedades físico-químicas.

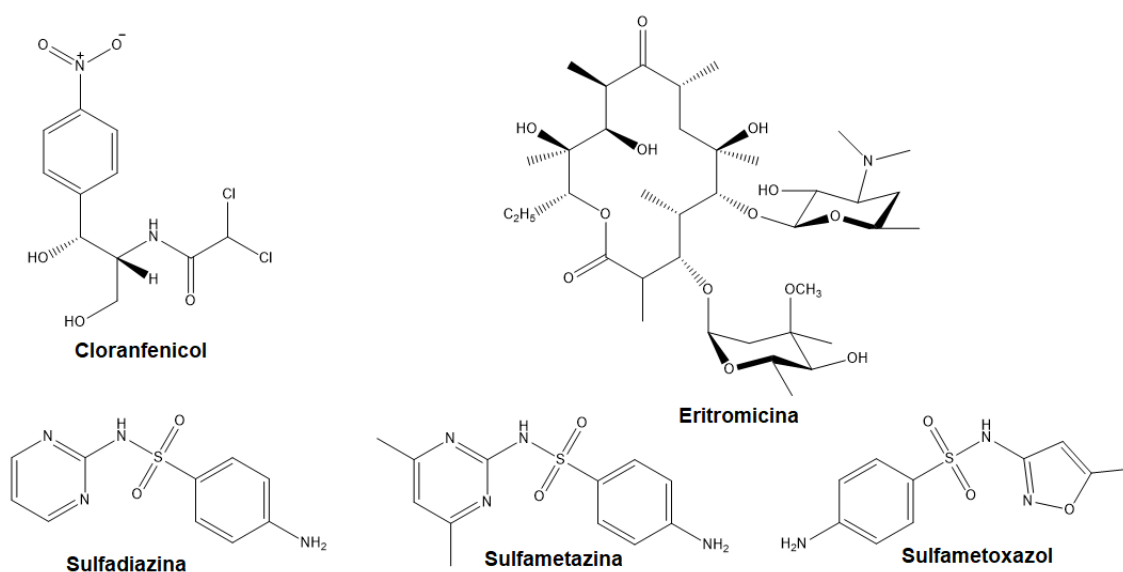


Figura 7. Estrutura dos analitos selecionados para o estudo

Tabela 6. Propriedades físico-químicas dos analitos, assim como suas respectivas classes e CAS

	<i>Cloranfenicol</i>	<i>Eritromicina</i>	<i>Sulfadiazina</i>	<i>Sulfametazina</i>	<i>Sulfametoxazol</i>
Classe química	Anfenicol	Macrolídeo	Sulfonamida	Sulfonamida	Sulfonamida
CAS	56-75-7	114-07-8	68-35-9	57-68-1	723-46-6
Log K_{ow}	1,14	3,06	-0,09	0,89	0,89
Log K_{oc} (pH 7,4)	1,93	1,95	0,62	1,47	0,52
pKa	7,40 (ácido forte) -2,8 (base forte)	8,88	6,36	7,59	6,16 (ácido forte) 1,97 (base forte)
Solubilidade em água (mg L⁻¹)	2500 (25 °C)	2000 (28 °C)	77 (25 °C)	1500 (29 °C)	610 (37 °C)
Ponto de ebulição (a 1 atm)	644,9 ± 55,0 °C	818,4 ± 65,0 °C	512,6 ± 5,0 °C	526,2 ± 52,0 °C	482,1 ± 5,0 °C

Fonte: (CHEMSPIDER, 2018; DRUGBANK, 2018; PUBCHEM, 2018)

Como pode-se perceber, a sulfadiazina é pouco solúvel em água (0,1 – 100 mg L⁻¹), enquanto que os demais analitos são de moderadamente solúveis à solúveis (100 – 10000 mg L⁻¹) (EPA, 2013). Em relação ao coeficiente de partição octanol-água, a maioria dos analitos são considerados hidrofílicos, somente a eritromicina é moderadamente hidrofóbica (EPA, 2013), portanto como pode-se perceber, quanto maior o K_{ow} maior a hidrofobicidade da molécula. De modo geral, antibióticos apresentam maiores valores de solubilidade em água e

menores valores de coeficiente de partição octanol-água ($\text{Log } K_{ow}$), provavelmente devido à presença de muitos grupos funcionais ionizáveis, sugerindo que essas moléculas apresentam menor potencial de bioacumulação e maior mobilidade no solo, em razão do seu menor caráter hidrofóbico (REGITANO; LEAL, 2010), o que pode ser observado também pelo baixo potencial de adsorção à solo e sedimento ($\log K_{oc} < 1,5 - 2,4$) (EPA, 2013). O cloranfenicol e o sulfametoxazol são moléculas anfóteras com vários grupos funcionais ionizáveis (diferentes valores de pK_a), podendo ser encontradas como diferentes espécies dependendo do pH do meio.

5.3 Otimização do preparo de amostra por VA-MSPD para extração de antibióticos de lodo de ETE

5.3.1 Avaliação do tipo de suporte sólido

Neste trabalho foram estudados diferentes suportes sólidos empregados na MSPD, sendo eles: C18, areia, concha de mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei*), terra diatomácea e ainda matriz sem suporte, para os quais os resultados de recuperação obtidos são apresentados na Figura 8. A principal função do suporte sólido é promover a ruptura da estrutura geral da amostra na etapa de maceração, atuando como abrasivo (CALDAS *et al.*, 2013a). Materiais clássicos como C18, C8, alumina, Florisil e sílica encontram grande aplicação na MSPD, além destes suportes tradicionalmente utilizados, materiais alternativos vêm sendo utilizados (CALDAS *et al.*, 2013a).

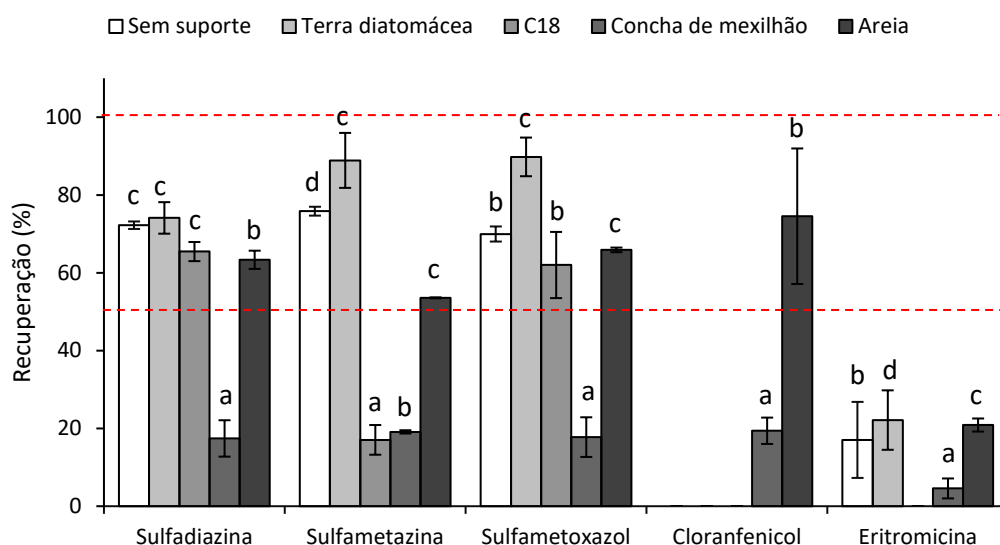


Figura 8. Efeito do suporte sólido na recuperação da MSPD de antibióticos em lodo de ETE. (Massa de amostra: 0,5 g; massa de suporte sólido: 0,5 g; volume de solvente (água ultrapura 100 °C, pH neutro): 5 mL; vórtex: 1 min; centrifugação: 5 min a 8000 rpm). As barras indicam valores de RSD. Médias seguidas por letras iguais, para o mesmo analito, não apresentam diferença estatística significativa ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey com significância de 95%

As recuperações empregando C18 como suporte sólido ficaram entre 0 e 65% e RSD < 9%. Utilizando a terra diatomácea, as recuperações foram entre 0 e 89% com RSD < 7%. Quando a concha de mexilhão foi utilizada, as recuperações dos analitos foram de 4 a 19% com RSD < 5%. Utilizando areia, as recuperações ficaram entre 20 e 74% com RSD < 17%. Os resultados de recuperação para o experimento sem suporte (apenas a matriz foi macerada) foram entre 0 e 75% com RSD < 10%.

Com o uso de C18, suporte sólido comercial tradicionalmente utilizado na MSPD, não houve recuperações para o cloranfenicol e para a eritromicina, e uma recuperação muito baixa para a sulfametazina. Os dois analitos que tiveram recuperações menores foram os que são mais lipofílicos, portanto o solvente extrator pode não ter tido força de eluição suficiente para removê-los do lodo.

Terra diatomácea é um sedimento amorfo, originado a partir de frústulas ou carapaças de organismos unicelulares vegetais, normalmente denominado diatomita, constituída por cerca de 85% de óxidos metálicos como SiO_2 , Al_2O_3 e Fe_2O_3 (SOUZA *et al.*, 2003). Apesar de ser um suporte sólido tradicionalmente usado na MSPD, não obteve boas recuperações para a eritromicina e o cloranfenicol.

A concha de mexilhão, testada como suporte sólido não proporcionou boas recuperações para nenhum dos analitos, é constituída basicamente de cálcio e oxigênio (carbonato de cálcio), com quantidades menores de sódio, alumínio e silício (ROMBALDI *et al.*, 2015), o que possivelmente promoveu a retenção dos analitos, pois estes apresentam propriedades polares, semelhante ao suporte sólido.

A maceração da amostra sem suporte sólido não obteve recuperações para o cloranfenicol. A amostra de lodo foi caracterizada por Cerqueira e colaboradores (2018) e apresentou 35% de carbono orgânico total, 5% de nitrogênio e pH 7,5. Caracterizou-se cerca de 37% de sólidos fixos e a análise por EDS determinou a presença de elementos como carbono, oxigênio, silício, magnésio, cálcio, ferro e alumínio (CERQUEIRA *et al.*, 2018). Algumas características do suporte sólido como o percentual de carbono têm demonstrado não ter grande influência no resultado analítico (CALDAS *et al.*, 2013a).

A areia da praia do Bojuru foi selecionada como suporte sólido para as etapas posteriores, embora não tenha tido as melhores recuperações para todos os analitos, foi realizado um teste de Tukey onde observou-se que ela apresenta diferença significativa para o cloranfenicol, com maiores valores de recuperação entre 20 e 74%. As propriedades abrasivas da areia parecem proporcionar uma ruptura mais eficiente da amostra, além disto os óxidos metálicos, como óxido de alumínio, de titânio e de ferro presentes na areia atuam como trocadores de íons e ligantes (SANTOS, 2017). O uso da areia, devido seu poder abrasivo, permite um aumento da área superficial da matriz e maior contato do solvente com o analito aprisionado nesta.

O uso de areia como suporte sólido foi relatado para extrair antibióticos quinolonas e sulfonamidas de ovos e leite bovino (BOGIALLI *et al.*, 2003, 2008, 2009), e areia tratada com EDTA para extrair antibióticos aminoglicosídicos de leite bovinos (BOGIALLI *et al.*, 2005).

A substituição de um suporte sólido comercial como o C18 por um suporte sólido alternativo como a areia é uma grande vantagem à técnica de MSPD, uma vez que a areia proporcionou resultados melhores que o C18, contribuindo assim com a química analítica verde uma vez que diminui a geração de resíduos tóxicos e utiliza um material de baixo custo.

5.3.2 Avaliação da temperatura do solvente extrator

A seletividade da MSPD está diretamente relacionada com a combinação entre o suporte sólido e o solvente empregado. Com relação à extração de PPCPs e agrotóxicos, o solvente

mais utilizado é a acetonitrila, mas aplicações utilizando hexano, acetato de etila, metanol, água, acetona e diclorometano também têm sido relatadas (CALDAS *et al.*, 2013a).

Selecionada a areia como suporte sólido, foram avaliadas diferentes temperaturas (21, 50, 75 e 100 °C) para o solvente extrator (água ultrapura) na MSPD, sendo os resultados de recuperação para os analitos apresentados na Figura 9.

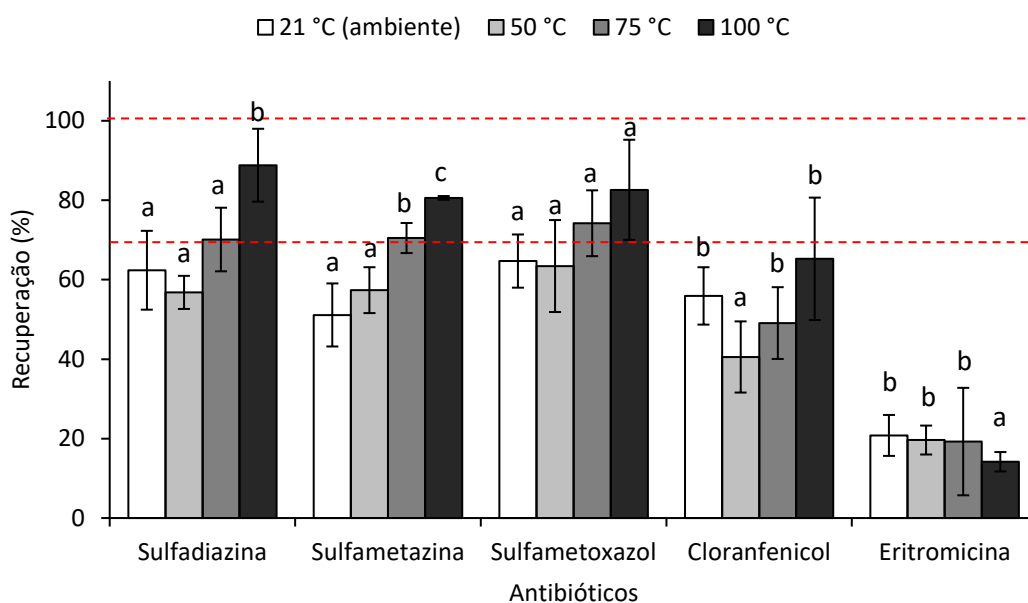


Figura 9. Efeito da temperatura do solvente na recuperação da MSPD de antibióticos em lodo de ETE. (Massa de amostra: 0,5 g; massa de suporte sólido (areia): 0,5 g; volume de solvente (água ultrapura, pH neutro): 5 mL; vórtex: 1 min; centrifugação: 5 min a 8000). As barras indicam valores de RSD.

Médias seguidas por letras iguais, para o mesmo analito, não apresentam diferença estatística significativa ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey com significância de 95%

As recuperações para a temperatura de 21 °C ficaram entre 20 e 64% com RSD < 10%. Para a temperatura de 50 °C, as recuperações foram de 19 a 63% com RSD < 12%. Na temperatura de 75 °C as recuperações ficaram entre 19 e 74% com RSD < 14%. Já as recuperações para a temperatura de 100 °C ficaram entre 14 e 88%, com RSD < 15%. Desta forma a temperatura selecionada para o solvente extrator para a otimização das próximas etapas foi 100 °C pois apresentou maiores valores de recuperação para a maioria dos analitos.

Com exceção da eritromicina, todos os analitos tiveram melhores recuperações com a temperatura de 100 °C, porém foi realizado um teste de Tukey onde pode-se confirmar que a temperatura de 100 °C apresenta diferença significativa para a sulfadiazina e sulfametazina.

Como pode-se observar, ao aumentar a temperatura ocorre um decaimento com diferença significativa nas recuperações da eritromicina, pois a água excessivamente aquecida pode degradar rapidamente os analitos propensos a ataques hidrolíticos ou termolábeis (BOGIALLI *et al.*, 2003).

A água aquecida a altas temperaturas tem sua tensão superficial, viscosidade e polaridade diminuídas progressivamente, portanto, torna-se um meio eficiente para extrair compostos orgânicos, mesmo que pouco solúveis em água à temperatura ambiente (BOGIALLI *et al.*, 2008), como é o caso da sulfadiazina.

5.3.3 Avaliação do pH do solvente extrator

Selecionados a areia como suporte sólido e a temperatura do solvente extrator (água a 100 °C), foi avaliada a variação do pH da água (pH 6 e pH 2) na tentativa de melhorar as recuperações para a eritromicina, sendo os resultados de recuperação dos analitos apresentados na Figura 10.

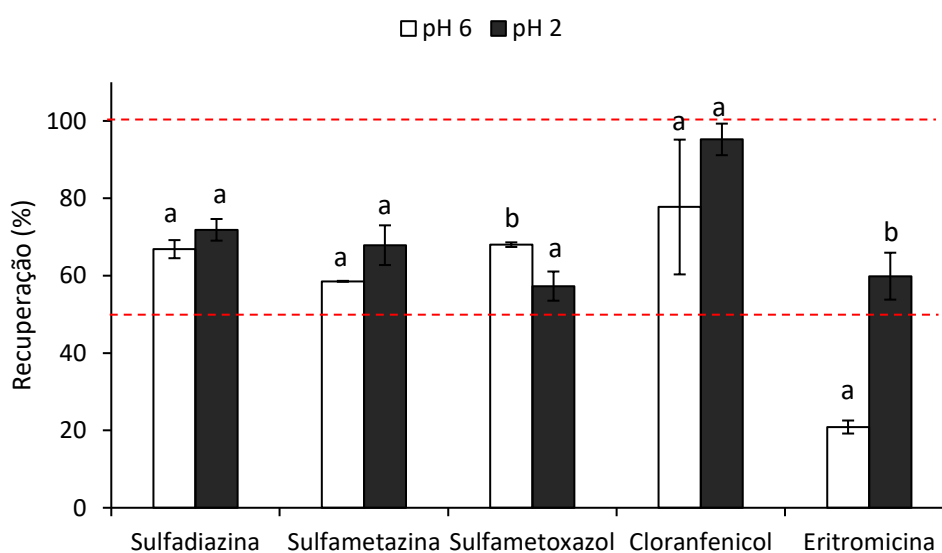


Figura 10. Efeito do pH do solvente (água ultrapura 100 °C) na recuperação da MSPD de antibióticos em lodo de ETE. (Massa de amostra: 0,5 g; massa de suporte sólido (areia): 0,5 g; volume de solvente: 5 mL de água ultrapura 100 °C; vórtex: 1 min; centrifugação: 5 min a 8000). As barras indicam valores de RSD. Médias seguidas por letras iguais, para o mesmo analito, não apresentam diferença estatística significativa ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey com significância de 95%

As recuperações para a água ultrapura em pH 6 ficaram entre 20 e 77%, com RSD <17%, enquanto para o pH 2 foram de 57 a 95%, com RSD < 6%. Pelo teste de Tukey, a água em pH 2 teve uma melhora com diferença significativa para a eritromicina.

Em valores de pH maiores que o pK_a ($>pK_a+1$), a maioria das moléculas ($>90\%$) encontram-se na forma ionizadas, interagindo eletrostaticamente com a superfície coloidal das partículas sólidas (REGITANO; LEAL, 2010), portanto, em pH ácido os analitos encontram-se protonados, diminuindo assim suas interações com a matéria orgânica contida no lodo o que facilita a extração pela água. Isso explica por que a diminuição do pH proporcionou melhores recuperações para todos os analitos. Desta forma, a água ultrapura em pH 2 (acidificada com ácido fosfórico) foi escolhida como solvente extrator.

O cloranfenicol em soluções neutras e ácidas é estável no aquecimento, porém é degradado em pH superior a 10 (PUBCHEM, 2018). Dessa forma foram testados apenas pHs ácidos para que não ocorresse a degradação do analito.

O sulfametoxazol é caracterizado por dois valores de pK_a indicando protonação do grupo amino em um pH de 2 a 3 e desprotonação da porção $R_1SO_2NHR_2$ em pH de 5 a 11. Em geral, as sulfonamidas anfotéricas, como o sulfametoxazol, comportam-se como ácidos fracos e formam sais em soluções fortemente ácidas ou básicas (THIELE-BRUHN, 2003).

5.3.4 Avaliação do tempo de agitação por vórtex

Selecionados a areia como suporte sólido, a temperatura e o pH do solvente extrator (água a 100 °C e pH 2), foi avaliada a variação do tempo de agitação por vórtex na tentativa de avaliar se um tempo de interação maior dos analitos com o solvente melhoraria as recuperações, sendo os resultados de recuperação dos analitos apresentados na Figura 11.

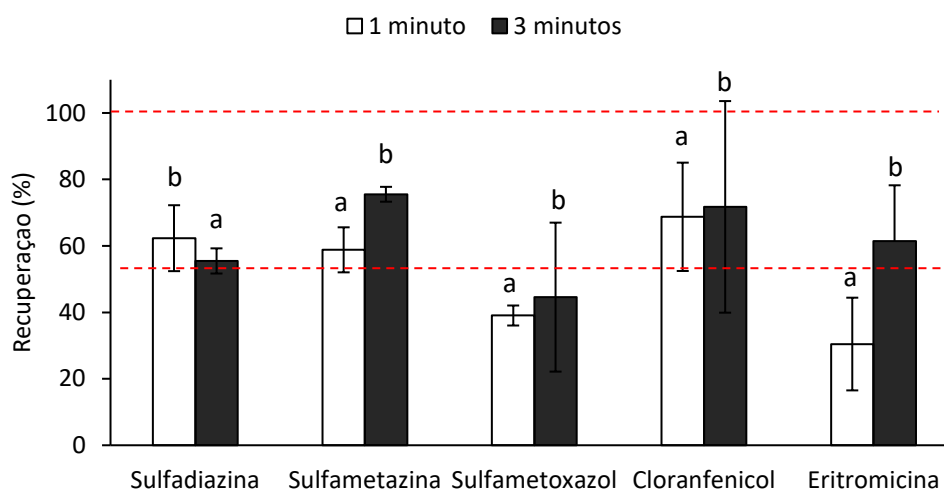


Figura 11. Efeito do tempo de agitação na recuperação da MSPD de antibióticos em lodo de ETE. (Massa de amostra: 0,5 g; massa de suporte sólido (areia): 0,5 g; volume de solvente: 5 mL de água ultrapura 100 °C (pH 2); centrifugação: 5 min a 8000 rpm. As barras indicam valores de RSD. Médias seguidas por letras iguais, para o mesmo analito, não apresentam diferença estatística significativa ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey com significância de 95%

As recuperações para o tempo de 1 minuto foram de 30 a 69%, com RSD < 16, enquanto para o tempo de 3 minutos as recuperações ficaram entre 45 e 76%, com RSD < 32%. Foi realizado um teste de Tukey, onde observou-se que houve diferença significativa para 4 dos 5 analitos, havendo uma melhora nas recuperações.

O aumento do tempo de vórtex proporcionou uma melhora na recuperação dos analitos, pois promoveu um contato maior dos analitos retidos na amostra com o solvente de extração. Dessa forma escolheu-se o tempo de 3 minutos para agitação em vórtex.

5.3.5 Avaliação da extração com diferentes solventes

Para se ter uma comparação da eficiência da extração com água pH 2, comparado a outros solventes comumente utilizados, foram avaliados o uso de etanol e de acetonitrila na extração, conforme a Figura 12.

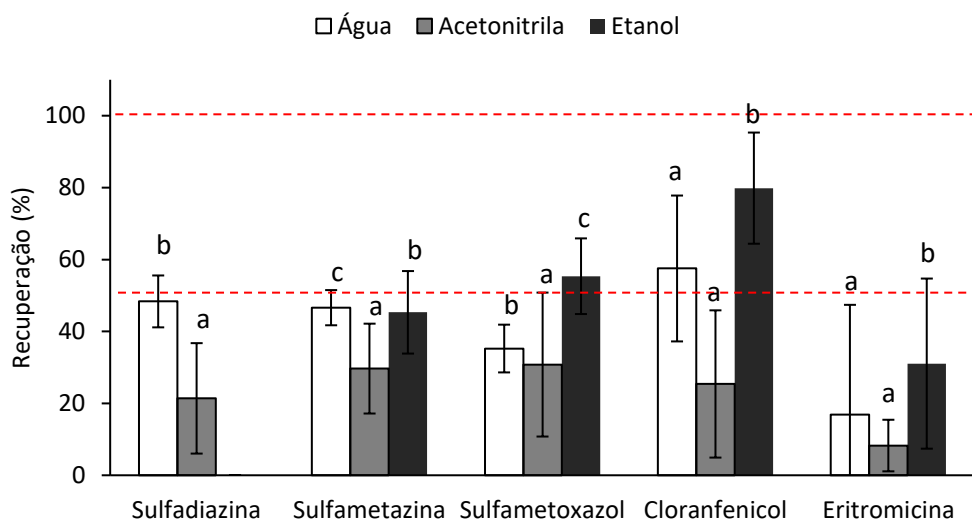


Figura 12. Efeito do solvente na recuperação da MSPD de antibióticos em lodo de ETE. (Massa de amostra: 0,5 g; massa de suporte sólido (areia): 0,5 g; volume de solvente: 5 mL; vórtex 3 min; centrifugação: 5 min a 8000 rpm. As barras indicam valores de RSD. Médias seguidas por letras iguais, para o mesmo analito, não apresentam diferença estatística significativa ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey com significância de 95%

As recuperações para a água (pH 2) ficaram entre 17 e 58% com RSD < 31%, para a acetonitrila as recuperações foram de 8 a 31% com RSD < 20%, já para o etanol as recuperações ficaram entre 31 e 80%, com RSD < 24% e não sendo possível recuperar a sulfadiazina.

Como pode-se perceber, a água recupera tão bem quanto um solvente usualmente utilizado e tóxico (acetonitrila) e um solvente verde (etanol) que não foi capaz de extrair a sulfadiazina, provavelmente por força de polaridade já que a sulfadiazina é o analito mais polar.

5.3.6 VA-MSPD otimizada

A partir dos testes realizados e dos resultados apresentados, o procedimento de determinação de antibióticos em lodo de ETE é apresentado na Figura 13. O método otimizado prevê a maceração de 0,5 g de amostra com 0,5 g de areia por 5 minutos em gral de porcelana, seguido da extração dos analitos com 5 mL de água ultrapura à 100 °C (pH 2) e agitação em vórtex por 3 minutos. Posteriormente, realiza-se uma centrifugação à 8000 rpm por 5 minutos, seguido pela filtração do extrato e nova centrifugação em microtubo à 10000 rpm por 10 minutos, obtendo-se então o extrato para análise em LC-MS/MS.

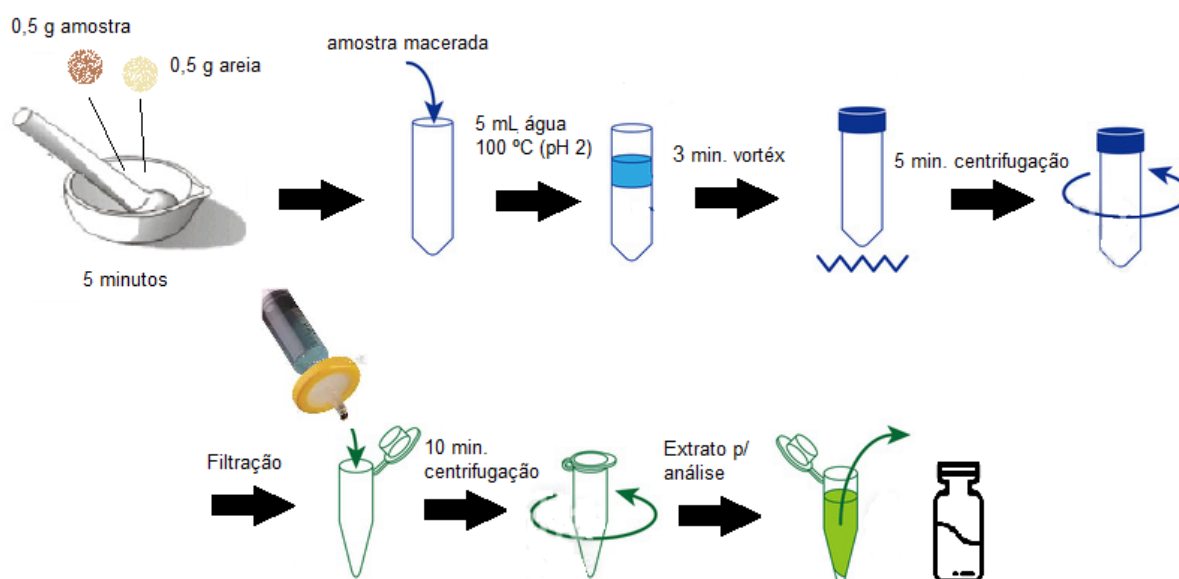


Figura 13. VA-MSPD otimizada para determinação de antibióticos em lodo de ETE (Autoria própria, 2018)

5.4 Validação do método

5.4.1 Limites de quantificação e determinação

A Tabela 7 apresenta os valores de LOD e LOQ instrumentais e do método para os analitos estudados.

Tabela 7. LOQ e LOD instrumentais e do método

<i>Analito</i>	<i>LOQ_i</i> (<i>mg L⁻¹</i>)	<i>LOD_i</i> (<i>mg L⁻¹</i>)	<i>LOQ_m</i> (<i>ng g⁻¹</i>)	<i>LOD_m</i> (<i>ng g⁻¹</i>)
Cloranfenicol	0,005	0,0016	50	1,6
Eritromicina	0,005	0,0016	50	1,6
Sulfadiazina	0,1	0,03	1000	30
Sulfametazina	0,05	0,015	500	15
Sulfametoxazol	0,01	0,003	100	3

Esses limites estão de acordo para determinar as concentrações que vêm sendo encontradas na literatura em amostras de lodo de ETE (Tabela 1).

5.4.2 Curva analítica e linearidade

A Tabela 8 apresenta as curvas analíticas preparadas no solvente e no extrato, seguidas de seus respectivos coeficientes de correlação linear (r) obtidos na validação do método.

Tabela 8. Curvas analíticas no solvente e no extrato, faixas de trabalho e coeficientes de correlação linear

<i>Analito</i>	<i>Faixa de trabalho (mg L⁻¹)</i>	<i>Solvente</i>	<i>r</i>	<i>Extrato</i>	<i>r</i>
Cloranfenicol	0,005 - 1,0	$y = 7166,99 x + 127,389$	0,9569	$y = 7739,35 x + 9,01549$	0,9934
Eritromicina	0,005 - 1,0	$y = 5895,9 x - 8,25405$	0,9948	$y = 51916,1 x + 85,6568$	0,9923
Sulfadiazina	0,1 - 1,0	$y = 5495,51 x + 1851,46$	0,9954	$y = 2517,64 x + 58,0781$	0,9972
Sulfametazina	0,05 - 1,0	$y = 18417,9 x + 79,637$	0,9965	$y = 17464 x + 114,235$	0,9978
Sulfametoxazol	0,01 - 1,0	$y = 10702,5 x + 13,8273$	0,9970	$y = 9276,06 x + 17,2071$	0,9985

Conforme o INMETRO, as curvas apresentam linearidade adequada, pois os coeficientes de correlação linear (r) se apresentam dentro da faixa aceita ($r > 0,90$) para todos os analitos (INMETRO, 2016). As curvas apresentam boa linearidade também segundo a ANVISA, que preconiza valores de $r > 0,990$ (ANVISA, 2017).

5.4.3 Efeito Matriz

Com os coeficientes angulares obtidos nas curvas do extrato e solvente, foi avaliado o EM dos analitos, apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Efeito matriz (EM) para os analitos em estudo.

<i>Analito</i>	<i>EM (%)</i>
Cloranfenicol	8
Eritromicina	781
Sulfadiazina	-54
Sulfametazina	-5
Sulfametoxazol	-13

O cloranfenicol, a sulfametazina e o sulfametoxazol apresentaram efeito matriz considerado baixo (na faixa de $\pm 20\%$) e alto para a sulfadiazina (-54%) e para a eritromicina (781%) (ECONOMOU *et al.*, 2009).

Desta forma, para contornar o alto efeito matriz é necessário utilizar a curva no extrato para quantificação, uma vez que nela já se leva em conta o efeito matriz e o possível aumento ou supressão de sinal.

5.4.4 Exatidão e precisão

Com relação à exatidão e precisão, o método apresentou recuperações entre 15 e 99%, conforme apresentado na Tabela 10. A precisão foi expressa pelo RSD, apresentando valores menores que 32%.

Segundo a SANTE (2017), taxas de recuperação fora da faixa de 70-120% podem ser aceitas se forem consistentes ($RSD \leq 20\%$), mas a recuperação média não deve ser inferior a 30% ou superior a 140% (SANTE, 2017).

Embora o trabalho não apresente resultados dentro dos limites aceitáveis, ele apresenta potencial para ser utilizado na determinação de antibióticos em lodo de ETE.

Gago-Ferrero e colaboradores (2015), obtiveram recuperações entre 63 e 84% com $RSD < 16\%$ para o cloranfenicol, a sulfadiazina, a sulfametazina e o sulfametoxazol, empregando a Extração Assistida por Ultrassom (USE, do inglês *Ultrasound-Assisted Extraction*) e determinação por LC-MS/MS (GAGO-FERRERO *et al.*, 2015). Pavlović e colaboradores (2012) obtiveram recuperações acima de 80% para sulfadiazina, sulfametazina, sulfametoxazol, utilizando a MSPD e determinação por LC-MS/MS para amostras de sedimento (PAVLOVIĆ *et al.*, 2012).

Tabela 10. Recuperação (R%) e precisão (RSD) para os analitos em estudo

<i>Analito</i>	<i>Exatidão</i>						<i>Precisão</i>			
	<i>LOQ</i>		<i>5 LOQ</i>		<i>10 LOQ</i>		<i>5 LOQ</i>		<i>10 LOQ</i>	
	<i>R (%)</i>	<i>RSD</i>	<i>R (%)</i>	<i>RSD</i>	<i>R (%)</i>	<i>RSD</i>	<i>R (%)</i>	<i>RSD</i>	<i>R (%)</i>	<i>RSD</i>
Cloranfenicol	81	3	69	16	99	2	72	32	58	20
Eritromicina	26	17	30	14	24	16	61	17	17	31
Sulfadiazina	39	9	62	10	65	10	55	4	48	7
Sulfametazina	41	5	59	7	56	2	76	2	47	5
Sulfametoxazol	44	8	39	3	50	13	45	22	35	7

6 CONCLUSÕES

O trabalho desenvolvido apresenta caráter inovador, uma vez que não há relatos na literatura de trabalhos que estudaram o uso de água para extração de antibióticos de lodo de ETE.

A substituição de um suporte sólido comercial por um suporte sólido alternativo traz grandes vantagens à técnica de VA-MSPD, proporcionando a redução de custo. A utilização de água ultrapura acidificada como solvente de extração apresentou boas recuperações, não sendo necessário o uso de solventes orgânicos tóxicos e gerando menor quantidade de resíduo. Além disso, o uso da água quando comparado com a acetonitrila, que é o solvente mais tradicionalmente utilizado, apresentou recuperações semelhantes ou superiores, demonstrando potencial de ser empregado como solvente extrator em técnicas de preparo de amostra.

Dessa forma, o método desenvolvido mostrou potencial para a determinação de antibióticos em amostras de lodo de ETE, atingindo os preceitos da química analítica verde. Além disso, apresenta vantagens como uso de suporte sólido alternativo e uso de solventes de baixa toxicidade quando comparado aos métodos tradicionais, baixo volume de solvente e massa de amostra, além de gerar menores volumes de resíduos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AISSE, M. M. **Sistema Econômico de Tratamento de Esgotos Sanitários**. Rio de Janeiro: ABES, 2000.

AMÉRICO, J. *et al.* Fármacos em Uma Estação de Tratamento de Esgoto na Região Centro-Oeste do Brasil e os Riscos aos Recursos Hídricos. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v. 17, n. 3, p. 61–67, 2012.

ANASTAS, P. T. Green Chemistry and the Role of Analytical Methodology Development. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 3, p. 167–175, set. 1999.

ANVISA. **Farmacopeia Brasileira**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33832/260079/5ª+edição+-+Volume+1/4c530f86-fe83-4c4a-b907-6a96b5c2d2fc>>. Acesso em: 20 dez. 2018.

ANVISA. **Validação de métodos analíticos**, 2017. Disponível em: <<https://www20.anvisa.gov.br/coifa/pdf/rdc166.pdf>>

ARIAS, J. L. O. *et al.* Chitosan from shrimp shells: A renewable sorbent applied to the clean-up step of the QuEChERS method in order to determine multi-residues of veterinary drugs in different types of milk. **Food Chemistry**, v. 240, p. 1243–1253, fev. 2018.

BARKER, S. A. Matrix solid-phase dispersion. **Journal of Chromatography A**, v. 885, n. 1–2, p. 115–127, jul. 2000.

BARKER, S. A.; LONG, A. R.; SHORT, C. R. Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion. **Journal of Chromatography A**, v. 475, n. 2, p. 353–361, 18 jan. 1989.

BETTIOL, W.; CAMARGO, O. A. DE. **Lodo de Esgoto**. 1. ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2006.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 523–530, ago. 2003.

BOGIALLI, S. *et al.* Rapid Confirmatory Assay for Determining 12 Sulfonamide Antimicrobials in Milk and Eggs by Matrix Solid-Phase Dispersion and Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 15, p. 4225–4232, jul. 2003.

BOGIALLI, S. *et al.* Simple confirmatory assay for analyzing residues of aminoglycoside antibiotics in bovine milk: hot water extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1067, n. 1–2, p. 93–100, mar. 2005.

BOGIALLI, S. *et al.* A simple and rapid assay based on hot water extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry for monitoring quinolone residues in bovine milk. **Food Chemistry**, v. 108, n. 1, p. 354–360, maio 2008.

BOGIALLI, S. *et al.* Simple assay for monitoring seven quinolone antibacterials in eggs: Extraction with hot water and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 5, p. 794–800, jan. 2009.

BORGES, K. B.; FIGUEIREDO, E. C.; QUEIROZ, M. E. C. **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. 1. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2015.

CALDAS, S. S. *et al.* Avanços recentes da MSPD para extração de resíduos de -agrotóxicos, PPCPs, compostos inorgânicos e organometálicos. **Scientia Chromatographica**, v. 5, n. 3, p. 190–213, 2013a.

CALDAS, S. S. *et al.* A vortex-assisted MSPD method for the extraction of pesticide residues from fish liver and crab hepatopancreas with determination by GC–MS. **Talanta**, v. 112, p. 63–68, ago. 2013b.

CASTRO, A. L. F. G. DE; SILVA, O. R. DA; SCALIZE, P. S. Cenário da disposição do lodo de esgoto : uma revisão das publicações ocorridas no Brasil de 2004 a 2014. **Multi-Science Journal 2015**, v. 1, n. 2, p. 66–73, 2015.

CERQUEIRA, M. B. R. *et al.* Sample as solid support in MSPD: A new possibility for determination of pharmaceuticals, personal care and degradation products in sewage sludge. **Chemosphere**, v. 211, p. 875–883, 2018.

CHEMSPIDER. **Chemspider**. Disponível em: <<http://www.chemspider.com>>. Acesso em: 14 nov. 2018.

CHRISTIAN, T. *et al.* Determination of Antibiotic Residues in Manure, Soil, and Surface Waters. **Acta hydrochimica et hydrobiologica**, v. 31, n. 1, p. 36–44, jul. 2003.

CONAMA, **Resolução nº 375, de 29 de agosto de 2006**. Brasil, 2006.

DEL FIOLE, F. D. S. USO DE CLORANFENICOL NA GESTAÇÃO. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 1, 19 out. 2007.

DELUCIA, R. *et al.* **Farmacologia Integrada: Uso racional de medicamentos**. 5. ed. São Paulo: Clube dos Autores, 2014. v. I

DOLLIVER, H.; KUMAR, K.; GUPTA, S. Sulfamethazine Uptake by Plants from Manure-Amended Soil. **Journal of Environment Quality**, v. 36, n. 4, p. 1224, 2007.

DRUGBANK. **DrugBank**. Disponível em: <<https://www.drugbank.ca>>. Acesso em: 14 nov. 2018.

ECONOMOU, A. *et al.* Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 31, p. 5856–5867, jul. 2009.

EPA, U. S. **Interpretive assistance document for assessment of discrete organic chemicals. Sustainable futures summary assessment** Washington, DC U.S. Environmental Protection Agency, , 2013. Disponível em: <http://www.epa.gov/sites/production/files/2015-05/documents/05-iad_discretres_june2013.pdf>

GAGO-FERRERO, P. *et al.* Simultaneous determination of 148 pharmaceuticals and illicit drugs in sewage sludge based on ultrasound-assisted extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 15, p. 4287–4297, 26 jun. 2015.

GAŁUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z.; NAMIEŚNIK, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 50, p. 78–84, 2013.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 695–706, jun. 2007.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. DA S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667–679, 2010.

HERNÁNDEZ, F. *et al.* Occurrence of antibiotics and bacterial resistance in wastewater and sea water from the Antarctic. **Journal of Hazardous Materials**, v. 363, n. March 2018, p. 447–456, fev. 2019.

HIRSCH, R. *et al.* Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. **Science of The Total Environment**, v. 225, n. 1–2, p. 109–118, jan. 1999.

HUANG, H. *et al.* Diverse and abundant antibiotics and antibiotic resistance genes in an urban water system. **Journal of Environmental Management**, v. 231, n. August 2018, p. 494–503, fev. 2019.

IBGE. **Altas de Saneamento 2011**. Disponível em: <https://ww2.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/atlas_saneamento/default_zip.shtm>. Acesso em: 4 dez. 2018.

INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos - Documento de caráter orientativo**. Disponível em:

<http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_05.pdf>.

IVANOVÁ, L. *et al.* Pharmaceuticals and illicit drugs – A new threat to the application of sewage sludge in agriculture. **Science of The Total Environment**, v. 634, p. 606–615, set. 2018.

JIA, J. *et al.* Occurrence and distribution of antibiotics and antibiotic resistance genes in Ba River, China. **Science of The Total Environment**, v. 642, p. 1136–1144, nov. 2018.

KOROLKOVAS, A.; BURKHALTER, J. H. **Química Farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

LARINI, L. **Fármacos e medicamentos**. Porto Alegre: Artmed, 2008.

LI, W. *et al.* Occurrence, distribution and potential affecting factors of antibiotics in sewage sludge of wastewater treatment plants in China. **Science of The Total Environment**, v. 445–446, p. 306–313, fev. 2013.

MAGEE, H. Y. *et al.* U.S. nationwide reconnaissance of ten infrequently monitored antibiotics in municipal biosolids. **Science of The Total Environment**, v. 643, p. 460–467, dez. 2018.
MAPA. **Instrução Normativa 9/2003** Brasil, 2003.

MARTÍNEZ-CARBALLO, E. *et al.* Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. **Environmental Pollution**, v. 148, n. 2, p. 570–579, jul. 2007.

MELO, S. A. S. *et al.* Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 188–197, 2009.

MELO, V. V. *et al.* **Guia de antimicrobianos**. 1. ed. Goiânia: Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (HC-UFG), 2012.

NOUHA, K. *et al.* Critical review of EPS production, synthesis and composition for sludge flocculation. **Journal of Environmental Sciences**, v. 66, p. 225–245, abr. 2018.

PAVLOVIĆ, D. M. *et al.* Optimization of matrix solid-phase dispersion for liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of 12 pharmaceuticals in sediments. **Journal of Chromatography A**, v. 1258, p. 1–15, out. 2012.

PEREIRA, J. A. R.; SOARES, J. M. **Rede Coletora de Esgoto Sanitário – Projeto, Construção e Operação**. 1. ed. NUMA, 2006.

PUBCHEM. **Pubchem**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 14 nov. 2018.

REGITANO, J. B.; LEAL, R. M. P. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 3, p. 601–616, jun. 2010.

ROCHA, J. C.; ROSA, A. H.; CARDOSO, A. A. **Introdução à química ambiental**. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

ROMBALDI, C. *et al.* New environmentally friendly MSPD solid support based on golden mussel shell: characterization and application for extraction of organic contaminants from mussel tissue. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 16, p. 4805–4814, 30 jun. 2015.

SANTE. **Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed**. Disponível em: <http://www.eurl-pesticides.eu/library/docs/allcrl/AqcGuidance_Sanco_2013_12571.pdf>. Acesso em: 20 out. 2018.

SANTOS, E. O. **Desenvolvimento de método utilizando areia como suporte sólido na MSPD para extração multiclasses de agrotóxicos por GC-MS e LC-MS/MS em frutas e hortaliças**. Universidade Federal do Rio Grande, 2017.

SHI, X. *et al.* Application of passive sampling in assessing the occurrence and risk of antibiotics and endocrine disrupting chemicals in the Yangtze Estuary, China. **Chemosphere**, v. 111, p. 344–351, set. 2014.

SOUZA, G. P. *et al.* Caracterização de material compósito diatomáceo natural. **Cerâmica**, v. 49, n. 309, p. 40–43, mar. 2003.

TANIGUCHI, C.; GUENGERICH, F. P. Metabolismo dos fármacos. In: **Princípios de farmacologia - A base fisiopatológica da farmacoterapia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. p. 46–57.

THIELE-BRUHN, S. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils – a review. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 166, n. 2, p. 145–167, abr. 2003.

UEDA, J.; TAVERNARO, R.; MAROSTEGA, V. Impacto ambiental do descarte de fármacos e estudo da conscientização da população a respeito do problema. **Revista Ciências do Ambiente On-Line**, v. 5, p. 1–6, 2010.

VOSOUGH, M.; ONILGHI, M. N.; SALEMI, A. Optimization of matrix solid-phase dispersion coupled with high performance liquid chromatography for determination of selected antibiotics in municipal sewage sludge. **Analytical Methods**, v. 8, n. 24, p. 4853–4860, 2016.

YANG, Y. *et al.* Antibiotics and antibiotic resistance genes in global lakes: A review and meta-analysis. **Environment International**, v. 116, n. November 2017, p. 60–73, jul. 2018.

ZHANGA, D. *et al.* Antibiotic consumption versus the prevalence of carbapenem-resistant Gram-negative bacteria at a tertiary hospital in China from 2011 to 2017. **Journal of Infection and Public Health**, p. 650–672, maio 2018.