**FURG**

**Dissertação de Mestrado**

# AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE DISPERSÃO DA MATRIZ EM FASE SÓLIDA ASSISTIDA POR VÓRTEX PARA ANÁLISE DE FÁRMACOS EM PEIXES DE CONSUMO.

---

**Gabriel Ianzer Hertzog**

**PPGQTA**

**Rio Grande, RS - Brasil**

**2014**

# AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE DISPERSÃO DA MATRIZ EM FASE SÓLIDA ASSISTIDA POR VÓRTEX PARA ANÁLISE DE FÁRMACOS EM PEIXES DE CONSUMO.

**por**

**GABRIEL IANZER HERTZOG**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental da Universidade Federal do Rio Grande (RS), como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA.

PPGQTA

Rio Grande, RS – Brasil

2014

# AGRADECIMENTOS

Ao **Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental** da Universidade Federal do Rio Grande pela disponibilidade na execução deste estudo

Ao **Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel** pela orientação, pelo apoio, pela credibilidade concedidos a minha pessoa para integrar seu grupo de pesquisa. Além da amizade e momentos compartilhados que levaram ao meu crescimento pessoal e profissional.

A **Profª. Drª. Carla Beatriz Grespan Bottoli** pela participação na comissão examinadora e pelas sugestões feitas para melhoria deste.

A **Profª. Drª. Jaqueline Garda Buffon** pela participação na comissão examinadora e pelas inúmeras sugestões durante o desenvolvimento deste estudo, além da disponibilidade de seu grupo de pesquisa para realização de parte deste estudo.

A **Profª. Dra. Daiane Dias** pelas sugestões feitas para melhoria deste.

A minha esposa **Elise** pelo amor demonstrado em todos momentos, pelos incansáveis conselhos e pelas palavras de conforto e estímulo colocadas nos momentos certos. Por ser parte da caminhada e construção de nossa família.

Ao meus pais **José Nilton** e **Berenice**, pelo incondicional apoio, amor e dedicação na construção de meus valores, além de sempre acreditarem em meu potencial.

A todos colegas e amigos do **Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos e Metais**, pela amizade, apoio e conhecimento compartilhado durante este período.

A **Sergiane**, pela amizade, assistências oferecidas e dedicação em todos momentos para o desenvolvimento deste e meu desenvolvimento pessoal.

Aos colegas e amigos, **Bruno Guimarães, Bruno Meira, Gabriela, Karina, Liziane e Maristela** pela amizade, conhecimentos compartilhados, pelas inúmeras discussões político-filosóficas sem fundamento e litros de café partilhados.

*"Honestidade intelectual é você não fingir que sabe aquilo que não sabe, nem que não sabe aquilo que sabe perfeitamente bem. Se sei, sei que sei. Se não sei, sei que não sei. Isto é tudo. Saber que sabe é saber; saber que não sabe é também saber. A inteligência não é, no fundo, senão o comprometimento da pessoa inteira no exercício do conhecer, mediante uma livre decisão da responsabilidade moral"* (Olavo de Carvalho)

# SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS ..... ix
LISTA DE TABELAS ..... x
LISTA DE ABREVIATURAS ..... xii
RESUMO ..... xiv
ABSTRACT ..... xv
1 INTRODUÇÃO ..... 1
2 OBJETIVOS ..... 3
2.1 Objetivos específicos ..... 3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA ..... 4
3.1 Contaminantes Orgânicos Emergentes ..... 4
3.2 Fármacos ..... 5
3.2.1 Conceitos gerais ..... 5
3.2.2 Legislação e controle ..... 5
3.2.3 Fármacos como contaminantes ambientais ..... 6
3.2.4 Seleção de fármacos de interesse ..... 9
3.3 Peixes ..... 9
3.4 Preparo de Amostras ..... 10
3.4.1 Técnicas de preparo de amostras ..... 11
3.4.2 Dispersão da Matriz em Fase Sólida ..... 11
3.5 Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas ..... 15
3.5.1 Validação de métodos cromatográficos ..... 18
4 MATERIAL E MÉTODOS ..... 22
4.1 Escolha dos analitos ..... 22
4.2 Instrumentação ..... 23
4.3 Material ..... 24
4.4 Solventes e reagentes ..... 24

4.5 Preparo das soluções analíticas ..... 25
4.6 Material ..... 26
4.6.1 Espécies de interesse e Amostras ..... 26
4.6.2 Caracterização do suporte sólido ..... 27
4.7 Otimização das condições cromatográficas e espectrométricas ..... 27
4.7.1 Otimização dos solvente de eluição ..... 28
4.7.2 Otimização do gradiente de eluição ..... 28
4.7.3 Condições espectrométricas ..... 28
4.8 Otimização da técnica MSPD para extração de fármacos da amostra ..... 29
4.8.1 Avaliação do suporte sólido para extração ..... 29
4.8.2 Efeito da adição de sal ..... 29
4.8.3 Avaliação do solvente para extração ..... 29
4.8.4 Avaliação das principais variáveis na extração pela MSPD ..... 30
4.8.5 Avaliação do volume de solvente ..... 30
4.9 Validação ..... 31
4.9.1 Curva analítica e Linearidade ..... 31
4.9.2 Limite de Detecção e Limite de Quantificação ..... 31
4.9.3 Exatidão e Precisão ..... 32
4.9.4 Efeito Matriz ..... 32
4.9.5 Eficiência da MSPD assistida por vórtex e Aplicabilidade ..... 33
4.10 Análise estatística ..... 33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO ..... 34
5.1 Condição cromatográfica otimizada ..... 34
5.2 Condições espectrométricas ..... 35
5.3 Caracterização das amostras ..... 35
5.4 Caracterização da concha de mexilhão dourado ..... 36
5.5 Otimização da extração pela MSPD ..... 39
5.5.1 Avaliação do suporte sólido ..... 39

5.5.2 Efeito do sal ..... 41
5.5.3 Avaliação do solvente para extração ..... 44
5.5.4 Avaliação das principais variáveis na extração pela MSPD ..... 45
5.5.5 Avaliação do volume de solvente ..... 48
5.5.6 Procedimento MSPD otimizado ..... 50
5.6 Validação do método ..... 51
5.6.1 Curva analítica e linearidade ..... 51
5.6.2 Limite de detecção e limite de quantificação ..... 52
5.6.3 Exatidão e Precisão ..... 53
5.6.4 Efeito Matriz ..... 54
5.6.5 Eficiência da MSPD assistida por vórtex otimizada e validada e Aplicabilidade ..... 56
5.7 Comparação da técnica MSPD assistida por vórtex proposta ..... 58
6 CONCLUSÃO ..... 60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 61
PRODUÇÃO CIENTÍFICA REFERENTE AO TRABALHO ..... 72
ANEXO ..... 74
APÊNDICE A ..... 79
APÊNDICE B ..... 81

# LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Possíveis rotas dos fármacos no meio ambiente..... 7
Figura 2. Bioacumulação e biomagnificação de compostos na cadeia trófica de peixes. ..... 9
Figura 3. Esquema de extração pela MSPD usando agitação em vórtex. ..... 14
Figura 4. Estrutura química da quitina e quitosana. ..... 15
Figura 5. Ilustração da ionização por eletrospray após a separação cromatográfica. ..... 17
Figura 6. Ilustração do analisador do tipo triplo quadropolo na espectrometria de massas. ..... 18
Figura 7. Cromatogramas total no MRM para. ..... 34
Figura 8. Imagens da MEV da concha de mexilhão dourado. ..... 37
Figura 9. Microscopia eletrônica de varredura para: C18; Terra diatomácea; Concha de mexilhão dourado ..... 37
Figura 10. Espectro de energia dispersiva da concha de mexilhão utilizando como base a imagem (b) da Figura 7. ..... 38
Figura 11. Espectro de infravermelho da concha de mexilhão dourado. ..... 38
Figura 12. Recuperações e RSD obtidos para MSPD quando testados diferentes sais. ..... 42
Figura 13. Efeito matriz estimado obtido para MSPD quando testados diferentes sais. ..... 43
Figura 14. Recuperações e RSD obtidos na MSPD para diferentes volumes de solvente testados. ..... 49
Figura 15. Procedimento MSPD assistido por vórtex otimizado. ..... 50
Figura 16. Superposição das curvas analíticas no solvente e no extrato demonstrando o efeito matriz ao longo das curvas analíticas. ..... 81

# LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Revisão de trabalhos que detectaram a presença de fármacos em amostras de peixe. ..... 8

Tabela 2. Uso da MSPD para preparo de amostras para diferentes matrizes e diferentes analitos. ..... 12

Tabela 3. Analitos selecionados e respectivas classes químicas, classe terapêuticas, pKa e Log Kow. ..... 23

Tabela 4. Condições testadas como gradiente de eluição para separação cromatográfica. ..... 28

Tabela 5. Matriz do planejamento fatorial fracionado $2^{5-1}$. ..... 30

Tabela 6. Gradiente de eluição cromatográfica para separação dos compostos em estudo. ..... 34

Tabela 7. Analitos com respectivos modo de ionização no ESI, duas transições *m/z*, voltagem do cone e energia de colisão. ..... 35

Tabela 8. Teor de proteínas e teor de lipídios observados para as espécies utilizadas neste estudo (n=2). ..... 36

Tabela 9. Comparação entre características dos materiais testados na MSPD. 38

Tabela 10. Recuperações obtidas para diferentes suportes sólidos testados na MSPD. ..... 40

Tabela 11. Recuperações obtidas para diferentes solventes testados na MSPD. ..... 45

Tabela 12. Análise dos efeitos e valores de p obtidos no planejamento fatorial fracionado $2^{5-1}$. ..... 47

Tabela 13. Equação da reta e coeficiente de correlação linear obtido para cada composto quando realizados pela calibração externa e calibração por superposição na matriz. ..... 51

Tabela 14. Limite de detecção e limite de quantificação instrumental e do método para cada composto. ..... 52

Tabela 15. Exatidão (recuperação) e precisão por repetitividade (RSDr) e precisão intermediária (RSDpi). ..... 54

Tabela 16. Efeito matriz observado pelo método proposto. ..... 55

Tabela 17. Exatidão e precisão da técnica MSPD assistida por vórtex para diferentes espécies estudadas. ..... 57

Tabela 18. Porcentagem do efeito matriz observado através das análises das diferentes espécies de peixes estudadas. ..... 58
Tabela 19. Comparação do método MSPD assistido por vórtex validado com outros métodos para análise de fármacos em peixe. ..... 59
Tabela 20. Variáveis analisadas no Planejamento Fatorial Fracionado $2^{5-1}$ e respostas obtidas para cada analito em cada tratamento. ..... 79

# LISTA DE ABREVIATURAS

ACN, Acetonitrila;

AINE, Antiinflamatório Não-Esteroidal;

ANOVA, Análise de Variância;

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária;

ASE, Extração Acelerada com Solvente, do inglês *Accelerated Solvent Extraction*;

BET, *Brunauer, Emmett, Teller*;

COE, Contaminantes Orgânicos Emergentes;

D-SPE, Extração em Fase Sólida Dispersiva, do inglês *Dispersive Solid Phase Extraction*;

ECD, Detector por Captura de Elétrons, do inglês *Electron Capture Detection*;

EDS, Espectrocopia de Energia Dispersiva, do inglês *Enegry Dispersive Spectroscopy*;

ESI, Ionização por Eletrospray, do inglês *Electrospray Ionization*;

FB, Farmacopéia Brasileira;

FD, Detector por Fluorescência, do inglês *Fluorescence Detection*;

FUNASA, Fundação Nacional da Saúde;

HPLC, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography;*

LOD, Limite de Detecção, do inglês *Limit of Detection*;

Log Kow, Coeficiente de Partição Octanol-Água;

LOQ, Limite de Quantificação, do inglês *Limit of Quantification*;

MeOH, Metanol;

MEV, Microscopia Eletrônica de Varredura;

$MgSO_4$, Sulfato de Magnésio;

MRL, Limites máximos de resíduo, do inglês Maximum Residue Limits;

MRM, Monitoramento de Reações Múltiplas;

MS, Espectrometria de Massas, do inglês *Mass Spectrometry*;

MSPD, Dispersão da Matriz em Fase Sólida, do inglês *Matrix Solid Phase Dispersion;*

$Na_2SO_4$, Sulfato de Sódio;

OCP, Pesticidas Organoclorados, do inglês *Organochlorine Pesticides*;

PLE, Extração em Líquido Pressurizado, do inglês *Pressurized Liquid Extraction;*

PPCPs, Fármacos e Produtos de Cuidado Pessoal, do inglês *Pharmaceuitcal and Personal Care Products;*

QuEChERS, *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*;

RENAME, Relação Nacional de Medicamentos;

RSD, Desvio Padrão Relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*;

$SiO_2$, Sílica;

SPE, Extração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Extraction;*

TSD, Teste de Tukey, do inglês *Tukey Significant Difference*;

USP, *United States Pharmacopoeia*.

# RESUMO

**Título: AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE DISPERSÃO DA MATRIZ EM FASE SÓLIDA ASSISTIDA POR VÓRTEX PARA ANÁLISE DE FÁRMACOS EM PEIXES DE CONSUMO**

Autor: Gabriel Ianzer Hertzog

Orientador: Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel

Os fármacos classificados como contaminantes orgânicos emergentes tornaram-se tópico de discussão ambiental pois estes são capazes de atingir diferentes matrizes do meio ambiente, como água, solo e organismos aquáticos, e estudos demonstrando a toxicidade tem despertado o interesse científico. Neste estudo um método analítico foi otimizado e validado para determinação de quinze fármacos em amostras de peixes empregando preparo de amostras por dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) assistida por vórtex e determinação por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS). O estudo ainda focou na aplicação de diferentes suportes sólidos na etapa de dispersão da MSPD, sendo que três (quitina, quitosana e concha de mexilhão dourado) foram utilizados pela primeira vez para esta finalidade, O método otimizado foi validado seguindo os parâmetros do INMETRO, ANVISA, SANCO e FDA. A curva analítica e linearidade foram avaliados através da calibração externa e superposição na matriz. Os compostos demonstraram linearidade dentro da faixa recomendada, com coeficiente de correlação maior do que 0,99. Os limites de detecção do método variaram de 1 a 100 ng $g^{-1}$, e os limites de quantificação a variaram de 5 a 1000 ng $g^{-1}$. Os valores de recuperação variaram de 68% a 108%, com RSD menores que 13% para todos os compostos. O efeito de matriz foi avaliado e quatro dos quinze compostos apresentaram efeito maior que ±20%. Na aplicabilidade o método demonstrou ser eficiente para extração de fármacos de diferentes espécies de peixe, apresentando exatidão e precisão adequados. Não foram encontrados resíduos de fármacos nas amostras analisadas.

Palavras-chave: Fármacos, MSPD, peixes, LC-MS/MS.

# ABSTRACT

**Title: EVALUATION OF VORTEX ASSISTED MATRIX SOLID-PHASE DISPERSION TECHINIQUE FOR PHARMACEUTICAL ANALISYS IN CONSUMPTION FISHES.**

Author: Gabriel Ianzer Hertzog

Advisor: Prof. Dr.Ednei Gilberto Primel

Pharmaceutical as emerging organic contaminants has became discussion topic in environment because these are capable of reach different matrixes in environment, such as water, soil and aquatic organisms, and studies demonstrating the toxicity of it in environment attracts attention. In this study an analytical method was optimized and validated for determination of fifteen pharmaceuticals in fish samples using vortex assisted matrix solid-phase dispersion (MSPD) as sample preparation and determination by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The study focused on the application of different solid supports in the dispersion step on MSPD, three of these (chitin, chitosan and mussel shell) which were applied for the first time to its goal. The optimized method was validated following INMETRO, ANVISA, SANCO and FDA parameters. Analytical curve and linearity were evaluated by external calibration and matrix-matched calibration. The compounds demonstrated linearity within recommended, with correlation coefficient higher than 0.99. The limits of detection ranged from 1 to 100 ng $g^{-1}$, and the limit of quantification ranged from 5 to 1000 ng $g^{-1}$. Recoveries values ranged from 68 to 108%, with RSD lower than 13% for all the compounds. The matrix effect was evaluated and four of fifteen compounds presented higher matrix effect than ±20%. For the applicability the method shown to be efficient for the extraction of pharmaceutical from different fish species, presenting adequate accuracy and precision. No pharmaceutical residue was found in samples analyzed.

Keywords: Pharmaceutical, MSPD, fish, LC-MS/MS

# 1 INTRODUÇÃO

Considerando que nas últimas décadas os avanços em análise instrumental possibilitaram a detecção de fármacos em amostras ambientais, estudo desenvolvidos para este fim detectaram fármacos em escalas de ng $L^{-1}$ e ng $g^{-1}$. Dentre as matrizes mais estudadas estão água, solo e matrizes biológicas incluindo os peixes (KOSMA *et al.*, 2010; PETROVIC *et al.*, 2010; PRIMEL *et al.*, 2012; WILLE *et al.*, 2012).

Dentre as preocupações envolvendo a contaminação por fármacos, estão as alterações em peixes frente a estes. Sabendo que já são relatados efeitos tóxicos em peixes dada a exposição por fármacos (GILTROW *et al.*, 2009; HAZELTON *et al.*, 2013; MADUREIRA *et al.*, 2012), é importante determinar limites destes compostos no meio para assim garantir a segurança destas espécies. Também a importância nutricional do peixe poderá ser modificada levando a efeitos indesejáveis ao homem.

A contaminação do meio ambiente por fármacos pode levar aos efeitos tóxicos discutidos, principalmente devido aos processos de bioacumulação (MADUREIRA *et al.*, 2012) e biomagnificação (BAIRD; CANN, 2008) de compostos nestas espécies. Por sua vez, os peixes são os mais importantes transportadores de resíduos do meio aquático para o homem (DÓREA, 2008). É importante ampliar estudos que determinem estes compostos em peixes e melhorar, assim, a discussão acerca do assunto visto que os peixes são espécies de importância nutricional e econômica.

É importante salientar que não existem legislações que determinem limites máximos de resíduo (MRL, do inglês *Maximum Residue Limits*) para fármacos em peixes e torna-se necessário expandir estudos para favorecer a discussão para determinar valores destes. Em projeto recente, a Fundação Nacional da Saúde (FUNASA) visa avaliação da presença de fármacos em águas de 5 regiões do Brasil para aperfeiçoar discussão da problemática (FUNASA, 2014).

Para que seja possível a determinação de fármacos em peixes, técnicas de preparo de amostra são necessárias. Assim, o foco principal destes estudos são, a obtenção de resultados satisfatórios, visando a química limpa. Atualmente, aliado a estes estão diminuição do consumo de reagentes e tempo de análise (WEN *et al.*, 2014).

A técnica da Dispersão da Matriz em Fase Sólida (MSPD, do inglês *Matrix Solid Phase Dispersion*) atende as demandas discutidas, sendo uma técnica de baixo custo, que envolve baixo consumo de reagentes e solventes (BLASCO *et al.*, 2002), além de

ser uma técnica adaptativa para diferentes amostras e analitos, devido a eficiência desta estar diretamente associada a escolha dos materiais utilizados como suporte sólido e solvente (PAVLOVIĆ *et al.*, 2007).

O uso de materiais de fonte renovável e de baixo custo se encaixam no mesmo contexto e estes tem demonstrado resultados eficazes (ARIAS *et al.*, 2014; CERQUEIRA *et al.*, 2014). Desta forma, buscar materiais de baixo custo e de fonte renovável que atendam as características para o seu uso em técnicas de extração são necessários.

# 2 OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi o desenvolvimento e validação de método empregando a MSPD assistida por vórtex como etapa no preparo de amostras seguido da determinação em cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em série (LC-MS/MS), para determinação de quinze fármacos em amostras de diferentes espécies de peixes.

## 2.1 Objetivos específicos

- ◊ Selecionar os fármacos da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME – 2010), além dos presentes na lista de princípios ativos do Programa Farmácia Popular do Brasil;
- ◊ Otimizar condições instrumentais de determinação por LC-MS/MS, como fase móvel, voltagem do cone, vazão dos gases de nebulização e do cone, temperaturas da fonte e de dessolvatação para determinação dos compostos em estudo;
- ◊ Otimizar parâmetros envolvidos na extração pela MSPD assistida por vórtex focando a utilização de suportes sólidos alternativos, visando a validação da técnica, quanto a extração dos fármacos;
- ◊ Validar o método para determinação dos fármacos em tecido de Tainha, avaliando limite de detecção, limite de quantificação, curva analítica, linearidade, exatidão, precisão e estudando a influência do efeito matriz;
- ◊ Demonstrar a eficiência e aplicabilidade do método utilizando a MSPD assistida por vórtex otimizada e validada para diferentes espécies de peixes presentes na região estuarina de Rio Grande.

# 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 3.1 Contaminantes Orgânicos Emergentes

Os Contaminantes Orgânicos Emergentes (COE) são assim denominados por definirem um amplo grupo de compostos de diferentes classes, dentre estes pode-se referenciar agrotóxicos, produtos de uso veterinário, produtos industriais, produtos adicionados em alimentos, fármacos e produtos de cuidado pessoal (PPCPs, do inglês *Pharmaceutical and Personal Care Products*), drogas ilícitas e os metabólitos e produtos de degradação destes compostos (ESPLUGAS *et al.*, 2007; LAPWORTH *et al.*, 2012; PETROVIC *et al.*, 2010).

COE são compostos recentemente detectados no ambiente e também compostos desenvolvidos atualmente (LAPWORTH *et al.*, 2012), desta forma muitos destes atualmente usados pelo homem, tem como destino o meio ambiente. Segundo RICHARDSON; TERNES, (2011) os compostos que tem maior importância como contaminantes são os PPCPs, pesticidas, compostos perfluorados, hormônios, retardadores de chama bromados e seus respectivos metabólitos.

A sociedade se tornou dependente do uso destes compostos uma vez que estes são aplicados no cotidiano, alimentação, higiene, bem-estar e saúde (CLARKE; SMITH, 2011). Dado o crescimento do consumo destes produtos há possível contaminação do meio ambiente através do descarte destes. A preocupação com a contaminação do meio ambiente durante os últimos anos trouxe avanço em pesquisas, e os COE têm sido tópico de discussão em diversos grupos de proteção ambiental (WILLE *et al.*, 2012).

Visto que grande parte dos países em desenvolvimento não realiza um tratamento de esgoto que elimine estes compostos (SPONGBERG *et al.*, 2011), é importante salientar que a contaminação do ambiente tanto para substâncias com caráter de persistência ambiental como as com caráter de pseudo-persistencia pode ocorrer, fato reforçado pelo continuo despejo dos COE através das redes de esgotos municipais (MOTTALEB *et al*., 2009).

Segundo STACKELBERG *et al.*, (2007) compostos orgânicos podem ser adsorvidos e desorvidos entre as fases (água-lodo-água) durante o tratamento de esgoto, e continuarem presentes na água após o tratamento, indicando que estes continuam presentes na água mesmo após o tratamento de esgoto.

Já é de conhecimento que certos COE apresentam toxigenicidade, por exemplo, disrupção endócrina, que altera padrões de normalidade do sistema endócrino (LINTELMANN *et al.*, 2003). Outras alterações devido à presença destes contaminantes em meios aquáticos também já foram evidenciadas (GALUS *et al.*, 2013; GILTROW *et al.*, 2009; HAZELTON *et al.*, 2013; MADUREIRA *et al.*, 2012).

## 3.2 Fármacos

### 3.2.1 Conceitos gerais

O Ministério da Saúde define fármaco como a substância química que é o princípio ativo do medicamento (ANVISA). Diferente da definição, este grupo de compostos possui diferentes classificações, quanto a origem (natural, animal, vegetal ou artificial, sendo está última a única que utiliza processo químico para síntese do fármaco), quanto ao foco de ação (organotrópico ou etiotrópico, o primeiro age em um órgão ou tecido e o segundo age em um microorganismo), quanto a ocasião de uso (preventivo, substitutivo, usados para suprimir a causa da doença e sintomático/paliativo) (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 2008).

Por apresentarem diferentes ações, suas composições químicas também são variadas. Assim, compostos com estrutura simples e com poucas funções químicas, até compostos com estrutura complexa e com diversas funções químicas, são usados. Sendo assim, suas propriedades físico-químicas são variadas.

As propriedades acerca dos compostos deve ser considerada para realização de estudos de contaminação por fármacos, mesmo considerando que os fármacos são encontrados em matrizes ambientais em concentrações baixas, as quais só foram possíveis a detecção nas últimas décadas (PRIMEL *et al.*, 2012; WILLE *et al.*, 2012).

### 3.2.2 Legislação e controle

Cada país apresenta legislação específica para o controle pincipalmente da produção e estudos farmacêuticos. No Brasil a regulação é feita pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), órgão pertencente ao Ministério da Saúde. A nível internacional, alguns órgãos regulatórios neste âmbito têm grande importância para o setor farmacêutico, a *Food and Drug Administration* (FDA, 2014) agência norte

americana, a *European Commission* (EC, 2014), agência pertencente a União Européia, além da *Health Canada* (HC, 2014), agência regulatória do Canadá.

No mercado farmacêutico do Brasil, o consumo durante o ano de 2013 foi 12% maior que o ano anterior, sendo a região sul do país responsável por aproximadamente 16% deste (IBOPE, 2013). Segundo BARTHOLOW, (2013), anti-hipertensivos são os medicamentos mais prescritos por médicos, seguido de medicamentos para dor, saúde mental, antibacterianos e reguladores lipídicos.

Em 2004 foi criado um programa de acesso a medicação que elevou o consumo de grupos de fármacos, o Programa Farmácia Popular do Brasil, o qual fornece alguns fármacos de uso continuo gratuitamente ou com preço reduzido (BRASIL).

### 3.2.3 Fármacos como contaminantes ambientais

O estudo de fármacos como contaminantes ambientais é tópico de pesquisas desde a década de 1990 (BEAUSSE, 2004; DAUGHTON; TERNES, 1999), visto que a preocupação da contaminação ambiental, antes destes anos, era focada em compostos agroquímicos e compostos de persistência ambiental elevada. Assim os fármacos se tornam tópicos de discussão em proteção ambiental juntamente com produtos de higiene e cuidado pessoal (DAUGHTON; TERNES, 1999).

A possível rota dos fármacos até atingirem o meio ambiente foi discutida por BILA; DEZOTTI, (2003). ELLIS, (2006) também descreveu as possíveis rotas de fármacos no meio ambiente (Figura 1).

Atualmente a presença de fármacos em diferentes matrizes do meio ambiente é relatada pela comunidade internacional. Na maioria dos casos, estes são encontrados em escala de $\mu g\ L^{-1}$ - $ng\ L^{-1}$ para amostras líquidas e $\mu g\ g^{-1}$ - $ng\ g^{-1}$ para amostras sólidas (BEAUSSE, 2004).

Entre as amostras investigadas ultimamente com relação a presença de fármacos estão os peixes, uma vez que estes são passíveis da contaminação que atinge os corpos hídricos. Desta forma diversos estudos são feitos para se avaliar a contaminação por estes compostos em peixe (Tabela 1).

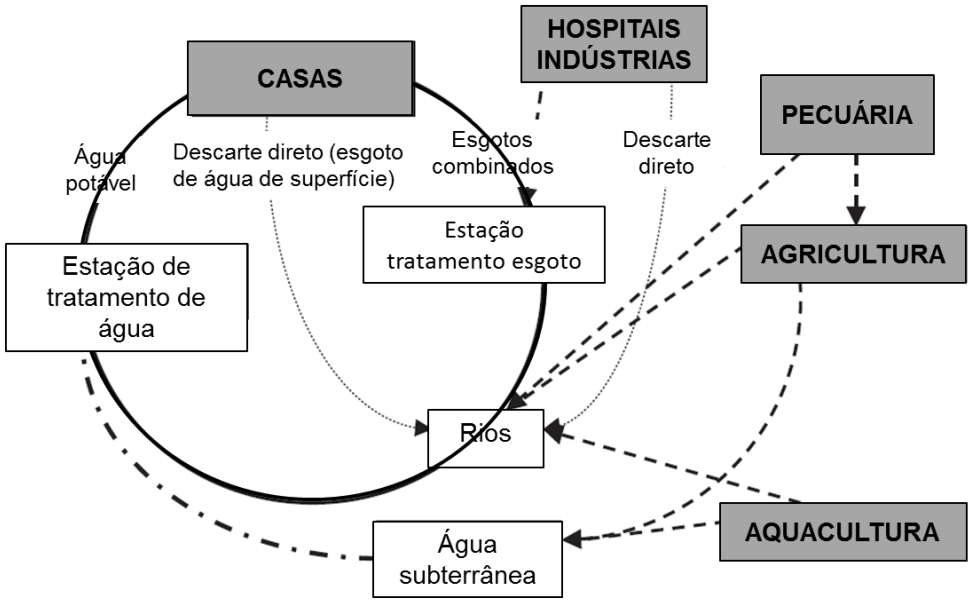



**Figura 1.** Possíveis rotas dos fármacos no meio ambiente. Adaptado de ELLIS, (2006).

Sabendo que os tratamentos de efluentes são ineficazes para remoção de muitos destes compostos, além de processos como a lixiviação do solo (BEAUSSE, 2004), estes compostos podem se aderir a organismos aquáticos tornando possível que efeitos nocivos produzidos por estes sejam observados.

Estudos toxicológicos feitos com peixes na presença de fármacos comprovam que os efeitos gerados são variados. Alteração na reprodução é comum, além de alterações fisiológicas em órgãos como fígado, cérebro e brânquias.

Segundo GILTROW *et al.*, (2009) os efeitos tóxicos apresentados pela presença de propranolol em águas não são preocupantes visto que, a concentração relatada deste composto é na faixa de ng $L^{-1}$, e o efeito tóxico deste é notável em concentrações 1000 vezes maior que a concentração observada no ambiente.

Segundo HAZELTON *et al.*, (2013) concentrações de fluoxetina próximas as encontradas em amostras de água podem causar alterações em peixes, podendo alterar o comportamento do peixe em relação a isca e também na protrusão de pés, além disto os mesmos autores discutem que os efeitos deste fármaco na função do sistema reprodutivo de peixes é bem determinada.

**Tabela 1.** Revisão de trabalhos que detectaram a presença de fármacos em amostras de peixe.

| Fármacos detectados | Espécies estudadas | Referência |
|---|---|---|
| Albendazol, enrofloxacino, fenbendazol, mebendazol, oxfendazol, ácido oxolínico e tiabendazol | *Sparus aurata* | LOPES *et al.*, (2012) |
| Ácido salicílico, ofloxacino, propranolol, paracetamol, carbamazepina | *Mytilus edulis* | WILLE *et al.*, (2011) |
| Norfluoxetina, sertraline, difenidramina, diltiazem e carbamazepina | 6 espécies | RAMIREZ *et al.*, (2009) |
| Sertralina, amitriptilina, anfetamina, atenolol, tiabendazol, diltiazem, difenidramina, enalapril, ranitidina, dehidronifedipina e carbamazepina | *Geukensia demissa* | KLOSTERHAUS *et al.*, (2013) |
| Diclofenaco, citalopram, carbamazepina, venlafaxina, clopidrogrel, carazoldol, propranolol, sotalol, salbutamol | 11 espécies | HUERTA *et al.*, (2013) |
| Fluoxetina, diazepam, nordiazepam, atorvastatina, carbamazepine, diclofenaco, naproxeno, paroxetina, e sertralina. | *Oncorhynchus mykiss, Pimephales promelas* | TOGUNDE *et al.*, (2012) |
| Diclofenaco, atenolol, oxcarbamazepina e carbamazepina | *Gambusia affinis* | VALDES *et al.*, (2013) |
| Cloranfenicol | *Pelodiscus sinensis* | LU *et al.*, (2012) |
| Desmetilsertralina e difenidramina | *Abramis brama* | SUBEDI *et al.*, (2012) |

MADUREIRA *et al.*, (2012) avaliaram a toxicidade de fármacos não esteroides na função hepática de peixes, indicando que a presença destes fármacos no ambiente altera a massa de células e expressão de vitelogenina e do citocromo P450 1A. Os mesmos autores ainda ressalvam que os testes de toxicidades propostos não revelam as condições ambientais.

Acredita-se que os compostos farmacêuticos presentes no meio ambiente causem efeitos adversos ao homem via consumo de água e organismos aquáticos (CUNNINGHAM *et al.*, 2009).

### 3.2.4 Seleção de fármacos de interesse

Dentre os fármacos constam mais de 4.000 (quatro mil) compostos disponíveis ao consumo do homem e juntos a estes 10.000 (dez mil) compostos usados na formulação farmacêutica (BEAUSSE, 2004). Devido a esta grande variedade de compostos, muitos destes são passíveis de serem estudados, e acaba sendo praticamente impossível estudar tantos compostos em uma determinada amostra com um determinado método.

Para tal deve-se selecionar os principais compostos usados, além de considerar as características a cerca destes compostos, podendo citar algumas das mais importantes para estudos de contaminação; coeficiente de partição, solubilidade em água, hidrofobicidade, coeficiente de adsorção, biomagnificação e toxicidade (BEAUSSE, 2004; GHISELLI; JARDIM, 2007).

## 3.3 Peixes

Os peixes são espécies de grande importância na cadeia alimentar nomeadamente para o homem, os quais fornecem diversos nutrientes funcionais, promovendo a melhoria da saúde e qualidade de vida do homem (DÓREA, 2008). Segundo LICHTENSTEIN, (2006) os principais nutrientes fornecidos pelos peixes são os ácidos graxos de configuração ômega 3. Estes lipídeos auxiliam principalmente funções do sistema circulatório humano.

Os peixes são importantes filtradores de resíduos presentes no meio aquático, sendo então considerados bioacumuladores (MADUREIRA *et al.*, 2012), e além de acumularem os resíduos presentes no meio, apresentam característica de biomagnificação, realizando o transporte destes compostos acumulados ao longo da cadeia trófica (Figura 2) (GHISELLI; JARDIM, 2007; GOBAS *et al.*, 1998).

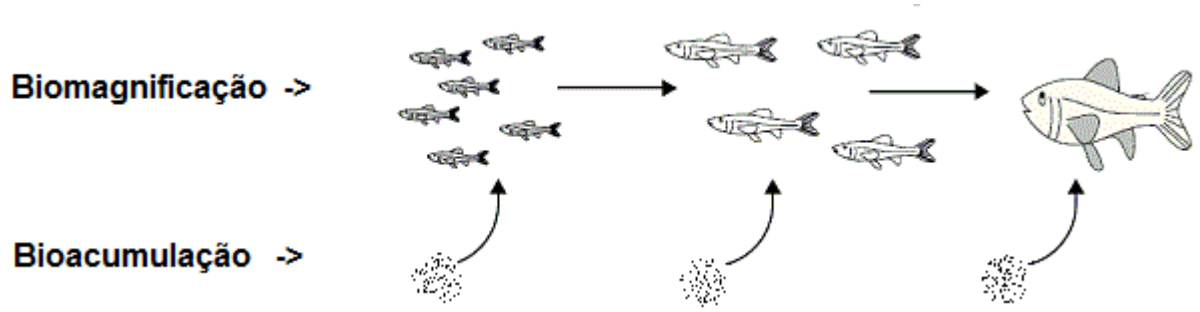



**Figura 2.** Bioacumulação e biomagnificação de compostos na cadeia trófica de peixes. Adaptado de HODGSON, (2010).

Segundo DÓREA, (2008), considerando os fatos, da possível bioacumulação e biomagnificação de compostos pelos peixes, os malefícios que o consumo de peixes contaminados podem trazer ao homem devem ser considerados e, os peixes são importantes de maneira nutricional para o homem, onde a ausência de consumo de pescado pode causar a deficiência dos nutrientes oferecidos pelo peixe.

Estudos voltados para a determinação de contaminantes orgânicos emergentes em peixes ressalvam as considerações acima citadas (STUART *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2012), entretanto mais estudos neste sentido são imprescindíveis (KOSTICH; LAZORCHAK, 2008; WILLE *et al.*, 2011).

### 3.4 Preparo de Amostras

Um procedimento analítico completo abrange cinco etapas principais, das quais podem ocorrer sub-etapas, sendo estas a amostragem, o preparo da amostra, a separação/extração, a detecção/determinação e a análise dos dados (CHEN *et al.*, 2008).

O preparo da amostra pode ser considerado como etapa crítica no desenvolvimento de um procedimento analítico (WEN *et al.*, 2014), podendo este, ser responsável por até 80% do tempo na execução de um método (CHEN *et al.*, 2008).

O preparo da amostra consiste em isolar os analitos de interesse de compostos que possivelmente causem interferência na análise (RIDGWAY *et al.*, 2007; SMITH, 2003; WEN *et al.*, 2014), e, quando necessário pre-concentra o(s) analito(s) e/ou transforma o(s) analito(s) em determinada forma que seja compatível com o método de detecção ou de separação (PAN *et al.*, 2014).

HELALEH *et al.*, (2012) ressaltam também que, no preparo da amostra, uma etapa de limpeza, seja esta concomitante ou não a etapa de extração, necessita ser utilizada, a qual visa eliminar ao máximo, possíveis interferentes que venham alterar, mascarar ou inibir a quantificação dos analitos de interesse.

O preparo de amostra, dentro de todo o procedimento analítico, exige efetividade, e para que se obtenha a desejada resposta, são necessários conhecimentos específicos da amostra em estudo e ainda conhecimento das propriedades físico-químicas dos compostos a serem estudados (RODRIGUES, 2010; TOMASINI *et al.*, 2011), baseado nestas informações, pode-se definir a estratégia do preparo de amostra.

O foco das técnicas de preparo de amostras tem sido voltado para redução de volume de solvente orgânico, menor massa ou volume de amostra, focando ainda na seletividade da extração, possível automação do processo além da minimização de material de laboratório utilizado (WEN *et al.*, 2014).

### 3.4.1 Técnicas de preparo de amostras

Técnicas tradicionais como Mills (1963), Becker (1971), Luke (1975), Specht e Tilkes (1980), são referências importantes no preparo de amostras para análise de compostos orgânicos em matrizes complexas (ANASTASSIADES *et al.*, 2003), além da extração por Soxhlet (1879), amplamente utilizada até hoje.

No entanto técnicas inovadoras com capacidade de extração de diversos compostos de diferentes classes simultaneamente foram introduzidas. As técnicas podem ser separadas em duas grandes classes. As que baseiam-se somente no princípio de extração por solvente; Soxhlet, Extração por Fluído Supercrítico, Extração em Líquido Pressurizado (PLE, do inglês *Pressurized Liquid Extraction*) e Micro Extração Líquido-Líquido Dispersiva. E as técnicas que utilizam outros reagentes como materiais adsortivos, sais e membranas e estas têm importância por empregarem não só menores volumes de solventes, mas também a aplicação de materiais renováveis e de menor custo. Neste contexto encaixam-se o QuEChERS (do inglês *Quick, Easy, Cheap, Rugged and Safe*) (ANASTASSIADES *et al.*, 2003), a Extração em Fase Sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*), a Micro Extração em Fase Sólida, a Extração Sortiva com Barra de Agitação e a Dispersão da Matriz em Fase Sólida (MSPD).

### 3.4.2 Dispersão da Matriz em Fase Sólida

A técnica de preparo de amostra MSPD foi desenvolvida por BARKER *et al.*, (1989) para o isolamento de drogas de tecidos bovinos e mostrou características atraentes para análise de amostras sólidas e semi-sólidas de caráter complexo, tais como tecidos animais e amostras vegetais (PAVLOVIĆ *et al.*, 2007). Esta técnica já foi aplicada até 2007 a, pelo menos, 250 publicações, exibindo ainda qualidade de ser versátil por ser usada em mais de 70 matrizes diferentes (BARKER, 2007). A Tabela 2 apresenta diferentes aplicações da MSPD, tanto para matriz, analitos e técnicas de determinação

A simplicidade é uma característica importante da MSPD, a técnica é baseado na quebra/disrupção da amostra por maceração em graal com pistilo utilizando um material como suporte sólido, permitindo o aumento da área superficial da amostra.

Desta forma, a MSPD permite a interação do(s) analito(s) presente(s) na amostra com o(s) solvente(s) adequado(s). Após a maceração, a mistura final é transferida para um cartucho de SPE, onde é empacotada e por fim o solvente é transferido através do cartucho e recolhido ao final para posterior analise cromatográfica (BARKER *et al.*, 1989).

**Tabela 2.** Uso da MSPD para preparo de amostras para diferentes matrizes e diferentes analitos.

| Matriz | Analitos | Determinação | Referência |
|---|---|---|---|
| Peixe | PPCP | GC-MS/MS | TSAI *et al.*, (2014) |
| Algas | Triazinas | HPLC-DAD | RODRIGUEZ-GONZALEZ *et al.*, (2014) |
| Óleos vegetais | OCP* | GC-ECD** | LI *et al.*, (2014) |
| Alimentos de origem animal | Hormônios | UPLC-MS/MS | FAN *et al.*, (2014) |
| Leite de cabra | Hormônios | EC***-DAD | GANAN *et al.*, (2014) |
| Peixe | Mercúrio e metil mercúrio | GC-MS | DUARTE *et al.*, (2013) |
| Arroz | Imidacloprida | LC-MS/MS | CHEN; LI, (2012) |
| Manteiga | Hormônios | GC-MS | SU *et al.*, (2011) |
| Chufas | Aflatoxinas | LC-FD**** | SEBASTIA *et al.*, (2010) |
| Cebola | Agrotóxicos | LC-MS/MS | RODRIGUES *et al.*, (2010) |

* Pesticidas organoclorados (OCP, do inglês, *Organochlorine pesticides*)

** Detector por captura de elétrons (ECD, do inglês, *electron capture detector*);

*** Eletroforese capilar;

**** Detector por Fluorescencia (FD, do inglês, *Fluorescence Detection*)

O custo desta técnica pode ser considerado baixo devido a poucas etapas envolvidas no processo, associado a pouco volume de solventes aplicados (CHU *et al.*, 2005; KRISTENSON *et al.*, 2006) e pequenas quantidades de amostras (MOLINER-MARTINEZ *et al.*, 2009), fatores que também minimizam as incertezas na análise por esta técnica.

Além disso, segundo PENSADO *et al.*, (2005) a MSPD tem vantagem frente a outras técnicas por apresentar boas recuperações em análise de amostras com teor lipídico elevado, como tecidos animais e alimentos. Segundo BLASCO *et al.*, (2002) a MSPD é vantajosa comparada a outras técnicas de preparo de amostra devido a redução significativa do volume de solventes orgânicos utilizados.

Com relação a determinação de fármacos estes já foram extraídos por MSPD em amostras de sedimento (PAVLOVIC *et al.*, 2012), alface (CALDERON-PRECIADO *et al.*, 2009) e espécies aquáticas (LU *et al.*, 2012; SELF; WU, 2012; TSAI *et al.*, 2014)

Por vezes, a MSPD não é considerada como técnica de extração, mas simplesmente uma técnica de dispersão da amostra, sendo a etapa de extração subsequente na MSPD realizada originalmente por SPE (BARKER *et al.*, 1989). Esta etapa de extração já foi adaptada ao uso de vórtex (CALDAS *et al.*, 2013b), a Extração Acelerada por Solvente (ASE, do inglês *Accelerated Solvent Extraction*) (SHEN *et al.*, 2011), e a Extração em Fluído Pressurizado já foram aplicados (CALDERON-PRECIADO *et al.*, 2009).

#### 3.4.2.1 Modificação da MSPD

SEBASTIA *et al.*, (2010) propôs uma modificação na técnica de MSPD, onde não há uso do empacotamento da amostra macerada em cartucho SPE, mas se aplica a direta agitação de um tubo de fundo cônico contendo a amostra macerada com solvente, para extrair aflatoxinas de chufas. A mesma técnica foi utilizado por DUARTE *et al.*, (2013) para extração de espécies de mercúrio em peixe e por CALDAS *et al.*, (2013b) para extração de agrotóxicos de fígado de peixe e hepatopancreas de caranguejo. O esquema de extração por esta é demonstrado na Figura 3.

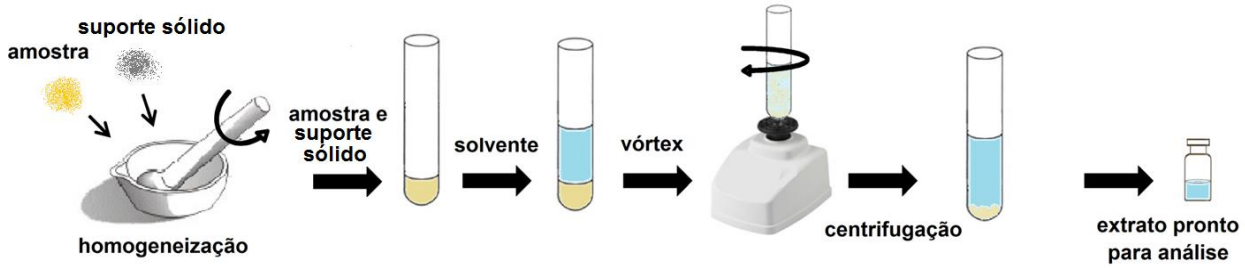



**Figura 3.** Esquema de extração pela MSPD usando agitação em vórtex. Adaptado de CALDAS *et al.*, (2013b).

Vantagens da substituição da eluição em cartucho de SPE para agitação em vórtex está na diminuição de uma etapa, a de empacotamento da amostra, já que esta pode gerar maiores desvios na extração devido a variação da maneira como o material macerado é empacotado, além da variabilidade durante várias amostras. Outra vantagem é que a agitação em vórtex aumenta o tempo ao qual a amostra fica em contato com o solvente (CALDAS *et al.*, 2013b), podendo melhorar a eficiência de extração.

Visto também que a etapa de dispersão é determinante na eficiência de extração, torna-se possível adequar a técnica baseada na MSPD escolhendo o solvente para extração e o suporte sólido apropriado (BARKER, 2007). Os solventes mais comumente utilizados são acetonitrila (ACN), acetona, metanol (MeOH), acetato de etila, hexano, diclorometano e clorofórmio (CAPRIOTTI *et al.*, 2013; GARCIA-LOPEZ *et al.*, 2008).

Para os suportes sólidos, diferentes materiais são testados na etapa de dispersão. De acordo com CAPRIOTTI *et al.*, (2013), GARCIA-LOPEZ *et al.*, (2008) e BARKER, (2007), materiais como C18, florisil, alumina e sílica ($SiO_2$) são os mais frequentes em métodos baseados na MSPD, mas estes são materiais de fonte comercial e sintética. No campo de desenvolvimento de materiais, outros são utilizados na MSPD, como nano tubos de carbono (SU *et al.*, 2011), nano partículas metálicas (WEN *et al.*, 2014) e polímeros molecularmente impressos (CHEN; LI, 2012; GANAN *et al.*, 2014).

Além destes, materiais já foram aplicados em MSPD, suportes sólidos de ocorrência natural e de baixo custo, como areia (QUINTANA *et al.*, 2009) e terra diatomácea (GONZÁLEZ-MARIÑO *et al.*, 2010; VILLAVERDE-DE-SÁA *et al.*, 2012) são interessantes, porém tem sua aplicação limitada. Sendo materiais de fonte natural abrem a possibilidade de se testar outros materiais de fonte natural, principalmente os que apresentam características físicas semelhantes, como tamanho de partícula, volume e tamanho de poros (AL-DEGS *et al.*, 2001; TSAI *et al.*, 2006).

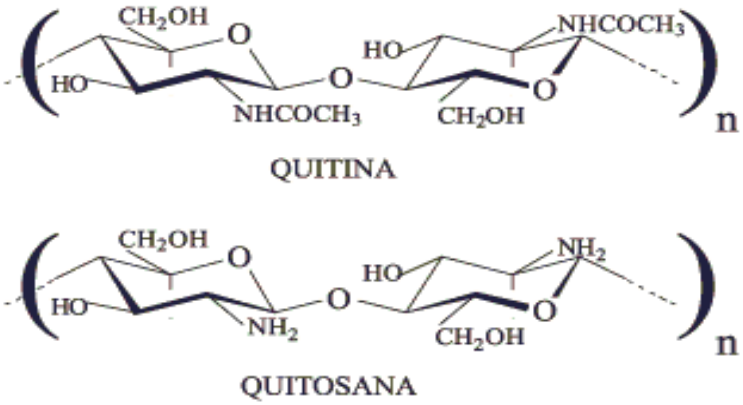



**Figura 4.** Estrutura química da quitina e quitosana.
Adaptado de BATTISTI; CAMPANA-FILHO, (2008).

Neste sentido, materiais como a quitina e quitosana, já aplicados em métodos de extração (ARIAS *et al.*, 2014; CERQUEIRA *et al.*, 2014) (Figura 4), e que apresentam características que justifiquem sua aplicação para este fim (DOTTO *et al.*, 2012) apresentam-se como alternativas a MSPD.

## 3.5 Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas

Cromatografia é uma técnica de separação de misturas de compostos, baseada na interação físico-química entre duas fases em contato. As fases são determinadas por, fase móvel e fase estacionária, onde a primeira se move através da segunda. A separação dos componentes da mistura é dada pelo fluxo da fase móvel através da fase estacionária, desta forma cada componente é seletivamente retido pela fase estacionária, retenção esta, determinada pelas propriedades físico-químicas dos compostos (COLLINS *et al.*, 2006; SKOOG *et al.*, 2006).

Dentre os tipos de cromatografia, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) é amplamente utilizada na determinação de compostos agroquímicos, farmacêuticos, bioquímicos e toxicológicos em amostras complexas (COLLINS *et al.*, 2006; SKOOG *et al.*, 2006). Devido a sensibilidade e seletividade na análise quantitativa simultânea de diversos compostos (MOREAU; SIQUEIRA, 2008) esta técnica é uma ferramenta eficaz na resolução de vários problemas analíticos, sendo capaz de separar moléculas de alto e baixo peso molecular com diferentes propriedade físico-químicas (NUNEZ *et al.*, 2012).

Segundo COLLINS *et al.*, (2006) as vantagens apresentadas por HPLC são, o tempo de análise, resolução elevada, boa análise qualitativa, bons resultados

quantitativos, boa detectabilidade, versatilidade e mecanização. As desvantagens são, alto custo do equipamento, alto custo de operação e necessidade de experiência de manuseio.

Mesmo a HPLC sendo uma técnica de alta eficiência na separação de compostos é necessária a presença de técnicas confirmatórias suficientemente sensíveis para obter as informações sobre os compostos separados na cromatografia (CHIARADIA *et al.*, 2008). Assim, diferentes tipos de detectores são usados com a HPLC, dentre os mais importantes na análise de resíduos orgânicos estão, fluorescência, arranjo de diodos e espectrometria de massas (MS, do inglês, *Mass Spectrometry*) (COLLINS *et al.*, 2006).

MS é o detector mais universal dentre os citados e apresenta alta seletividade, pois é capaz de analisar compostos pela sua razão massa/carga (*m/z*), operando no modo de monitoramento de reações múltiplas, consegue analisar picos sobrepostos com eficiência, além de boa detectabilidade (COLLINS *et al.*, 2006).

O acoplamento da MS a HPLC corroborou com avanços em química analítica, no sentido de produzir resultados em escalas de µg até pg (RODRIGUES, 2011). Para o acoplamento entre as duas técnicas é necessário uma fonte de ionização do eluato da cromatografia e ajuste da vazão da coluna cromatográfica para o MS, que necessita de vácuo (COLLINS *et al.*, 2006).

As fontes mais usuais são as que ionizam o eluato a pressão atmosférica, dentre estas, estão à ionização por Eletrospray (ESI, do inglês *Electrospray Ionization*) e a ionização química a pressão atmosférica (CHIARADIA *et al.*, 2008).

Na ESI a fase móvel que sai da coluna cromatográfica passa por um capilar a alta voltagem, desta forma há formação do spray. O spray é então dessolvatado em um fluxo de gás seco, com isto a evaporação do solvente diminui as gotas até que as cargas presentes na gota ficam maiores que a tensão superficial, levando a “explosão coulômbica”, que geram gotas de 10% do tamanho da gota original. Uma série de explosões ocorrem até que são formados íons dos analitos, que são direcionados para o analisador (BICUDO, 2007; CALDAS, 2009). A Figura 5 demonstra o esquema de formação dos íons no ESI.

Após a ionização dos analitos estes entram no analisador. Dentre os analisadores, o triplo quadropolo é importante na análise de resíduos de contaminantes em alimentos, dada sua capacidade para análise e confirmação de compostos orgânicos. Com este tipo de analisador é possível fazer análise simultânea de 100-150 compostos (MALIK *et al.*,

2010), evidenciando a possibilidade da quantificação de diversos contaminantes em uma só análise.

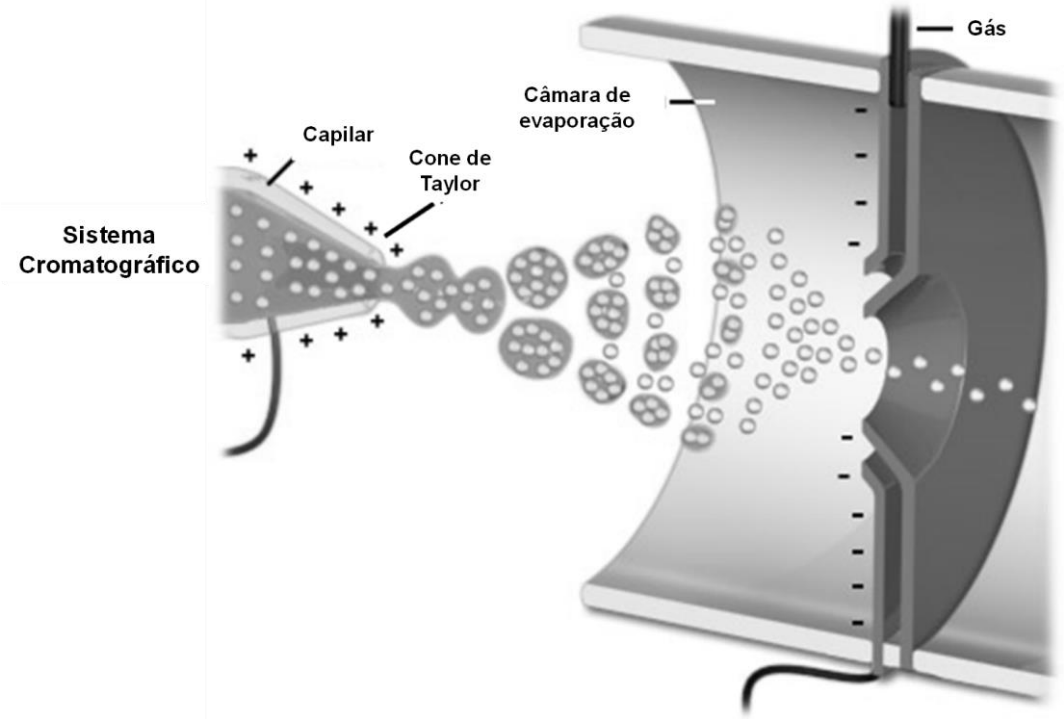



**Figura 5.** Ilustração da ionização por eletrospray após a separação cromatográfica. Adaptado de HENDRICKSON, (2014).

Os quadropolos são constituídos de quatro hastes onde se aplicam uma corrente elétrica e um potencial, alternadamente gerando um campo elétrico. A voltagem do campo elétrico aplicada ao quadropolo irá determinar a passagem de íons de uma determinada *m/z* de forma estável e o desvio de íons que não são de interesse (CORILO, 2014).

No analisador triplo quadropolo, dois quadropolos são efetivos na seleção de íons e um é usado como cela de colisão para fragmentação de íons. Assim os íons que são selecionados no primeiro quadropolo, passam pelo segundo quadropolo (cela de colisão), onde se aplica um potencial para manter os íons em passagem sem selecioná-los e faz a dissociação destes pela colisão com um gás inerte, os íons produtos formados chegam no terceiro quadropolo e são novamente selecionados (RICCIO, 2014). A Figura 6 ilustra um analisador triplo quadropolo e a função de cada quadropolo.

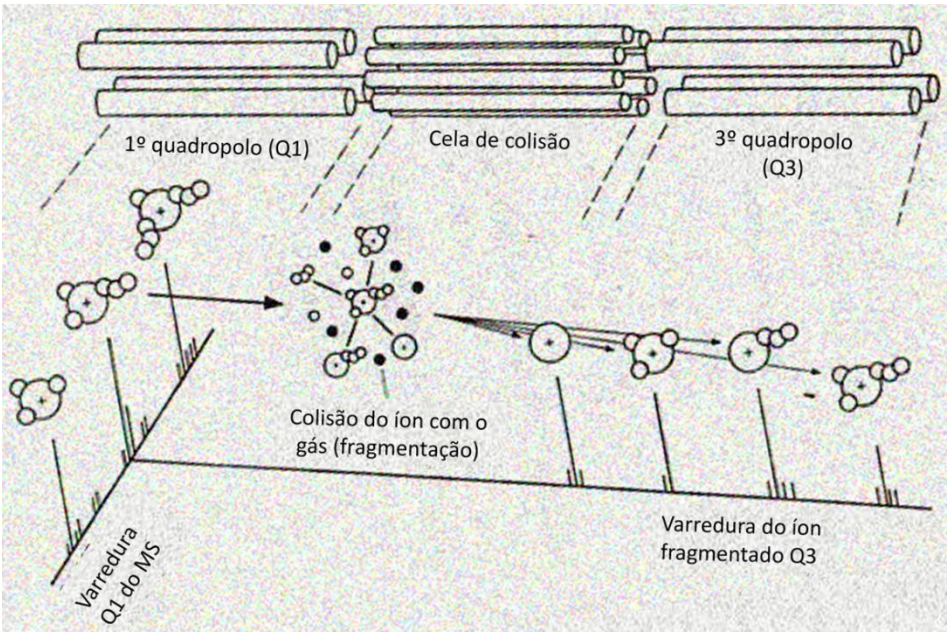



**Figura 6.** Ilustração do analisador do tipo triplo quadropolo na espectrometria de massas. Adaptado de PINTO, (2011).

Na configuração de triplo quadropolo é possível se operar no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM) ou monitoramento seletivo de reações, assim além de analisar o íon molecular é possível confirmar este por suas fragmentações especificas (CHIARADIA *et al.*, 2008). As fragmentações de cada composto podem ser obtidas pela injeção de uma solução padrão do analito diretamente no MS/MS (SKOOG *et al.*, 2006).

### 3.5.1 Validação de métodos cromatográficos

A validação de um método analítico consiste em demonstrar de forma confiável, através de figuras de mérito, que o procedimento analítico desenvolvido para determinada finalidade apresenta respostas que garantem a confiabilidade dos resultados obtidos, permitindo que as informações geradas sejam interpretáveis (RIBANI *et al.*, 2004).

A validação visa minimizar e/ou controlar fatores que tornem as respostas geradas imprecisas ou inexatas (LANÇAS, 2004). As figuras de mérito são referências quantitativas do desempenho da técnica validada e através da qualidade das medidas instrumentais e confiabilidade estatística dos cálculos no processamento dos dados, garante-se o bom desempenho da validação analítica (RIBEIRO *et al.*, 2008).

Seletividade, curva analítica, faixa de linearidade, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ), precisão, exatidão e robustez são figuras de mérito comumente usadas para validação de métodos analíticos de separação de compostos (RIBANI *et al.*, 2004).

SANCO, (Document nº SANCO/12571, 2013), FDA, (2013), INMETRO, (2010) e ANVISA, (2003) são guias importantes para validação de procedimentos analíticos, estes contém informações essenciais para atingir o objetivo de obter um método analítico validado, compreendem tanto figuras de mérito, quanto parâmetros de confiabilidade que devem ser considerados durante a validação.

O planejamento adequado para o desenvolvimento e execução da validação são importantes, logo adotar uma estratégia de validação é necessária, dada a relação desta com o procedimento analítico, os compostos de interesse e a complexidade da amostra (RIBANI *et al.*, 2004).

#### 3.5.1.1 Curva analítica e linearidade

A curva analítica é a figura de mérito que demonstra a relação entre a concentração do composto de interesse e a resposta obtida pelo instrumento analítico, no caso da cromatografia, a área do pico. A relação destes é expressa na forma de equação da reta obtida pela regressão linear (Equação 1), e além dos coeficientes de regressão é obtido também o coeficiente de correlação *r* (RIBANI *et al.*, 2004).

A linearidade ou faixa linear demonstra a faixa em que a concentração ou massa do composto de interesse é proporcional a resposta obtida pelo instrumento de análise. O coeficiente de correlação *r* demonstra se as repostas apresentadas na faixa linear e na curva analítica são significativas, quanto mais próximo de 1,00 foi o valor de *r* mais próximas estão as respostas da curva construída (RIBANI *et al.*, 2004).

$$y = ax + b \quad (1)$$

Onde:

y = resposta medida;

x = concentração;

a = inclinação da curva analítica (sensibilidade);

b = intersecção com o eixo y.

### 3.5.1.2 Limite de detecção e limite de quantificação

O LOD e LOQ são valores que demonstram qual a concentração mínima ou massa do composto de interesse é possível ser detectada, para o LOD e quantificada, para o LOQ, com precisão e exatidão. Tanto o LOD, quanto o LOQ são determinados pela razão entre o sinal do composto de interesse e o ruído instrumental apresentado. Para o LOD é considerado três vezes o sinal/ruído, e para o LOQ é considerado dez vezes o sinal/ruído (CASSIANO *et al.*, 2009; RIBANI *et al.*, 2004).

### 3.5.1.3 Exatidão e Precisão

Exatidão deve ser calculada em três concentrações, estas devem contemplar concentração baixa, próxima ao LOQ, concentração média e concentração alta para garantir a exatidão do procedimento analítico ao longo da faixa linear (CASSIANO *et al.*, 2009).

A exatidão pode ser calculada através do ensaio de recuperação, onde o composto de interesse é adicionado a amostra e submetido ao procedimento analítico, a resposta da amostra é comparada com resposta do padrão (RIBANI *et al.*, 2004). Os valores de recuperação aceitáveis para análise de resíduos de contaminantes em amostras ambientais são entre 70-120% (INMETRO, 2010).

A precisão é determinada pela variabilidade das respostas obtidas na análise. A precisão normalmente é calculada através do desvio padrão relativo (RSD, do inglês *Relative Standard Deviation*). Valores de precisão menores que 20% são aceitáveis para análise de resíduos de contaminantes em amostras ambientais (INMETRO, 2010).

### 3.5.1.4 Efeito matriz

O efeito matriz corresponde a interferência dos componentes da matriz no resultado analítico, seja este positivo (enriquecimento de sinal) ou negativo (supressão de sinal) (NIESSEN *et al.*, 2006).

A informação sobre o efeito matriz pode ser obtida qualitativamente através da infusão pós-coluna, e neste são observadas regiões potenciais de efeito matriz (BONFIGLIO *et al.*, 1999). E quantitativamente pela adição de padrão no extrato, onde é comparado a resposta do padrão do composto de interesse adicionado ao extrato da

amostra com solução-padrão do composto de interesse. Desta forma é possível observar a diminuição/supressão e aumento/enriquecimento de sinal do(s) composto(s) de interesse (MATUSZEWSKI, 2006).

Para que o efeito matriz fique claramente elucidado a medida quantitativa pela adição de padrão no extrato é feita pela relação entre curvas analíticas do padrão do composto de interesse no extrato e solução-padrão do composto de interesse (WANG *et al.*, 2007).

Segundo ECONOMOU *et al.*, (2009) valores de efeito matriz menores que ±20% são considerados baixos, valores entre ±20% e ±50% são considerados médios, e valores maiores que ±50% são considerados altos.

# 4 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos e Metais (LACOM) situado a Escola de Química e Alimentos (EQA), no campus Carreiros da Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

## 4.1 Escolha dos analitos

Seguindo a listagem de medicamentos presentes no RENAME – 2010, o presente estudo buscou atender fármacos amplamente consumidos (BARTHOLOW, 2013). Fármacos constantes na listagem de medicamentos oferecidos pelo Programa Farmácia Popular do Brasil (BRASIL).

Também foram consideradas as propriedades físico-químicas dos padrões de fármacos disponíveis no LACOM, como pKa e coeficiente de partição octanol-água (Log Kow). O Log Kow é importante em estudos ambientais como referência para predição do potencial destes de se aderirem a tecidos gordurosos de animais (BAIRD; CANN, 2008). Os analitos selecionados para este estudo, bem como as classes químicas e terapêuticas, pKa e Log Kow constam na Tabela 3.

Os fármacos selecionados para este estudo foram: Amitriptilina, cloridrato; Atenolol; Carbamazepina; Clorpropamida; Clortalidona; Diclofenaco; Diltiazem, cloridrato; Enalapril, maleato; Fluoxetina, cloridrato; Flurazepam, cloridrato; Furosemida; Glibenclamida; Nimesulida; Propranolol; e Salbutamol. Todos padrões analíticos utilizados foram de 99% de pureza. As características de cada fármaco são discutidas no ANEXO e foram obtidas do banco de dados (DRUGBANK).

**Tabela 3.** Analitos selecionados e respectivas classes químicas, classe terapêuticas, pKa e Log Kow.

| Analitos | Classe Química* | Classe Terapêutica* | pKa* | Log Kow* |
|---|---|---|---|---|
| Amitriptilina | Dibenzocicloepteno | Antidepressivo | 9,4 | 4,92 |
| Atenolol | Fenol éter | Anti Hipertensivo | 9,6 | 0,16 |
| Carbamazepina | Dibenzazepina | Anticonvulsivante | 15,9 | 2,45 |
| Clorpropamida | Benzenosulfonamida | Hipoglicêmico | 5,1 | 2,3 |
| Clortalidona | Isoindolona | Diurético | 8,6 | 0,8 |
| Diclofenaco | Ácido fenilacético | AINE** | 4.2 | 4,5 |
| Diltiazem | Benzotiazepina | Anti-hipertensivo | 12,8 | 2,8 |
| Enalapril | Peptideo | Anti Hipertensivo | 3,7 | 0,1 |
| Fluoxetina | Fenilpropilaminas | Antidepressivo | 9,8 | 4,0 |
| Flurazepam | Benzodiazepina | Ansiolítico | 8,7 | 3,8 |
| Furosemida | Aminobenzenosulfonamida | Diurético | 4,2 | 2,0 |
| Glibenclamida | Benzenosulfonamidas | Hipoglicêmico | 4,3 | 4,7 |
| Nimesulida | Diarileter | AINE** | 6,7 | 2,6 |
| Propranolol | Naftaleno | Anti Hipertensivo | 9,4 | 3,5 |
| Salbutamol | Derivado fenólico | Tratamento da Asma | 10,3 | 1,4 |

* Fonte: DRUGBANK.
** Antiinflamatório Não-Esteroidal

## 4.2 Instrumentação

- ◊ Bloco digestor Gerhardt modelo Kjeldatherm (Alemanha);
- ◊ Exaustor Gerhardt modelo Turrbosog (Alemanha);
- ◊ Destilador de Nitrogênio Tecnal modelo TE-036/1 (Brasil);
- ◊ Bateria de Sebelin Quimis modelo Q308-26B (Brasil);
- ◊ Balança Analítica Bioprecisa modelo FA 2104N (Brasil);
- ◊ Centrífuga de tubos microprocessada modelo Quimis® Q222T (Brasil);
- ◊ Cromatógrafo a líquido Alliance Separations modelo 2695 Waters (EUA) equipado com amostrador automático, bomba quaternária, sistema de desgaseificação, Detector MS, Micromass® Quatro Micro™ API Waters, com fonte API, utilizando o modo de ionização por Electrospray, sistema de

aquisição de dados através do software Masslynx 4.0 Waters e coluna analítica Kinetex C18 (2,6 µm x 50 × 3 mm d.i.) (EUA);

- ◊ Espectrofotômetro Shimadzu modelo IR PRESTIGE-21;
- ◊ Microscópio Eletrônico de Varredura modelo SM 6610 LV Scanning Electron Microscope;
- ◊ Sistema de Purificação de água modelo Milli-Q Direct-Q UV3® Millipore (EUA);
- ◊ Vórtex modelo Certomat® MV-B. Braun. (Brasil).

## 4.3 Material

- ◊ Dispenser 10 - 50 mL Boeco (Alemanha);
- ◊ Extrator Soxhlet J45/50 Satelit modelo HS384MCO (Brasil);
- ◊ Frascos de vidro *(vial)* com capacidade para 2 mL;
- ◊ Frascos de vidro âmbar com capacidade para 10 e 50 mL;
- ◊ Graal e pistilo de porcelana Chiarott e Unilab (Brasil);
- ◊ Kit filtração Milipore (Alemanha).
- ◊ Tubo de vidro de borossilicato Amitel (Brasil);
- ◊ Tubos de polipropileno (50 e 15 mL de capacidade) – Sarstedt (Alemanha);
- ◊ Vidraria comum de rotina (balões volumétricos, pipetas volumétricas calibradas, béquer, etc.);

## 4.4 Solventes e reagentes

- ◊ Ácido bórico 99,5% Synth (Brasil);
- ◊ Ácido sulfúrico e ácido clorídrico P.A. Synth (Brasil);
- ◊ Água ultrapura, purificada em Milli-Q Direct-Q UV3® Millipore;
- ◊ C18 – cartuchos de SPE Strata C18-E (500mg/3mL) Phenomenex (EUA);
- ◊ Concha de mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei*) (obtido no Instituto de Oceanografia e modificada no LACOM da Escola de Química e Alimentos da FURG);
- ◊ Detergente neutro Extran® Merck (Brasil).
- ◊ Éter de petróleo P.A. Vetec (Brasil);
- ◊ Florisil J.T. Baker (EUA);

- ◊ Gás argônio analítico 5.0 usado como gás de colisão no sistema LC-MS/MS White Martins (Brasil);
- ◊ Gás Nitrogênio 99,99% de pureza White Martins (Brasil);
- ◊ Hidróxido de sódio P.A. Alphatec (Brasil);
- ◊ Metanol e acetonitrila grau HPLC J.T Baker (EUA);
- ◊ Padrões analíticos de pureza 99%: amitriptilina, cloridrato (United States Pharmacopoeia, USP); atenolol (USP); carbamazepina (Farmacopeia Brasileira, FB); clorpropamida (FB); clortalidona (FB); diclofenaco (USP); diltiazem, cloridrato (FB); enalapril, maleato (USP); fluoxetina, cloridrato (USP); flurazepam, cloridrato (FB); furosemida (USP); glibenclamida (FB); nimesulida (FB); propranolol (FB); salbutamol (FB);
- ◊ Peróxido de hidrogênio P.A. Êxodo Científica (Brasil);
- ◊ Quitina (obtida e caracterizada no Laboratório de Operações Unitárias da Escola de Química e Alimentos da FURG, a partir de resíduos de camarão rosa, (*Farfantepenaeus brasiliensis*) com 72 µm de tamanho de partícula e 3.6 $m^2 g^{-1}$ área superficial;
- ◊ Quitosana de média massa molecular Sigma-Aldrich (Brasil);
- ◊ Sulfato de magnésio anidro J.T. Baker (EUA);
- ◊ Sulfato de sódio anidro Synth (Brasil);
- ◊ Terra diatomácea (Celite 545) 99% pureza, diâmetro de partícula 62-76 µm, ProQuimios (Brasil);

## 4.5 Preparo das soluções analíticas

Partindo dos padrões analíticos sólidos, em balão volumétrico calibrado, foram preparadas para cada analito, as soluções estoque a 1000 mg $L^{-1}$ em MeOH grau HPLC e acondicionados em frasco âmbar tampados com batoques de Politetrafluoretileno, tais frascos foram armazenados em freezer a -18 ºC.

As soluções trabalho com a mistura dos fármacos foram na concentração de 10 mg $L^{-1}$ foram feitas a partir da solução estoque. Para o uso diário no laboratório foi utilizada diluição desta mistura para otimização da MSPD. As soluções trabalho da mistura dos fármacos em questão foram utilizadas por um período máximo de quatro meses, sendo também armazenadas em freezer a -18 ºC.

## 4.6 Material

### 4.6.1 Espécies de interesse e Amostras

As espécies foram selecionadas após a análise do ciclo de vida, bem como do comportamento alimentar destas. Foram escolhidos peixes que apresentam comportamento alimentar detritívoro, ou seja, que se alimenta de material em suspensão, de material sedimentar e outras espécies aquáticas inferiores, tanto vegetais, quanto animais (FISCHER *et al.*, 2011).

Em relação ao ciclo de vida, as espécies escolhidas habitam regiões estuarinas e tem parte do seu ciclo de vida em água salgada ou água doce, dependendo da espécie (FISCHER *et al.*, 2011). Sendo assim, os peixes escolhidos tendem a estar mais expostos a fármacos contaminantes, não só devido a exposição por fármacos dissolvidos, bem como fármacos sedimentados ou suspensos na material orgânica e fármacos bioacumulados em espécies inferiores.

Todas as espécies de interesse deste estudo são consumidas pelos humanos e têm relevância na região de Rio Grande/RS.

Amostras de *Mugil liza* - Mugilidae obtidas em mercados da região foram utilizadas para otimização e validação do método. E amostras de *Micropogonias furnieri*, *Loricaria anus*, *Pimelodus pintado* e *Genidens genidens* também foram utilizadas neste estudo, para demonstração da exatidão, precisão e aplicabilidade do método proposto.

Todas espécies em estudo foram submetidas ao procedimento a seguir. Peixes eviscerados, inteiros e congelados foram adquiridos no mercado de pescadores da região, e mantidos assim durante o transporte e armazenamento da amostra. Ao chegaram no laboratório foram removidas as cabeças e caldas para facilitar a remoção das escamas e após a remoção das escamas foram realizadas a filetagem dos peixes e estes foram processados em processador de alimentos para melhor homogeneização.

#### 4.6.1.1 Caracterização das amostras

Para todas as espécies de peixes empregadas neste estudo foi realizada a determinação de teor de proteínas e teor de lipídios, considerando que estas informações podem ser relevantes nas interferências analíticas para determinação de compostos e

também podem estar relacionadas a contaminação de peixes por fármacos (RAMIREZ *et al.*, 2009).

O método de Kjedhal foi aplicado as amostras para determinar o teor de proteínas baseado na avaliação de nitrogênio total (AOAC, 2000). Para determinação do teor de lipídios foi realizada a extração por soxhlet (AOAC, 2000). Os resultados expressos foram em base seca.

### 4.6.2 Caracterização do suporte sólido

Neste estudo foi utilizado como suporte sólido, conchas de mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei*). O material foi macerado em graal e pistilo e peneirado, sendo utilizada a porção com diâmetro de partícula inferior a 0,5 µm (peneira mesh 32). Este foi limpo com água ultrapura por duas vezes e seco em estufa a 110 ºC. A caraterização físico-química deste material foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de energia dispersiva (EDS, do inglês, *Energy Dispersive Spectrocopy*), espectroscopia de infravermelho e análise de BET (*Brunauer, Emmett, Teller*).

As análises de MEV e EDS foram realizadas em um Microscópio Eletrônico de Varredura modelo SM 6610 LV Scanning Electron Microscope localizado no Centro de Microscopia Eletrônica (CEME) da FURG. As análises de Infravermelho foram realizadas em Espectrofotômetro Shimadzu modelo IR PRESTIGE-21 localizado no Laboratório da Catálise e Sintese Inorgânica (LCSI) da FURG. As análises de BET foram realizadas no Laboratório de Química de Estado Sólido e Superfícies (LSS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

## 4.7 Otimização das condições cromatográficas e espectrométricas

As condições cromatográficas iniciais foram baseadas no método descrito por CALDAS *et al.*, (2013a) onde foi utilizado $H_2O$ ultrapura com 0,1% de ácido acético (A) e MeOH (B), sendo o tempo de análise de 30 min com eluição por gradiente dos quais partiu de 20% de B com aumento linear até 90% em 20 min, mantendo esta condição até 23 min e retornando a condição inicial em 0,5 min e mantendo esta por 6,5 min.

Todos os solventes utilizados foram filtrados com membrana 0,45 µm em sistema de filtração a vácuo Millipore e sonicados por 40 min para remoção de bolhas.

### 4.7.1 Otimização dos solvente de eluição

Para obter uma melhor separação e resolução cromatográfica foram testados quatro diferentes combinações de fase móvel. MeOH e $H_2O$ com 0,1% de ácido acético; ACN com 0,1% de ácido fórmico e $H_2O$ com 0,1% de ácido fórmico; MeOH e $H_2O$ com 0,1% de ácido fórmico; e ACN:MeOH (50:50 v/v). O gradiente foi mantido o mesmo descrito no subitem anterior para todos testes.

### 4.7.2 Otimização do gradiente de eluição

Após a escolha da fase móvel, foi definido o gradiente de eluição onde se obteve a melhor separação e resolução cromatográfica com menor tempo de eluição. Os gradientes testados constam na Tabela 4.

### 4.7.3 Condições espectrométricas

A temperatura da fonte, modo de ionização por Eletrospray, íon molecular de cada composto, dois fragmentos característicos de cada composto, onde o fragmento mais intenso foi utilizado para quantificação e o segundo fragmento mais intenso foi utilizado para confirmação do composto foram otimizados. A voltagem do cone e energia de colisão foram otimizados para cada composto. A análise espectrométrica se deu no modo de monitoramento de reações múltiplas.

**Tabela 4.** Condições testadas como gradiente de eluição para separação cromatográfica.

| Tempo (min) | Solvente A (%) | Solvente B (%) | Tempo (min) | Solvente A (%) | Solvente B (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| **1º teste** | | | **2º teste** | | |
| 0 | 80 | 20 | 0 | 90 | 10 |
| 20 | 10 | 90 | 15 | 20 | 80 |
| 23 | 10 | 90 | 18 | 20 | 80 |
| 23,5 | 80 | 20 | 18,5 | 90 | 10 |
| 30 | 80 | 20 | 24 | 90 | 10 |
| **3º teste** | | | **4º teste** | | |
| 0 | 80 | 20 | 0 | 80 | 20 |
| 12 | 20 | 80 | 10 | 20 | 80 |
| 12,5 | 80 | 20 | 10,5 | 80 | 20 |
| 18 | 80 | 20 | 16 | 80 | 20 |

A = ACN com 0,1% em ácido fórmico; B = $H_2O$ com 0,1% em ácido fórmico

## 4.8 Otimização da técnica MSPD para extração de fármacos da amostra

Para otimização da técnica MSPD assistido por vórtex foram avaliados o suporte sólido, o sal, o solvente para extração dos analitos, e a influência quantitativa de cada fator nas condições otimizadas através de planejamento fatorial.

As condições de extração iniciais fixadas para otimização da técnica MSPD assistido por vórtex foram segundo o método otimizado e validado por CALDAS *et al.*, (2013b), o qual consistiu da maceração por 5 min de 0,5 g de amostra, 1 g de C18 como suporte sólido e 1 g de sulfato de sódio ($Na_2SO_4$), seguido da extração com 10 mL de ACN em tubo de fundo cônico por vórtex durante 1 min e centrifugação por 10 min a 10179 G, deste extrato foi recolhido 1 ml para análise cromatográfica por LC-MS/MS.

### 4.8.1 Avaliação do suporte sólido para extração

Foram testados seis suportes sólidos C18, Terra diatomácea, Florisil, Quitina, Quitosana, Concha de Mexilhão. Abrangendo materiais de fonte comercial e não renovável, e materiais sintetizados e/ou comerciais de fontes renováveis.

### 4.8.2 Efeito da adição de sal

Nesta etapa foram testados três abordagens de sal ($Na_2SO_4$, sulfato de magnésio ($MgSO_4$) e sem uso de sal). Desta forma pode-se avaliar o efeito de dois cátions com diferentes capacidades de *salting out*, conforme a série liotrópica (HASHEMI; CHASTEEN, 2011), sabendo ainda que o ânion $SO_4^{2-}$ é o ânion com maior capacidade *salting out* (WANG *et al.*, 2009).

### 4.8.3 Avaliação do solvente para extração

Os solventes foram testados isoladamente, como também misturas, totalizando cinco abordagens; ACN, MeOH, MeOH:$H_2O$ (50:50, V/V), MeOH com 0,1% ácido acético, e MeOH com 0,1% ácido acético:$H_2O$ com 0,1% ácido acético (50:50, V/V).

### 4.8.4 Avaliação das principais variáveis na extração pela MSPD

Para observar o efeito quantitativo de quatro variáveis selecionadas e o efeito qualitativo de uma variável, foi realizado um planejamento fatorial fracionado $2^{5-1}$, envolvendo os fatores descritos pela Tabela 5.

As variáveis foram avaliadas em dois níveis, sendo massa de amostra (0,5 g -1,5 g), massa de suporte sólido (0,5 g – 1,5 g), massa de sal (0,5 g – 1,5 g) e volume de solvente (5 mL -15 mL) e ainda, a adição de etapa de limpeza baseada na Extração em Fase Sólida Dispersiva (D-SPE, do inglês, Dispersive Solid-Phase Extraction) usando C18 (50 mg). Nesta etapa a área dos picos foi usada como resposta para análises estatísticas.

### 4.8.5 Avaliação do volume de solvente

Avaliados os efeitos obtidos sem a necessidade de realizar a confirmação dos níveis ótimos, focando ainda na diminuição do consumo de solventes. Foi realizado um teste com as melhores condições testadas, justificados pelo menor consumo de reagentes, variando somente volume do solvente, nos seguintes volumes testados: 5 mL, 7,5 mL e 10 mL.

**Tabela 5.** Matriz do planejamento fatorial fracionado $2^{5-1}$.

| Tratamento | A (g) | B (g) | C (g) | D (mL) | E (0/50) |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | -1 (0,5) | -1 (0,5) | -1 (0,5) | -1 (5) | -1 (0) |
| 2 | 1 (1,5) | -1 (0,5) | -1 (0,5) | -1 (5) | 1 (50) |
| 3 | -1 (0,5) | 1 (1,5) | -1 (0,5) | -1 (5) | 1 (50) |
| 4 | 1 (1,5) | 1 (1,5) | -1 (0,5) | -1 (5) | -1 (0) |
| 5 | -1 (0,5) | -1 (0,5) | 1 (1,5) | -1 (5) | 1 (50) |
| 6 | 1 (1,5) | -1 (0,5) | 1 (1,5) | -1 (5) | -1 (0) |
| 7 | -1 (0,5) | 1 (1,5) | 1 (1,5) | -1 (5) | -1 (0) |
| 8 | 1 (1,5) | 1 (1,5) | 1 (1,5) | -1 (5) | 1 (50) |
| 9 | -1 (0,5) | -1 (0,5) | -1 (0,5) | 1 (15) | -1 (0) |
| 10 | 1 (1,5) | -1 (0,5) | -1 (0,5) | 1 (15) | 1 (50) |
| 11 | -1 (0,5) | 1 (1,5) | -1 (0,5) | 1 (15) | 1 (50) |
| 12 | 1 (1,5) | 1 (1,5) | -1 (0,5) | 1 (15) | -1 (0) |
| 13 | -1 (0,5) | -1 (0,5) | 1 (1,5) | 1 (15) | 1 (50) |
| 14 | 1 (1,5) | -1 (0,5) | 1 (1,5) | 1 (15) | -1 (0) |
| 15 | -1 (0,5) | 1 (1,5) | 1 (1,5) | 1 (15) | -1 (0) |
| 16 | 1 (1,5) | 1 (1,5) | 1 (1,5) | 1 (15) | 1 (50) |
| 17 | 0 (1,0) | 0 (1,0) | 0 (1,0) | 0 (10) | 0 (0) |
| 18 | 0 (1,0) | 0 (1,0) | 0 (1,0) | 0 (10) | 0 (0) |
| 19 | 0 (1,0) | 0 (1,0) | 0 (1,0) | 0 (10) | 0 (0) |
| 20 | 0 (1,0) | 0 (1,0) | 0 (1,0) | 0 (10) | 0 (50) |
| 21 | 0 (1,0) | 0 (1,0) | 0 (1,0) | 0 (10) | 0 (50) |
| 22 | 0 (1,0) | 0 (1,0) | 0 (1,0) | 0 (10) | 0 (50) |

A = massa de amostra; B = massa de terra diatomácea; C = massa de $Na_2SO_4$; D = volume de MeOH; E = limpeza com 50mg de C18.

## 4.9 Validação

A técnica otimizada foi validada seguindo parâmetros preconizados pelos guias da INMETRO, (2010) e SANCO, (Document nº SANCO/12571, 2013). Também segundo parâmetros recomendados pela ANVISA, (2003) e FDA, (2013), estes os quais são ligados a regulamentação de fármacos. Os parâmetros avaliados neste estudo foram: LOD; LOQ; curva analítica; linearidade; exatidão (através de ensaio de recuperação) e precisão (repetitividade e precisão intermediária). Também foi avaliada a influência do efeito matriz na exatidão do método, comparando as inclinações das curvas analíticas no solvente com as curvas analíticas na matriz em estudo.

### 4.9.1 Curva analítica e Linearidade

A fim de avaliar a linearidade das respostas instrumentais para os compostos em estudo, foi construída curva analítica contendo as concentrações 0,0001, 0,0005, 0,001, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 0,75 e 1,0 mg $L^{-1}$, todas as quais foram preparadas em MeOH.

A partir dos valores lineares para cada composto foi construída curva analítica por superposição na matriz da MSPD, resultando em onze diferentes concentrações. Cada nível de concentração estudado foi injetado em triplicata no LC-MS/MS, e com o auxílio do “software“ Masslynx V4.1 do equipamento foram obtidos a linearidade do instrumento e do método observando os dados de regressão linear e coeficiente de correlação linear (r).

### 4.9.2 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O LOD foi obtido considerando a concentração na qual o sinal observado do analito foi três vezes maior que o valor observado pelo ruído, instrumental para o caso de LOD do instrumento, e valor observado pelo ruído do método para o caso de LOD do método.

A relação sinal/ruído também foi utilizada para se obter o valor de LOQ, entretanto a relação considerada para o LOQ foi de dez vezes o sinal/ruído.

### 4.9.3 Exatidão e Precisão

Neste estudo, a exatidão foi observada pelo ensaio de recuperação (equação 5) (INMETRO, 2010) abrangendo as concentrações de 1x LOQ, 5x LOQ e 20x LOQ. Os valores selecionados correspondem a faixa linear de estudo.

$$R\ (\%) = \frac{C1-C2}{C3}\ x\ 100 \quad (5)$$

Onde:

C1 = concentração do analito na amostra fortificada;

C2 = concentração do analito na amostra não fortificada;

C3 = concentração do analito adicionada à amostra fortificada.

A precisão foi avaliada como repetitividade e precisão intermediária. A repetitividade foi avaliada por medições no mesmo dia e pelo mesmo observador. A precisão intermediaria foi avaliada por medições em dias diferentes pelo mesmo observador. Os resultado foram expressos em RSD conforme equação 6.

$$RSD\ (\%) = \frac{s}{Xm}\ x\ 100 \quad (6)$$

Onde:

s = estimativa do desvio padrão absoluto;

Xm = média de uma série de medições.

### 4.9.4 Efeito Matriz

Considerando que a análise de resíduos em matrizes complexas, como o caso dos peixes, gera considerável efeito matriz em análises cromatográficas e espectrométricas, faz-se necessário a utilização da calibração por superposição na matriz para compensação do efeito matriz. Onde os valores de inclinação da curva analítica da mistura dos analitos em solvente foi comparado com os valores de inclinação da curva analítica no extrato da matriz, este obtido através da adição de padrão em extrato da MSPD de amostra não fortificada. O cálculo do efeito matriz foi baseado na equação 7 (ECONOMOU *et al.*, 2009).

$$EM\ (\%) = 100\ x\ \left(\frac{Sm}{Ss} - 1\right) \quad (7)$$

Onde:

Sm = coeficiente angular da curva obtida pela superposição na matriz;

Ss = coeficiente angular da curva obtida pela injeção da solução analitica dos analitos preparados em solvente (MeOH)

### 4.9.5 Eficiência da MSPD assistida por vórtex e Aplicabilidade

Amostras de *Micropogonias furnieri*, *Loricaria anus*, *Pimelodus pintado* e *Genidens genidens* foram adquiridas do mercado local de pescadores, segundo sua disponibilidade, para demonstrar a exatidão e precisão do método proposto frente a diferentes espécies de peixe. Para tal, ensaios de recuperação com fortificação em três níveis (1x LOQ, 5x LOQ e 20x LOQ) foram realizados em triplicata.

Para demonstrar a aplicabilidade do método, foram quantificados os 15 fármacos extraídos em triplicata segundo a técnica otimizada e quantificação por LC-MS/MS em três amostras das cinco espécies estudadas, inteiras e íntegras.

## 4.10 Análise estatística

Todos os dados obtidos durante este estudo foram tabelados e analisados estatisticamente com o uso do software Statistica 5.0 U.S. Headquarters: StatSoft, Inc., Tulsa, USA (1995) e para escolha qualitativas das variáveis foram seguidos de análise de distribuição normal e análise de variância (ANOVA) - teste de Tukey (TSD, do inglês, *Tukey Significant* Difference) considerando como significância $p < 0,05$.

Para análise estatística do Planejamento fatorial, foi realizada ANOVA com teste F e considerando como fonte de erro MS Residual ($p < 0,05$).

# 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 5.1 Condição cromatográfica otimizada

Foram testadas diferentes condições cromatográficas variando tanto solventes e gradientes de eluição a fim de se obter a melhor separação cromatográfica. Neste estudo foi selecionado como condição cromatográfica de análise o uso de ACN com 0,1% de ácido fórmico e $H_2O$ com 0,1% de ácido fórmico, visto que a condição selecionada apresentou melhor separação dos compostos bem como melhor resolução dos picos cromatográficos.

O gradiente de eluição está descrito na Tabela 6, onde 9 min foi o tempo necessário para separação dos compostos e tempo total de análise de 16 min. A Figura 7 apresenta os cromatogramas de separação para cada composto no MRM.

**Tabela 6.** Gradiente de eluição cromatográfica para separação dos compostos em estudo.

| Tempo (min) | Solvente A (%) | Solvente B (%) |
|---|---|---|
| 0 | 20 | 80 |
| 10 | 80 | 20 |
| 10,5 | 20 | 80 |
| 16 | 20 | 80 |

A = ACN com 0,1% em ácido fórmico; B = $H_2O$ com 0,1% em ácido fórmico

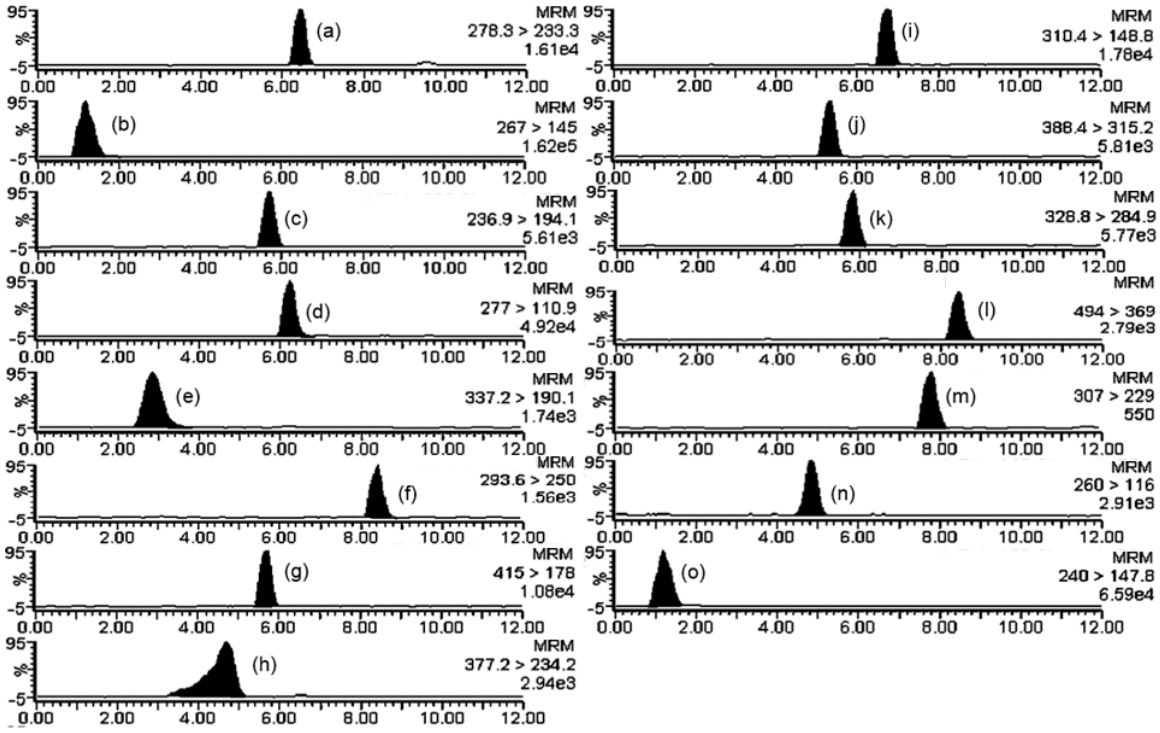



**Figura 7.** Cromatogramas total no MRM para: (a) amitriptilina; (b) atenolol; (c) carbamazepina; (d) clorpropamida; (e) clortalidona; (f) diclofenaco; (g) diltiazem;

(h) enalapril; (i) fluoxetina; (j) flurazepam; (k) furosemida; (l) glibenclamida; (m) nimesulida; (n) propranolol; (o) salbutamol.

## 5.2 Condições espectrométricas

As condições usadas para detecção foram de 100 ºC para temperatura da fonte e de 400 ºC para temperatura de dessolvatação. Os modos de ionização por eletrospray, transições *m/z* de quantificação e confirmação, voltagem do cone e energia de colisão estão descritos na Tabela 7.

**Tabela 7.** Analitos com respectivos modo de ionização no ESI, duas transições *m/z*, voltagem do cone e energia de colisão.

| Analitos | Modo ESI | Transição *m/z* para quantificação | Transição *m/z* para confirmação | Voltagem do cone (V) | Energia de colisão (eV) |
|---|---|---|---|---|---|
| Amitriptilina | ESI + | 278,3 > 233,3 | 278.3 > 116,9 | 35/35 | 15/15 |
| Atenolol | ESI + | 267 > 145 | 267 > 190,2 | 25/25 | 25/25 |
| Carbamazepina | ESI + | 236,9 > 194,1 | 237,4 > 167,4 | 26/35 | 12/40 |
| Clorpropamida | ESI + | 277 > 175 | 277 > 110,9 | 27/27 | 22/29 |
| Clortalidona | ESI - | 33,.2 > 190,1 | 337,2 > 319 | 40/40 | 17/15 |
| Diclofenaco | ESI - | 293,6 > 250 | 294 > 214 | 20/20 | 10/15 |
| Diltiazem | ESI + | 415 > 178 | 415 > 310 | 35/35 | 20/20 |
| Enalapril | ESI + | 377,2 > 117,1 | 337,2 > 234,2 | 45/45 | 58/27 |
| Fluoxetina | ESI + | 310,2 > 43,4 | 310,4 > 148,8 | 30/25 | 10/9 |
| Flurazepam | ESI + | 388,4 > 315,2 | 388,4 > 288,2 | 30/30 | 25/25 |
| Furosemida | ESI - | 328,8 > 205 | 328,8 > 284,9 | 30/30 | 10/15 |
| Glibenclamida | ESI + | 494 > 169 | 494 > 369 | 30/30 | 38/18 |
| Nimesulida | ESI - | 307 > 229 | 307,2 > 198,1 | 33/30 | 20/25 |
| Propranolol | ESI + | 260 > 116 | 260 > 183 | 30/30 | 18/20 |
| Salbutamol | ESI + | 240 > 147,8 | 240 > 165,9 | 24/24 | 18/14 |

## 5.3 Caracterização das amostras

Os resultados obtidos para determinação de lipídios e de proteínas constam na Tabela 8. O teor de proteína e lipídio variam de acordo com a espécie e idade, fato

considerado importante para se discutir a eficiência da extração, devido a interferência destas macromoléculas na análise de fármacos.

**Tabela 8.** Teor de proteínas e teor de lipídios observados para as espécies utilizadas neste estudo (n=2).

| Espécie | Teor de proteínas (%) | Teor de lipídios (%) |
|---|---|---|
| *Mugil liza* | 88,0 | 8,2 |
| *Micropogonias furnieri* | 91,6 | 4,8 |
| *Loricaria anus* | 93,8 | 2,6 |
| *Pimelodus pintado* | 87,2 | 7,2 |
| *Genidens genidens* | 70,9 | 16,4 |

## 5.4 Caracterização da concha de mexilhão dourado

A Figura 8 mostra as imagens obtidas pela MEV, observando uma partícula entre 200 µm e 300 µm onde se observa a face externa da concha e a face interna local da quebra da concha pela maceração. Devido a este material ter sido macerado em graal e pistilo, o tamanho da partícula é maior que comparado com C18 (~50 µm), terra diatomácea (62 – 76 µm) (Figura 9), quitina (72 µm). O C18 e a terra diatomácea são processados industrialmente, a quitina utilizada foi processada em laboratório para apresentar baixa granulometria.

Na análise de EDS verifica-se, através da Figura 10, a presença de carbono, oxigênio (ambos de carbonatos, confirmados por infravermelho), sódio, alumínio, silício e cálcio. Cabe salientar que o pico de carbono foi mais intenso devido ao uso de carbono para recobrimento da amostra na realização do MEV.

Pelo espectro de infravermelho da concha de mexilhão dourado (Figura 11), observa-se uma banda de distorção a 1483,26 $cm^{-1}$, esta banda possivelmente está associada ligação C-O de grupos carbonatos. Carbonatos de cálcio podem se apresentar em três formas; calcita, vaterita e aragonita, sendo que a última se refere a apresentação de carbonatos de cálcio em espécies semelhantes (ISLAM *et al.*, 2011)

Através da análise de BET foi possível verificar que a concha de mexilhão dourado apresenta área superficial maior que a terra diatomácea (TSAI *et al.*, 2006), quatro vezes maior que areia (CARMODY *et al.*, 2007), e apresenta uma diferença de aproximadamente 25 vezes em relação ao C18 (GRITTI; GUIOCHON, 2006). A Tabela 9 apresenta as características dos materiais utilizados neste estudo.

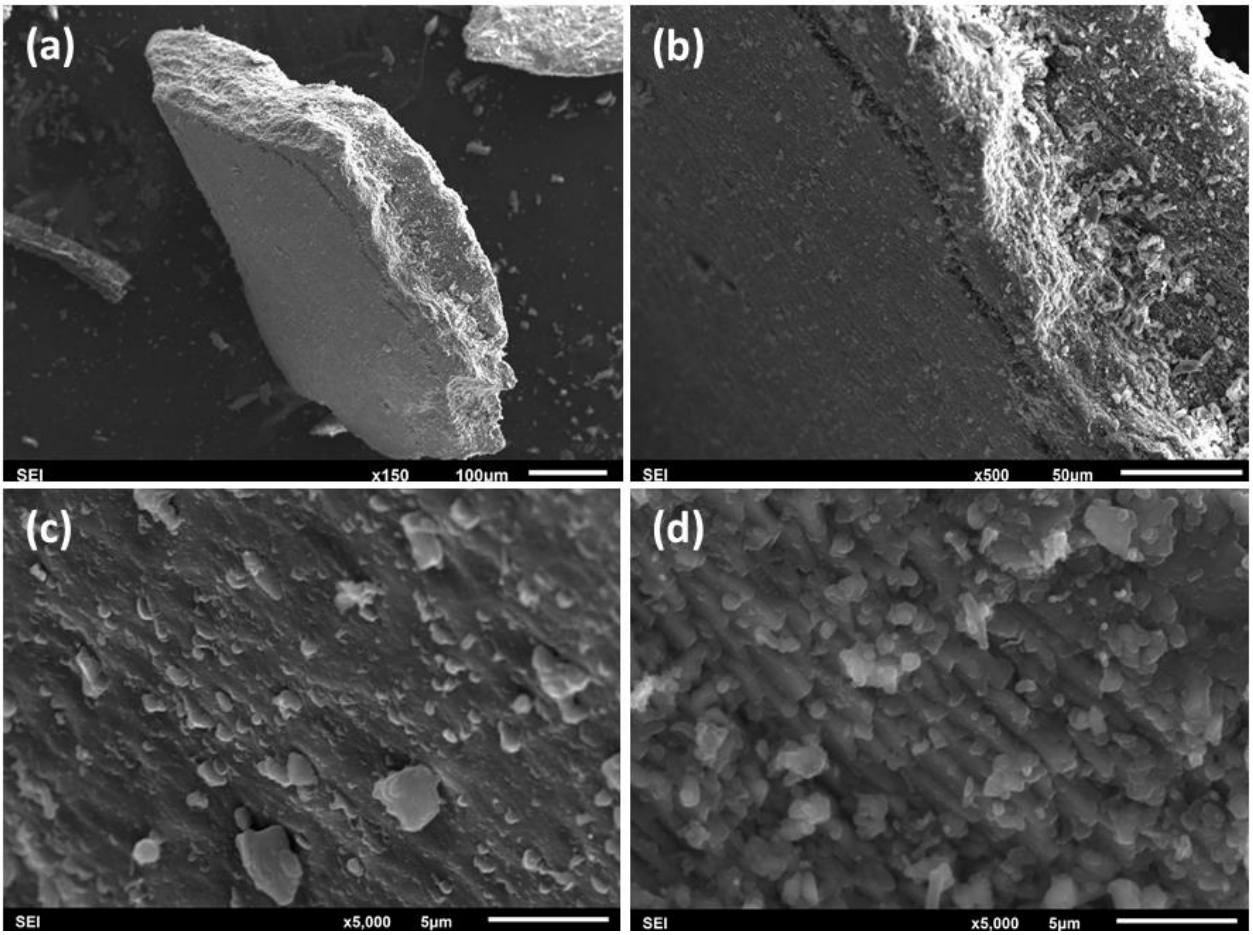



**Figura 8.** Imagens da MEV da concha de mexilhão dourado obtidas em (a) 150x, (b) 500x, (c) 5000x na face externa da partícula e (d) 5000x na face interna da partícula.

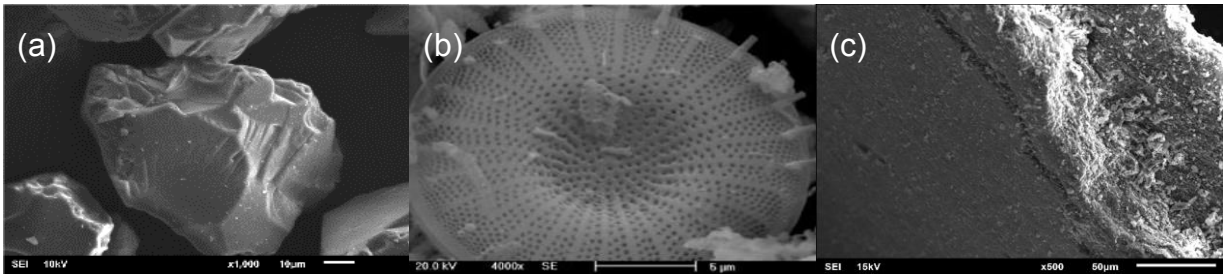



**Figura 9.** Microscopia eletrônica de varredura para: (a) C18 amplitude de 1000x; (b) Terra diatomácea amplitude de 4000x (adaptado de GOULART *et al.*, (2011)); (c) Concha de mexilhão dourado amplitude 500x.

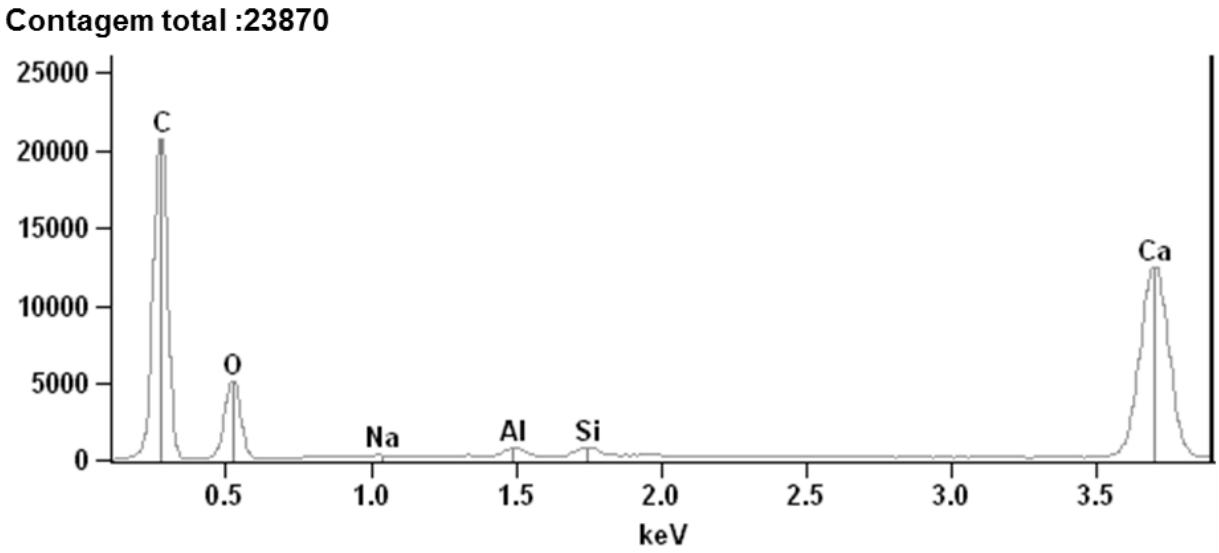



**Figura 10.** Espectro de energia dispersiva da concha de mexilhão utilizando como base a imagem (b) da Figura 7.

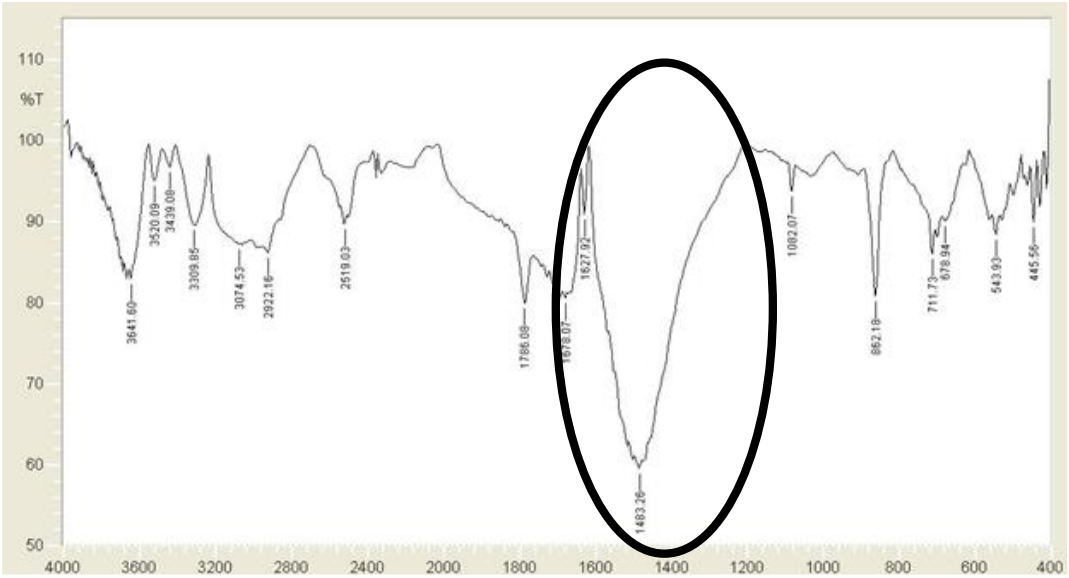



**Figura 11.** Espectro de infravermelho da concha de mexilhão dourado.

**Tabela 9.** Comparação entre características dos materiais testados na MSPD.

| Parâmetro | Área superficial ($m^2\ g^{-1}$) | Volume de poro ($cm^3\ g^{-1}$) | Componente majoritário | Referência |
|---|---|---|---|---|
| C18 | 132 | 0,350 | $SiO_2$ | GRITTI; GUIOCHON, (2006) |
| Terra diatomácea | 3.8 | 0.015 | $SiO_2$ | TSAI *et al.*, (2006) |
| Concha | 5,0 | 0,006 | $CaCO_3$ | - |
| Quitina | 3,6 | 0,005 | - | DOTTO *et al.*, (2012) |
| Quitosana | 4,6 | 0,009 | - | |

## 5.5 Otimização da extração pela MSPD

A otimização da extração foi realizada sequencialmente, onde a melhor condição foi fixada para a etapa seguinte, tomando como resposta os valores de recuperação.

Em contrapartida, o parâmetro de área de pico obtido para cada composto determinada pelo LC-MS/MS foi utilizado como resposta para os experimentos do planejamento experimental

### 5.5.1 Avaliação do suporte sólido

A escolha dos suportes sólidos avaliados foram baseadas nos materiais comumente usados na extração de fármacos por MSPD (CAPRIOTTI *et al.*, 2013; PAVLOVIC *et al.*, 2012) e materiais alternativos utilizados em técnicas de extração (ARIAS *et al.*, 2014; CERQUEIRA *et al.*, 2014) ou com possível aplicação (RAVI KUMAR, 2000). Logo, 1 g de C18, terra diatomácea, florisil, quitina, quitosana e concha de mexilhão foram avaliados.

As recuperações são apresentes na Tabela 10. A comparação entre C18, terra diatomácea e concha de mexilhão não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$). No entanto, os três materiais revelaram-se bons suportes sólidos na etapa de dispersão para extração de fármacos de peixe. Isto pode ser explicado dada a possibilidade destes materiais interagirem seletivamente com interferentes analíticos devido aos tamanhos de partículas, grande área superficial e estrutura porosa conforme relatado por KRISTENSON *et al.*, (2006) para C18, por AL-DEGS *et al.*, (2001) e TSAI *et al.*, (2006) para terra diatomácea e pelos resultados apresentados no subitem 5.5 para concha de mexilhão.

**Tabela 10.** Recuperações obtidas para diferentes suportes sólidos testados na MSPD. Condições de extração: 0,5 g de amostra fortificada a 1 μg $g^{-1}$, 1 g de suporte sólido, 1 g de $Na_2SO_4$, 10 mL ACN, vórtex 1 min e centrifugação a 10179 G por 10 min.

| Analitos | Recuperações (%) ± RSD (%) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | C18 | Terra diatomácea | Concha | Quitina | Quitosana | Florisil |
| Amitriptilina | 28±11$^{c}$ | 72±6$^{a}$ | 69±5$^{a}$ | 56±13$^{b}$ | * | * |
| Atenolol | 49±2$^{a}$ | 39±4$^{b}$ | 31±7$^{c}$ | 20±14$^{d}$ | 14±11$^{e}$ | 3±32$^{f}$ |
| Carbamazepina | 74±2$^{a}$ | 74±6$^{a}$ | 74±3$^{a}$ | 54±12$^{b}$ | 37±1$^{c}$ | 44±24$^{c,d}$ |
| Clorpropamida | 80±7$^{a}$ | 59±11$^{b}$ | 49±7$^{b}$ | 27±20$^{c}$ | 20±4$^{c}$ | 30±24$^{c}$ |
| Clortalidona | 61±19$^{a}$ | 44±16$^{b}$ | 48±10$^{b,c}$ | 30±20$^{c}$ | * | * |
| Diclofenaco | 40±14$^{a}$ | 41±17$^{a}$ | 45±13$^{a}$ | 20±31$^{b}$ | 17±1$^{b}$ | 7±9$^{c}$ |
| Diltiazem | 36±9$^{c}$ | 63±4$^{a,b}$ | 68±3$^{a}$ | 52±13$^{b}$ | 49±6$^{b,c}$ | 36±24$^{c}$ |
| Enalapril | 64±4$^{a}$ | 42±5$^{b}$ | 22±18$^{c}$ | 6±44$^{e}$ | 9±6$^{d}$ | 0$^{f}$ |
| Fluoxetina | 40±13$^{c}$ | 50±11$^{b,c}$ | 56±13$^{b}$ | 43±15$^{c}$ | 122±1$^{a}$ | 11±14$^{d}$ |
| Flurazepam | 24±12$^{d}$ | 65±6$^{a,b}$ | 70±4$^{a}$ | 49±16$^{c}$ | 53±3$^{b,c}$ | 32±19$^{d}$ |
| Furosemida | 38±17$^{a}$ | 24±23$^{c,d}$ | 26±14$^{b,c}$ | 12±34$^{d,e}$ | 4±7$^{e}$ | 31±1$^{a,b}$ |
| Glibenclamida | 57±21$^{a}$ | 70±13$^{a}$ | 53±9$^{a}$ | 21±29$^{b}$ | 22±2$^{b}$ | 20±35$^{b}$ |
| Nimesulida | 91±11$^{a}$ | 81±10$^{a,b}$ | 94±13$^{a}$ | 49±15$^{c}$ | 42±1$^{c}$ | 65±23$^{b,c}$ |
| Propranolol | 35±8$^{c}$ | 54±7$^{a,b}$ | 54±4$^{a}$ | 43±14$^{b,c}$ | 43±2$^{b,c}$ | 10±16$^{d}$ |
| Salbutamol | 33±5$^{a}$ | 29±4$^{a}$ | 22±10$^{b}$ | 12±18$^{c}$ | 7±15$^{d}$ | 2±25$^{d}$ |

Letras iguais indicam semelhança estatística.
* Não analisados nesta etapa.

As recuperações obtidas para quitina e quitosana, ressaltando que até o presente momento não foram encontrados trabalhos que utilizaram estes na MSPD (a mesma afirmativa é válida para concha de mexilhão dourado), foram estatisticamente menores para maioria dos compostos ($p < 0,05$). O motivo pelo qual as recuperações foram reduzidas pode ser devido a estes materiais apresentarem sítios de nitrogênio básico, garantindo sua capacidade de adsorção dos analitos (DOTTO *et al.*, 2012). Quando comparados entre si, a quitosana apresentou menor recuperação, que pode ser decorrente do maior número de sítios de nitrogênio básico.

O efeito matriz estimado para o C18 variou entre -53% e 29%, para terra diatomácea variou entre -43% e 85%, para florisil -28% e 25%, para quitina -37% a 150%, para quitosana -80% a 16% e para concha de mexilhão -24% a 214%. O efeito matriz estimado, considerando de maneira geral para todos analitos, para terra diatomácea e C18 foram semelhantes, a concha de mexilhão apresentou efeito matriz maior que 200% para dois analitos.

As melhores respostas em recuperação, RSD e efeito matriz estimado foram para C18 e terra diatomácea. Uma vez que este estudo tem como finalidade a utilização de materiais alternativos, mantendo a eficiência da extração e diminuindo o custo de análise. A terra diatomácea foi selecionada como suporte sólido para as próximas etapas da otimização.

A terra diatomácea é um produto obtido de diatomáceas e caracterizado por grande área superficial, estrutura altamente porosa, baixa densidade além de ser composta por dióxido de silício e alumina, garantindo a este ampla aplicabilidade na área industrial (AL-DEGS *et al.*, 2001; TSAI *et al.*, 2006).

### 5.5.2 Efeito do sal

Sais são comumente utilizados para promover a partição e o efeito *salting out*. De acordo com a série liotrópica, sais de $Na^+$ apresentam maior capacidade de *salting out* comparado com sais de $Mg^{2+}$ (HASHEMI; CHASTEEN, 2011).

As recuperações obtidas por diferentes sais na MSPD são apresentadas na Figura 12. As melhores recuperações foram obtidas quando não foi utilizado sal, exceto para clortalidona, diclofenaco e enalapril que as melhores recuperações foram obtidas com sulfato de sódio (ANOVA, $p < 0,05$). Além disso, o uso de sulfato de sódio proporcionou menores RSD (≤ 11 %) comparando com os outros dois testes, exceto para diclofenaco e furosemida. Quando foi usado sulfato de magnésio as recuperações foram as menores.

A estimativa do efeito matriz (Figura 12) também foi considerada tendo em vista que a amostra em estudo apresenta 88% de proteínas e 8% de lipídios (base seca). Elevado efeito matriz foi observado para não utilização de sal, mesmo este apresentando melhores recuperações. O efeito matriz para $MgSO_4$ e sem o uso de sal foi de supressão de sinal para todos analitos, sendo que para $Na_2SO_4$ o efeito matriz variou de -84% a 18%, para MgSO4 variou de -98% a -13% e para sem uso de sal variou de -99% a -80% (Figura 13).

Visando a preservação do sistema cromatográfico, através da diminuição de interferentes da matriz introduzidos neste, bem como manter a eficiência de extração buscando recuperações entre 70% – 120%, a utilização de sulfato de sódio apresentou recuperações entre 58% e 104%. E com o intuito de manter o baixo efeito matriz e baixo RSD, este foi selecionado como sal para as próximas etapas da otimização.

Os resultados de estimativa do efeito matriz para o sal de $Na^+$ foi menor que para o sal de $Mg^{2+}$. Este também menor quando comparado com a ausência de sal, sendo assim os resultados apresentados estão de acordo com o proposto pela série liotrópica, sabendo que a amostra apresenta 88 % de proteínas.

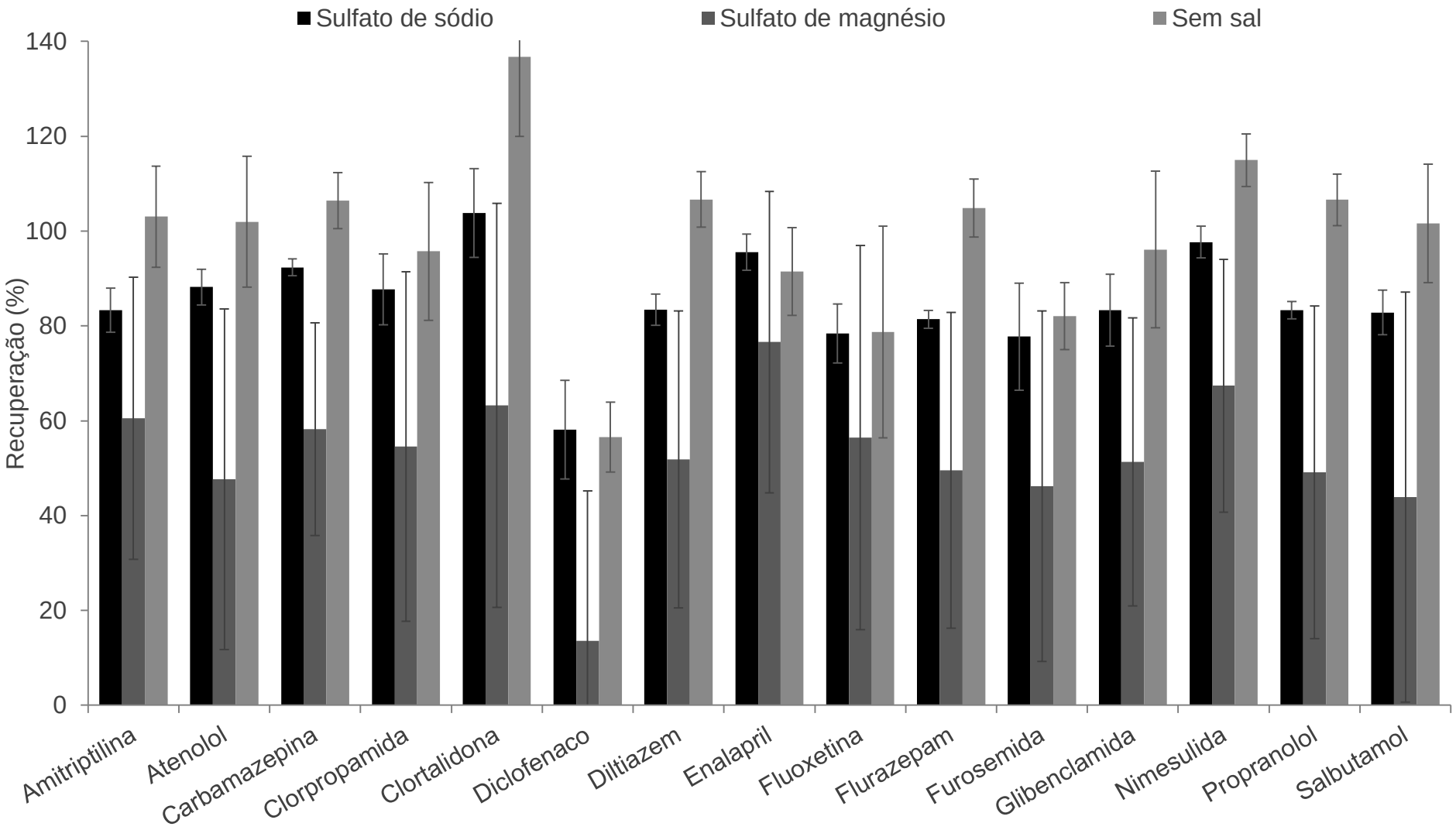



**Figura 12.** Recuperações e RSD obtidos para MSPD quando testados diferentes sais. Barra de erros significam valores de RSD (n=9). Condições de extração: 0,5 g de amostra fortificada a 1 µg $g^{-1}$, 1 g de terra diatomácea, 1 g de sal, 10 mL ACN, vórtex 1 min e centrifugação a 10179 G por 10 min.

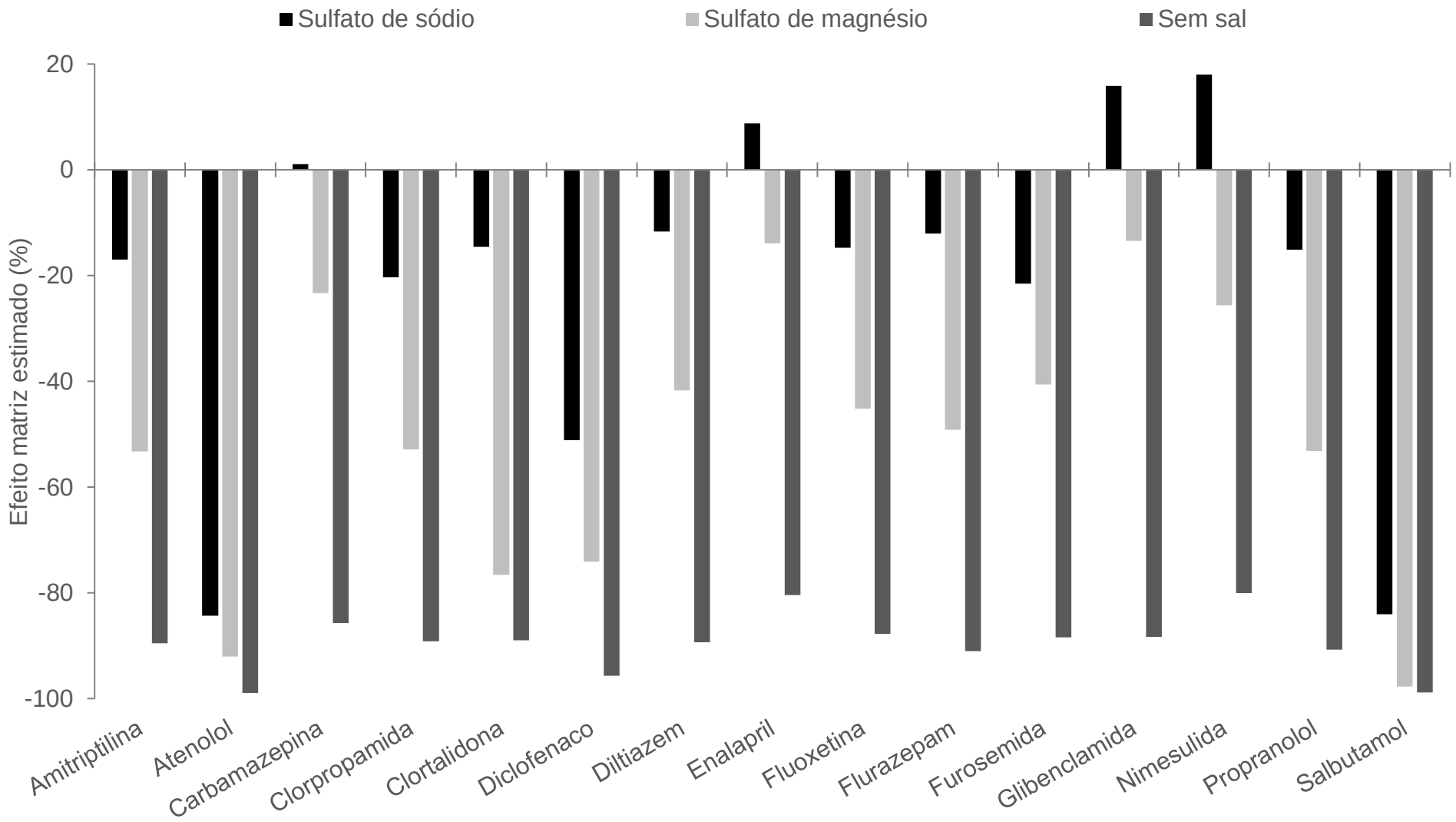



**Figura 13.** Efeito matriz estimado obtido para MSPD quando testados diferentes sais. Obtidas através da comparação da resposta do padrão no solvente e do padrão no extrato da MSPD.

### 5.5.3 Avaliação do solvente para extração

A Tabela 11 demonstra as recuperações obtidas para os cinco solventes testados na MSPD. Como pode ser observado, MeOH apresentou, para maioria dos analitos, estatisticamente melhores respostas em recuperação, quando comparado com ACN. Além disso, as recuperações obtidas para MeOH ficaram dentro da faixa de 70 - 120 % para dez dos quinze analitos estudados.

Quando testada a mistura de MeOH e $H_2O$, não foi observado melhores resultados que somente MeOH quanto as recuperações dos analitos. Este fato se deve a baixa solubilidade em água de alguns dos analitos (ver Tabela 3 – Log Kow). Também quando analisados os resultados obtidos para os solventes acidificados, não foi verificado melhoria nos resultados.

Este resultado está de acordo com os observados por outros métodos desenvolvidos para extração de fármacos de tecidos de peixes (DU *et al.*, 2012; HUERTA *et al.*, 2013; RAMIREZ *et al.*, 2007; VALDES *et al.*, 2013) e para outras matrizes (CARDOSO *et al.*, 2011; GROS *et al.*, 2012). No entanto, ACN já foi utilizada em métodos de extração de fármacos (WILLE *et al.*, 2011).

**Tabela 11.** Recuperações obtidas para diferentes solventes testados na MSPD. Condições de extração: 0,5 g de amostra fortificada a 1 µg $g^{-1}$, 1 g de terra diatomácea, 1 g de $Na_2SO_4$, 10 mL solvente, vórtex 1 min e centrifugação a 10179 G por 10 min.

| Analitos | Recuperações (%) ± RSD (%) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | MeOH | MeOH acidif. | MeOH:$H_2O$ | MeOH:$H_2O$ acidif. | ACN |
| Amitriptilina | 61±23$^{a}$ | 64±17$^{a}$ | 52±17$^{a}$ | 64±7$^{a}$ | 72±6$^{a}$ |
| Atenolol | 86±8$^{a}$ | 76±8$^{a}$ | 83±15$^{a}$ | 77±15$^{a}$ | 39±4$^{b}$ |
| Carbamazepina | 82±15$^{a,b}$ | 85±9$^{a}$ | 69±7$^{b}$ | 78±9$^{a,b}$ | 74±6$^{a,b}$ |
| Clorpropamida | 76±18$^{a}$ | 73±16$^{a,b}$ | 56±6$^{b,c}$ | 80±14$^{a}$ | 59±11$^{c}$ |
| Clortalidona | 96±18$^{a}$ | 90±9$^{b}$ | 33±28$^{b}$ | 57±24$^{b}$ | 44±16$^{b}$ |
| Diclofenaco | 53±14$^{a,b}$ | 41±15$^{b,c}$ | 63±12$^{a}$ | 38±18$^{c}$ | 41±17$^{c}$ |
| Diltiazem | 80±14$^{a}$ | 75±13$^{a}$ | 35±12$^{b}$ | 73±7$^{a}$ | 63±4$^{a}$ |
| Enalapril | 92±17$^{a}$ | 75±14$^{a}$ | 38±23$^{b}$ | 77±10$^{a}$ | 42±5$^{b}$ |
| Fluoxetina | 57±18$^{a}$ | 54±10$^{a}$ | 52±16$^{a}$ | 64±15$^{a}$ | 50±11$^{a}$ |
| Flurazepam | 71±8$^{a}$ | 75±12$^{a}$ | 39±7$^{b}$ | 74±8$^{a}$ | 65±6$^{a}$ |
| Furosemida | 51±9$^{a}$ | 54±14$^{a}$ | 53±14$^{a}$ | 55±13$^{a}$ | 24±23$^{b}$ |
| Glibenclamida | 79±6$^{a}$ | 66±15$^{b,c}$ | 67±12$^{b,c}$ | 56±13$^{c}$ | 70±13$^{a,b}$ |
| Nimesulida | 100±14$^{a}$ | 80±9$^{b}$ | 55±16$^{d}$ | 66±12$^{c}$ | 81±10$^{b}$ |
| Propranolol | 86±14$^{a}$ | 76±9$^{a,b}$ | 63±16$^{c,d}$ | 71±12$^{b,c}$ | 54±10$^{d}$ |
| Salbutamol | 68±10$^{a}$ | 62±8$^{a,b}$ | 57±8$^{c}$ | 69±8$^{a}$ | 29±7$^{c}$ |

Letras iguais indicam semelhança estatística.

### 5.5.4 Avaliação das principais variáveis na extração pela MSPD

Após a definição das condições, resultando em terra diatomácea como suporte sólido, sulfato de sódio como sal e MeOH como solvente utilizado para extração pela MSPD, a influência de outras variáveis foram avaliadas em dois níveis usando um planejamento fatorial fracionado $2^{5-1}$.

As respostas obtidas nesta etapa estão apresentadas no APÊNDICE A. A influência das variáveis foram avaliadas usando analise de efeito (95% de intervalo de confiança), de acordo com a Tabela 12. Efeito significativo positivo foi observado para volume de MeOH, exceto para carbamazepina, enalapril, fluoxetina e flurazepam, mostrando que a resposta aumenta quando foi usado o maior volume de MeOH testado (15 mL). Entretanto, efeito significativo negativo foi observado para massa de amostra para maioria dos analitos, exceto para carbamazepina, enalapril, fluoxetina, flurazepam, nimesulida e propranolol.

Não foi observado efeito significativo para as variáveis massa de sulfato de sódio, massa de terra diatomácea e adição da etapa de limpeza. A adição da etapa de limpeza baseada em D-SPE usando C18 não demonstrou efeito significativo e a fim de manter o

baixo consumo de reagentes, tempo de realização do preparo de amostra, esta etapa não foi fixada ao experimento. Desta forma, a menor massa das variáveis massa terra diatomácea e massa de sulfato de sódio foram selecionadas, visando a diminuição do consumo de reagentes bem como a minimização de resíduos gerados.

Cabe salientar que a razão de massa de amostra:massa de suporte sólido foi avaliada usando as razões 3:1, 1:1 e 1:3 (Tabela 6). De acordo com os resultados, quando aplicados a razão 1:1 com menores massas de ambos as respostas foram as melhores. Este resultado é semelhante ao encontrado por SHEN *et al.*, (2011), que verificou que a razão 1:1 foi melhor empregando MSPD para extração de OCPs de amostras de peixe e determinação por cromatografia gasosa (GC, do inglês *Gas Chromatography*) com detecção por ECD e GC-MS. As recuperações foram de 82 a 106% com RSD menores que 6%. FAN *et al.*, (2014) verificaram que a razão 1:3 apresentou os melhores resultados para extração de hormônios esteroides de alimentos de origem animal com determinação por LC-MS/MS, usando 1 g de massa de amostra e 3 g de massa de suporte sólido, as recuperações apresentadas foram de 77 a 99% com RSD menores que 10%. TAO *et al.*, (2014) avaliaram razões de 1:1 até 1:4 e verificaram que a razão 1:2 foi melhor para extração de multi-fenicóis de peixe e camarão com determinação por LC-MS/MS, as recuperações ficaram entre 84 e 99% com RSD menores que 14%.

Os resultados apresentados nestes estudos demonstram que não há razão ideal de massa de amostra:massa de suporte sólido, e de acordo com isto, a razão ideal desta é relacionada com o tipo de suporte sólido utilizado, da amostra em estudo, do solvente usado e as características dos analitos estudados. Entretanto segundo BARKER, (2007) a razão 1:4 seria a recomendada para estudos envolvendo a MSPD.

Como anteriormente discutido a adição de sais pode influenciar a eficiência de extração. A adição de sal acaba por não ser obrigatória na MSPD, mas diversos trabalhos da literatura empregam sal na MSPD. SHEN *et al.*, (2011) usaram 10 g $Na_2SO_4$ para extração de OCP como citado no parágrafo anterior. Neste sentido, LEHOTAY *et al.*, (2005) usaram 2 g de $Na_2SO_4$ para extração de agrotóxicos de matrizes alimentícias e determinação por GC-MS e LC-MS/MS, as recuperações variaram de 1 a 160% com RSD variando de 1 a 110%. TSAI *et al.*, (2014) usaram 0,5 g de $Na_2SO_4$ para extração de salicilato e benzofenona de amostras de peixe com determinação por GC-MS/MS, as recuperações neste estudo variaram de 71 a 102% e RSD foram menores que 10%. A massa de sal ideal pode variar de acordo com os analitos e o tipo de amostra estudados.

**Tabela 12.** Análise dos efeitos e valores de p obtidos no planejamento fatorial fracionado $2^{5-1}$. Efeitos expressos sob valores de área do pico.

| Analitos | Massa de amostra | | Massa de terra diatomácea | | Massa de sulfato de sódio | | Volume de MeOH | | 50 mg de C18 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Valor de p | Efeito | Valor de p | Efeito | Valor de p | Efeito | Valor de p | Efeito | Valor de p | Efeito |
| Amitriptilina | **0.0051** | -2632182 | 0.6081 | -424658 | 0.2623 | -943448 | **0.0295** | 1940943 | 0.3492 | -783041 |
| Atenolol | **0.0001** | -2006102 | 0.2294 | 212477 | 0.5845 | 94902 | **0.0001** | 2476556 | 0.6388 | -81366 |
| Carbamazepina | 0.7497 | 463416 | 0.9936 | 11705 | 0.2238 | -1806543 | 0.4000 | -1234431 | 0.4689 | -1059244 |
| Clorpropamida | **0.0001** | -1474826 | 0.9427 | 22748 | 0.9745 | -10113 | **0.0001** | 1654645 | 0.9760 | -9521 |
| Clortalidona | **0.0066** | -83120 | 0.4434 | -20964 | 0.8130 | 6414 | **0.0205** | 68556 | 0.8944 | -3598 |
| Diclofenaco | **0.0001** | -684788 | 0.4077 | -74499 | 0.9301 | 7811 | **0.0001** | 489083 | 0.4558 | 66970 |
| Diltiazem | 0.0631 | -33203289 | 0.6055 | -8761706 | 0.5085 | 11244675 | **0.0074** | 51018237 | 0.4194 | -13781060 |
| Enalapril | 0.8209 | 143147 | 0.2819 | -692855 | 0.3912 | -548319 | 0.8430 | -125272 | 0.7529 | -199234 |
| Fluoxetina | 0.0657 | -364426 | 0.9825 | 4112 | 0.6971 | 73099 | 0.0954 | 326842 | **0.0349** | 425020 |
| Flurazepam | 0.2329 | -2168896 | 0.9492 | -113176 | 0.6648 | 772206 | **0.0352** | 4024944 | 0.4370 | -1394838 |
| Furosemida | **0.0001** | -732994 | 0.2417 | -172191 | 0.8394 | -29170 | **0.0003** | 657492 | 0.7330 | 49169 |
| Glibenclamida | **0.0001** | -3749498 | 0.3654 | -620592 | 0.5245 | 433508 | **0.0001** | 3525482 | 0.7174 | -245426 |
| Nimesulida | **0.0330** | -1953228 | 0.6702 | 363128 | 0.4192 | 693955 | **0.0002** | 4076937 | 0.9246 | -80464 |
| Propranolol | **0.0404** | -3400381 | 0.9927 | -14192 | 0.6197 | 771336 | **0.0035** | 5211142 | 0.6288 | -751192 |
| Salbutamol | **0.0001** | -6196047 | 0.1655 | -726912 | 0.1641 | 729510 | **0.0001** | 7134091 | 0.3506 | -480988 |

Negrito indica $p < 0,05$

### 5.5.5 Avaliação do volume de solvente

O volume de solvente foi estudado durante a etapa anterior e os resultados indicaram um efeito positivo significativo, sendo que as respostas aumentaram quando utilizado volumes maiores de MeOH (15 mL). O efeito do volume de solvente não foi significativo para quatro analitos, e a análise dos experimentos 9 e 1 (experimentos onde as condições são iguais as fixadas na etapa anterior, variando somente volume de solvente) permitiu a discussão sobre a eficiência de ambos. Também por considerar 15 mL volume elevado, optou-se por testar de forma univariada menores volumes de MeOH.

As recuperações obtidas nesta etapa estão descritas na Figura 14. Recuperações entre 60% e 101% foram obtidas para todos analitos em estudo com RSD menores que 23%, sendo que os menores RSD foram obtidos quando usados 5 mL de MeOH. Somando a isto, não houve diferença estatística para os três volumes testados (ANOVA, $p < 0,05$) e os resultados obtidos nesta etapa foram dentro do que o estudo buscou (recuperações entre 70% e 120% e RSD menores que 20% para maioria dos analitos).

Visto que as recuperações foram semelhantes para os 3 testes, a escolha de melhor volume de solvente é justificável pelo menor consumo de solvente e diminuição dos resíduos gerados.

Somando a este, quando aplicado menor volume de solvente, menores LOQ podem ser obitidos (DUARTE *et al.*, 2013; RIDGWAY *et al.*, 2007), fato este devido ao fator de diluição. Com isso, o volume de 5 mL foi selecionado para a técnica em estudo.

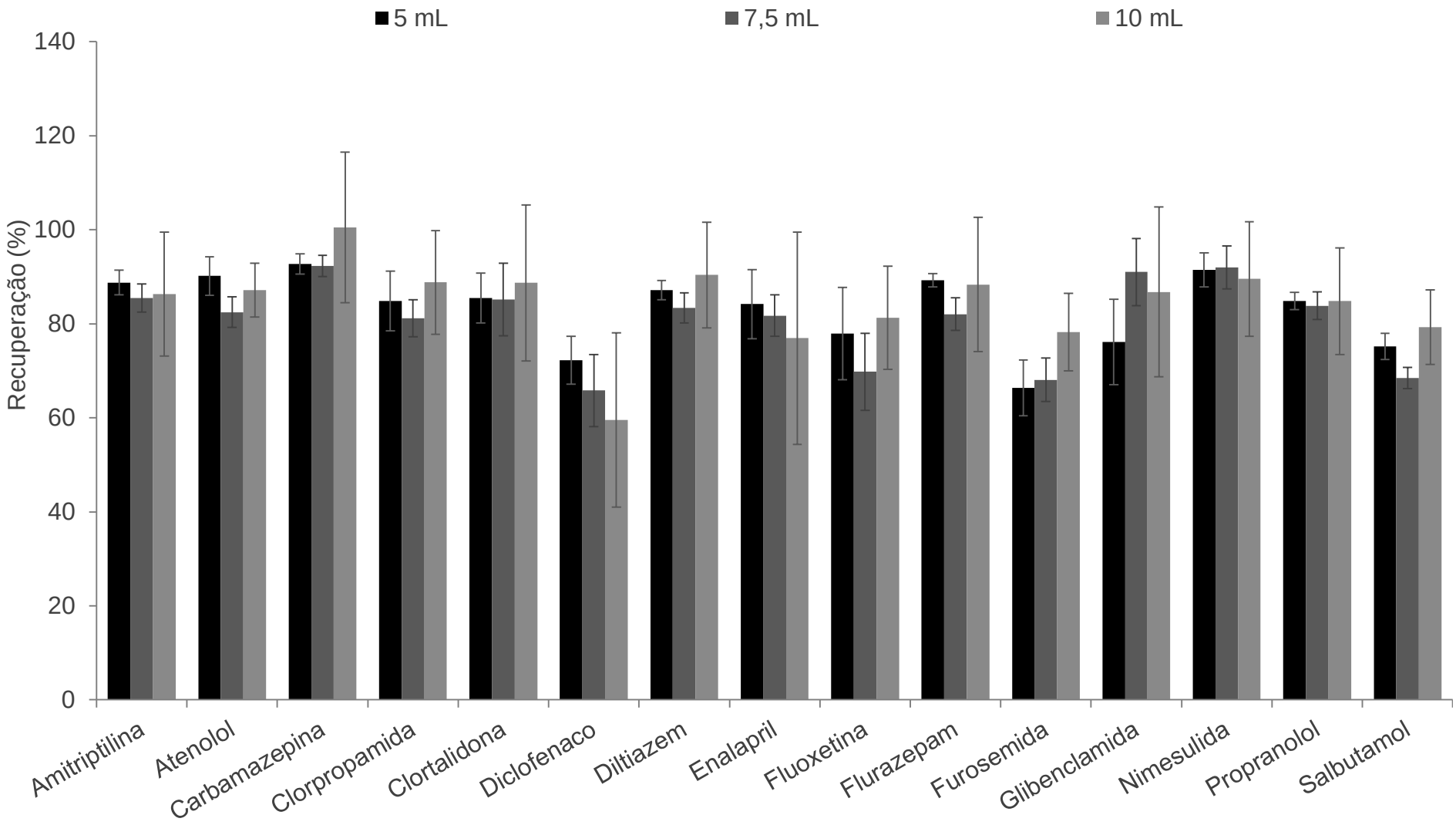



**Figura 14.** Recuperações e RSD obtidos na MSPD para diferentes volumes de solvente testados. Barras de erros significam valores de RSD (n=9). Condições de extração: 0,5 g de amostra fortificada a 1 µg $g^{-1}$, 0,5 g de terra diatomácea, 0,5 g de $Na_2SO_4$, MeOH, vórtex 1 min e centrifugação a 10179 G por 10 min.

### 5.5.6 Procedimento MSPD otimizado

No procedimento MSPD assistido por vórtex otimizado (Figura 15) 0,5 g amostra previamente homogeneizada em um processador de alimentos foi disperso com 0,5 g de terra diatomácea e 0,5 g de $Na_2SO_4$ por 5 min. O macerado foi transferido para um tubo de fundo cônico onde foram adicionados 5 mL de MeOH, o tubo foi agitado em vórtex por 1 min e centrifugado a 10179 G por 10 min. Uma alíquota de 1 mL do extrato final foi retirada para análise cromatográfica.

**Figura 15.** Procedimento MSPD assistido por vórtex otimizado.

## 5.6 Validação do método

### 5.6.1 Curva analítica e linearidade

A equação da reta e os coeficiente de correlação linear estão descritos na Tabela 13. Como pode-se observar, os resultados para o ensaio de linearidade através da calibração externa e superposição da matriz demonstram que a linearidade foi adequada dentro da faixa de estudo, onde a faixa linear para cada analito variou do LOQ até 100 ng $L^{-1}$ para curva no solvente e do LOQ até 10000 ng $g^{-1}$ para curva na matriz.

Com base nos dados apresentados, pode-se observar que o modelo de regressão linear é adequado para a análise dos compostos apresentando coeficiente de correlação linear maior que 0,99 para maioria dos analitos, valor este recomendado para análise de resíduos em amostras ambientais (INMETRO, 2010; SANCO, Document nº SANCO/12571, 2013) e para análises de fármacos (ANVISA, 2003; FDA, 2013).

**Tabela 13.** Equação da reta e coeficiente de correlação linear obtido para cada composto quando realizados pela calibração externa e calibração por superposição na matriz.

| Analitos | Curva analítica no solvente (MeOH) | | Curva analítica na matriz (filé de *Mugil liza*) | |
|---|---|---|---|---|
| | Equação da reta | *r* | Equação da reta | *r* |
| Amitriptilina | $y = 1{,}91 \times 10^{8}x - 1{,}52 \times 10^{6}$ | 0,9996 | $y = 1{,}80 \times 10^{8}x - 3{,}94 \times 10^{6}$ | 0.9991 |
| Atenolol | $y = 1{,}80 \times 10^{8}x - 5{,}26 \times 10^{5}$ | 0,9981 | $y = 4{,}02 \times 10^{7}x - 1{,}68 \times 10^{6}$ | 0.9972 |
| Carbamazepina | $y = 2{,}96 \times 10^{8}x - 1{,}83 \times 10^{6}$ | 0,9995 | $y = 3{,}20 \times 10^{8}x - 6{,}69 \times 10^{6}$ | 0.9988 |
| Clorpropamida | $y = 6{,}97 \times 10^{7}x - 2{,}14 \times 10^{5}$ | 0,9999 | $y = 5{,}63 \times 10^{7}x - 9{,}67 \times 10^{5}$ | 0.9995 |
| Clortalidona | $y = 2{,}02 \times 10^{6}x - 3{,}20 \times 10^{4}$ | 0,9995 | $y = 2{,}27 \times 10^{6}x - 1{,}19 \times 10^{5}$ | 0.9859 |
| Diclofenaco | $y = 2{,}37 \times 10^{7}x - 1{,}18 \times 10^{5}$ | 0,9997 | $y = 1{,}96 \times 10^{7}x - 2{,}99 \times 10^{5}$ | 0.9995 |
| Diltiazem | $y = 4{,}50 \times 10^{9}x - 4{,}84 \times 10^{7}$ | 0,9992 | $y = 4{,}36 \times 10^{9}x - 1{,}44 \times 10^{8}$ | 0.9974 |
| Enalapril | $y = 1{,}32 \times 10^{8}x - 1{,}44 \times 10^{5}$ | 0,9999 | $y = 1{,}45 \times 10^{8}x - 2{,}60 \times 10^{6}$ | 0.9994 |
| Fluoxetina | $y = 2{,}43 \times 10^{7}x - 1{,}64 \times 10^{5}$ | 0,9998 | $y = 2{,}14 \times 10^{7}x - 5{,}56 \times 10^{5}$ | 0.9986 |
| Flurazepam | $y = 3{,}02 \times 10^{8}x - 1{,}76 \times 10^{6}$ | 0,9996 | $y = 3{,}06 \times 10^{8}x - 8{,}69 \times 10^{6}$ | 0.9980 |
| Furosemida | $y = 9{,}61 \times 10^{6}x - 2{,}25 \times 10^{5}$ | 0,9972 | $y = 1{,}61 \times 10^{7}x - 4{,}65 \times 10^{5}$ | 0.9972 |
| Glibenclamida | $y = 1{,}73 \times 10^{8}x - 6{,}67 \times 10^{5}$ | 0,9999 | $y = 1{,}85 \times 10^{8}x - 3{,}54 \times 10^{6}$ | 0.9982 |
| Nimesulida | $y = 2{,}13 \times 10^{7}x - 2{,}84 \times 10^{5}$ | 0,9993 | $y = 4{,}58 \times 10^{7}x - 1{,}58 \times 10^{6}$ | 0.9976 |
| Propranolol | $y = 3{,}31 \times 10^{8}x - 1{,}80 \times 10^{6}$ | 0,9998 | $y = 3{,}12 \times 10^{8}x - 5{,}38 \times 10^{6}$ | 0.9993 |
| Salbutamol | $y = 6{,}79 \times 10^{8}x - 2{,}05 \times 10^{6}$ | 0,9991 | $y = 1{,}40 \times 10^{8}x - 2{,}75 \times 10^{6}$ | 0.9990 |

### 5.6.2 Limite de detecção e limite de quantificação

Os valores de LOD e LOQ para cada composto estão descritos na Tabela 14. Os limites obtidos neste estudo estão na mesma grandeza de outros métodos desenvolvidos para quantificação de fármacos em amostras de peixes. SUBEDI *et al.*, (2011) validaram um método baseado na extração com líquido pressurizado e limpeza em gel de sílica onde os valores de LOQ variaram de 0,54 ng $g^{-1}$ a 397 ng $g^{-1}$. KLOSTERHAUS *et al.*, (2013) validaram um método baseado na extração sólido-líquido com uma etapa de limpeza em cartuchos de SPE, onde os LOQ variaram de 2 ng $g^{-1}$ a 50 ng $g^{-1}$.

Mesmo que o método proposto por este estudo apresente valores de LOQ semelhantes aos descritos na literatura, é importante salientar que o menor custo de análise pelo menor consumo de reagentes, menor tempo de análise visto a simplicidade de execução deste são vantagens importantes comparadas aos métodos discutidos que apresentam basicamente maior número de etapas por realizarem uma etapa de limpeza posterior a extração.

**Tabela 14.** Limite de detecção e limite de quantificação instrumental e do método para cada composto.

| Analitos | Instrumental | | Método | |
|---|---|---|---|---|
| | LOD (ng $mL^{-1}$) | LOQ (ng $mL^{-1}$) | LOD (ng $g^{-1}$) | LOQ (ng $g^{-1}$) |
| Amitriptilina | 0,05 | 0,50 | 10 | 50 |
| Atenolol | 0,05 | 0,10 | 50 | 500 |
| Carbamazepina | 0,05 | 0,10 | 5 | 50 |
| Clorpropamida | 0,10 | 0,50 | 10 | 50 |
| Clortalidona | 1 | 5 | 500 | 1000 |
| Diclofenaco | 0,05 | 0,10 | 10 | 50 |
| Diltiazem | 0,01 | 0,05 | 1 | 5 |
| Enalapril | 0,10 | 0,50 | 10 | 50 |
| Fluoxetina | 0,10 | 0,50 | 100 | 500 |
| Flurazepam | 0,01 | 0,05 | 5 | 10 |
| Furosemida | 0,50 | 1 | 100 | 500 |
| Glibenclamida | 0,01 | 0,05 | 1 | 10 |
| Nimesulida | 0,01 | 0,05 | 1 | 10 |
| Propranolol | 0,05 | 0,10 | 1 | 5 |
| Salbutamol | 0,01 | 0,05 | 10 | 50 |

Ainda, o limite de quantificação do método proposto está dentro das concentrações de fármacos encontrados em amostras de peixes (RAMIREZ *et al.*, 2009; WILLE *et al.*, 2011) (KLOSTERHAUS *et al.*, 2013) (HUERTA *et al.*, 2013) (TOGUNDE *et al.*, 2012), destacando assim a utilidade da técnica para detecção de fármacos em peixes.

Cabe reforçar que não há legislação específica que determine MRL para fármacos em amostras de pescado. Neste sentido, também não há legislação para resíduos de fármacos em amostras de água.

### 5.6.3 Exatidão e Precisão

Os resultados obtidos para a exatidão do método estão demonstrados na Tabela 15, e verifica-se que os resultados de recuperação variaram de 70% para fluoxetina a 108% para glibenclamida com RSD variando de 1% para salbutamol a 13% para diclofenaco, comprovando assim que o método proposto apresenta exatidão e precisão dentro dos valores recomendados para análise de resíduos (INMETRO, 2010; SANCO, Document nº SANCO/12571, 2013).

Outros métodos desenvolvidos para análise de fármacos em amostras de peixes relatam resultados de exatidão e precisão próximos aos obtidos por este. HUERTA *et al.*, (2013) obtiveram valores de exatidão entre 80% e 106% e precisão entre 1% e 20% aplicando método baseado na PLE para análise de 20 fármacos, sendo que destes cinco também foram analisados neste estudo. WANG; GARDINALI, (2012) obtiveram recuperações entre 19% e 85% e RSD entre 1% e 16% aplicando método baseado na ASE e limpeza por SPE para análise de onze fármacos, dos quais três destes foram analisados por este estudo.

**Tabela 15.** Exatidão (recuperação) e precisão por repetitividade (RSDr) e precisão intermediária (RSDpi).

| Analitos | Recuperação (%) ± RSDr (%) | | | Recuperação (%) ± RSDpi (%) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | LOQ | 5 LOQ | 20 LOQ | LOQ | 5 LOQ | 20 LOQ |
| Amitriptilina | 95±13 | 87±2 | 85±1 | 85±5 | 83±3 | 80±3 |
| Atenolol | 80±2 | 78±1 | 79±1 | 80±3 | 76±3 | 75±3 |
| Carbamazepina | 90±4 | 87±4 | 93±3 | 90±4 | 81±6 | 85±3 |
| Clorpropamida | 89±4 | 88±2 | 89±3 | 96±5 | 96±3 | 97±3 |
| Clortalidona | 89±2 | 86±3 | 87±1 | 101±6 | 73±7 | 82±5 |
| Diclofenaco | 87±11 | 88±4 | 97±11 | 84±11 | 87±8 | 86±6 |
| Diltiazem | 80±8 | 85±6 | 85±2 | 77±11 | 86±6 | 85±7 |
| Enalapril | 86±7 | 83±1 | 85±1 | 93±6 | 87±4 | 91±3 |
| Fluoxetina | 70±5 | 70±3 | 71±4 | 78±6 | 72±4 | 68±2 |
| Flurazepam | 96±7 | 82±2 | 81±2 | 90±6 | 83±3 | 84±3 |
| Furosemida | 86±1 | 78±3 | 79±2 | 77±8 | 72±10 | 70±3 |
| Glibenclamida | 108±11 | 88±4 | 90±3 | 82±8 | 86±7 | 90±3 |
| Nimesulida | 87±6 | 87±11 | 92±5 | 100±10 | 99±9 | 100±5 |
| Propranolol | 78±6 | 79±3 | 82±2 | 72±6 | 78±6 | 83±4 |
| Salbutamol | 79±4 | 78±3 | 76±1 | 83±7 | 71±3 | 72±3 |

### 5.6.4 Efeito Matriz

O efeito matriz foi avaliado pela calibração externa e calibração por superposição na matriz (Tabela 16) (APÊNDICE B). Os compostos que apresentaram efeito matriz maior que ±20 % foram atenolol (supressão de sinal em 78%), salbutamol (supressão de sinal em 79%), furosemida (enriquecimento de sinal de 67%) e nimesulida (enriquecimento de sinal de 115%). Os demais compostos apresentaram efeito matriz <±20%. Logo para os quatro fármacos citados o efeito matriz foi considerado elevado (ECONOMOU *et al.*, 2009)

Os resultados apresentados por este estudo são semelhantes aos obtidos por WANG; GARDINALI, (2012) para análise de peixes e PAVLOVIC *et al.*, (2012) para análise de fármacos, entretanto neste método há aplicação de uma etapa de limpeza por SPE.

**Tabela 16.** Efeito matriz observado pelo método proposto.

| Analito | Efeito Matriz (%) |
|---|---|
| Amitriptilina | -6 |
| Atenolol | **-78** |
| Carbamazepina | 19 |
| Clorpropamida | -19 |
| Clortalidona | 13 |
| Diclofenaco | -17 |
| Diltiazem | -3 |
| Enalapril | 10 |
| Fluoxetina | -12 |
| Flurazepam | 2 |
| Furosemida | **67** |
| Glibenclamida | 6 |
| Nimesulida | **115** |
| Propranolol | -6 |
| Salbutamol | **-79** |

Negrito indica valores maiores que ±20%

RAMIREZ *et al.*, (2007) desenvolveram um método para análise de fármacos em peixe e apresentaram um estudo de efeito matriz em diferentes solventes e diferentes pH, e para todos os casos, o efeito matriz observado foi maior do que o obtido pelo método proposto.

O mesmo autor relata três maneiras de se realizar a análise em casos onde o efeito matriz é elevado, sendo a diluição isotópica a mais indicada. No entanto, a adição de padrão e a calibração por superposição na matriz é simples e fácil de implementar. No referido estudo, bem como neste, foi realizada a calibração por superposição na matriz para compensação do efeito matriz observado durante as análises.

### 5.6.5 Eficiência da MSPD assistida por vórtex otimizada e validada e Aplicabilidade

O método foi aplicado a outras espécies de peixe para verificar a capacidade do mesmo em extrair os analitos em estudo, avaliando peixes com diferentes proporções de macro constituintes (ver subitem 5.3 – Caracterização das amostras). As outras quatro espécies foram fortificadas em três níveis, LOQ, 5x LOQ e 20x LOQ e cada nível de fortificação foi analisado em triplicata.

A Tabela 17 apresenta as recuperações e RSD obtidos, os resultados mostram que as recuperações e RSD estão na faixa recomendada (SANCO, Document nº SANCO/12571, 2013). Os efeitos matriz observados para as espécies estudadas são apresentados na Tabela 18.

Os resultados mostraram que mesmo amostras com alto teor lipídico (16%) (*Genidens genidens*), apresentam valores aceitáveis de recuperação (70 – 120%) para maior parte dos analitos, do mais polar (enalapril – Log Kow 0,1) ao mais apolar (amitriptilina – Log Kow 4,92). Estes resultados mostram a eficiência do método proposto.

O método também foi aplicado as mesmas cinco espécies estudadas, sendo que três amostras de cada espécie foram usadas na aplicabilidade. As amostras foram homogeneizadas e esta foi submetida ao processo de extração. Não foi verificada a presença de fármacos em nenhuma das amostras analisadas.

**Tabela 17.** Exatidão e precisão da técnica MSPD assistida por vórtex para diferentes espécies estudadas.

| **Analitos** | *Micropogonias furnieri* R(%)±RSD(%) | | | *Loricaria anus* R(%)±RSD(%) | | | *Pimelodus pintado* R(%)±RSD(%) | | | *Genidens genidens* R(%)±RSD(%) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | LOQ | 5 LOQ | 20 LOQ | LOQ | 5 LOQ | 20 LOQ | LOQ | 5 LOQ | 20 LOQ | LOQ | 5 LOQ | 20 LOQ |
| Amitriptilina | 71±7 | 94±5 | 84±1 | 81±3 | 83±3 | 75±1 | 86±4 | 86±1 | 85±1 | 94±2 | 84±2 | 82±2 |
| Atenolol | 59±9 | 94±7 | 75±2 | 68±5 | 68±2 | 63±2 | 67±3 | 71±5 | 94±3 | 73±5 | 77±2 | 72±4 |
| Carbamazepina | 78±11 | 90±4 | 83±3 | 104±5 | 88±3 | 79±3 | 93±4 | 90±6 | 94±7 | 96±8 | 91±7 | 82±3 |
| Clorpropamida | 72±7 | 94±2 | 92±2 | 93±5 | 91±2 | 84±2 | 91±3 | 90±2 | 96±3 | 92±5 | 90±2 | 87±2 |
| Clortalidona | 83±13 | 92±4 | 85±4 | 86±11 | 83±7 | 76±2 | 91±5 | 91±7 | 72±3 | 102±8 | 81±5 | 85±4 |
| Diclofenaco | 82±7 | 85±5 | 93±3 | 92±9 | 89±10 | 84±5 | 95±10 | 84±9 | 94±2 | 88±12 | 103±5 | 91±2 |
| Diltiazem | 63±15 | 96±3 | 89±2 | 90±4 | 97±3 | 82±1 | 91±9 | 84± | 86±2 | 102±6 | 86±3 | 87±1 |
| Enalapril | 71±10 | 96±5 | 84±1 | 81±3 | 94±3 | 85±1 | 84±11 | 90±5 | 89±3 | 89±8 | 101±5 | 88±2 |
| Fluoxetina | 60±6 | 86±2 | 82±2 | 74±6 | 74±5 | 70±2 | 82±6 | 77±4 | 73±2 | 86±4 | 86±3 | 78±1 |
| Flurazepam | 79±8 | 92±4 | 89±3 | 96±8 | 90±5 | 82±2 | 87±4 | 90±2 | 90±4 | 91±6 | 93±4 | 89±2 |
| Furosemida | 69±10 | 81±4 | 79±3 | 82±8 | 78±7 | 73±3 | 82±12 | 80±3 | 78±4 | 75±8 | 77±3 | 74±2 |
| Glibenclamida | 76±16 | 87±4 | 87±4 | 81±9 | 101±10 | 77±5 | 90±5 | 97±5 | 88±1 | 88±8 | 105±4 | 88±2 |
| Nimesulida | 84±12 | 99±8 | 91±4 | 66±12 | 88±10 | 78±5 | 75±16 | 90±10 | 87±5 | 128±10 | 79±15 | 84±5 |
| Propranolol | 70±7 | 87±4 | 76±2 | 82±8 | 72±6 | 64±2 | 76±14 | 74±3 | 72±3 | 100±10 | 83±5 | 76±4 |
| Salbutamol | 68±5 | 87±4 | 76±3 | 66±5 | 64±2 | 62±2 | 64±8 | 64±2 | 58±3 | 71±8 | 81±3 | 71±5 |

**Tabela 18.** Porcentagem do efeito matriz observado através das análises das diferentes espécies de peixes estudadas.

| Analitos | *Loricaria anus* | *Micropogonias furnieri* | *Pimelodus pintado* | *Genidens genidens* |
|---|---|---|---|---|
| Amitriptilina | 11,6 | -12,8 | 7,2 | 3,2 |
| Atenolol | **-73,8** | **-89,2** | **-78,5** | **-81,8** |
| Carbamazepina | 3,5 | -2,8 | **-30,9** | -19,9 |
| Clorpropamida | 7,5 | -9,7 | 6,0 | 0,9 |
| Clortalidona | -13,9 | **-32,6** | **-36,6** | **-41,7** |
| Diclofenaco | **21,7** | -19,0 | **-23,4** | **-29,6** |
| Diltiazem | 1,0 | -7,6 | 4,2 | 1,7 |
| Enalapril | 14,2 | -5,8 | 3,7 | -1,4 |
| Fluoxetina | 2,9 | -9,8 | 6,9 | -2,8 |
| Flurazepam | 3,6 | -6,8 | 5,5 | -2,2 |
| Furosemida | -4,3 | **-27,5** | **-31,6** | **-30,6** |
| Glibenclamida | **21,2** | -11,4 | 0,9 | 5,5 |
| Nimesulida | 18,6 | -1,8 | **-22,7** | -19,7 |
| Propranolol | 5,5 | -16,9 | 10,9 | -3,8 |
| Salbutamol | **-75,3** | **-89,0** | **-79,7** | **-81,7** |

Negrito indica valores maiores que ±20%.

## 5.7 Comparação da técnica MSPD assistida por vórtex proposta

A Tabela 19 apresenta diferentes técnicas propostas para extração de fármacos de amostras de peixes e parâmetros de desempenho analítico. É possível verificar a semelhança dentre estas, entretanto a técnica proposta por este estudo, possibilitou a utilização de diferentes materiais de fonte renovável e de baixo custo, tendo baixo consumo de reagentes.

Desta forma, a técnica de MSPD assistida por vórtex demonstra características que atendem as necessidades analíticas para análise de fármacos em peixes. Sendo assim, esta apresenta-se como alternativa de baixo custo, com a utilização de pouca quantidade de reagentes e uso de materiais alternativos na MSPD para detecção de fármacos em amostras de peixes.

**Tabela 19.** Comparação do método MSPD assistido por vórtex validado com outros métodos para análise de fármacos em peixe.

| Autor | Técnica de extração | Analitos | Determinação | Performance analítica | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Exatidão (%) | Precisão (%) | Faixa de LOQ (ng $g^{-1}$) | Efeito matriz (%) |
| Método proposto | MSPD assistida por vórtex | 15 fármacos multiclasse | LC-MS/MS | 68-108 | 1-14 | 5-1000 | -79 - 115 |
| KLOSTERHAUS *et al.*, (2013) | SLE-SPE | 104 PPCPs | LC-MS/MS | 20-440 | 4-27 | 0.07-1400 | -*** |
| ORLANDO; SIMIONATO, (2013) | SLE-SPE | 4 Tetraciclinas | LC-FD | 59-77 | 1-31 | 5-14** | - |
| LOPES *et al.*, (2012) | QuEChERS | 32 Drogas veterinárias | UHPLC*-MS/MS | 69-125 | 1-30 | 10-50 | >-60 - <80 |
| SELF; WU, (2012) | MSPD | 8 aminas biogênicas | UHPLC-Orbitrap MS | 80-109 | 1-9 | 7.6-11000 | - |

* Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência, (UHPLC, do inglês *Ultra High Performance Chromatography*);

** LOD descrito no artigo;

*** Efeito matriz não descrito no artigo.

# 6 CONCLUSÃO

A LC-MS/MS demonstrou ser uma técnica eficiente para a determinação dos compostos de interesse, permitindo a realização da análise quantitativa, através da análise no MRM. O tempo de análise cromatográfica otimizado foi de 16 min, sendo um tempo baixo considerando que permitiu a análise de quinze compostos.

A MSPD seguida da extração em vórtex demonstrou ser uma técnica simples e eficiente no preparo de amostras de peixe. O uso de diferentes suporte sólidos, sais e solventes foram testados e possibilitaram a verificação de condições otimizadas no processo de extração dos quinze fármacos em estudo.

Cabe salientar que dos suportes sólidos testados, quitina, quitosana e concha de mexilhão dourado foram testados pela primeira vez na etapa de dispersão da MSPD. Mesmo não sendo selecionados nas condições ótimas de estudo estes podem ser considerados como alternativas promissoras para MSPD e/ou técnicas de extração que façam uso de material sólido, quando otimizada.

O parâmetros de validação da técnica proposta demonstraram que este responde adequadamente para analisar os quinze fármacos. A linearidade da técnica foi adequada para os fármacos analisados ($r > 0,99$). Os limites de quantificação do método variaram de 5 ng $g^{-1}$ para diltiazem e propranolol até 1000 ng $g^{-1}$ para clortalidona. Os valores de recuperação obtidos na validação correspondem a faixa de aceitação recomendada (70 -120%) e a precisão menor que 14% para todos analitos.

Além disto, a exatidão e precisão do método para diferentes espécies de peixe foi satisfatória, apresentando recuperações entre 70 - 120% para maior parte dos compostos em estudo e RSD menores que 16%.

Considerando o apresentado neste estudo, é possível verificar que materiais de fontes renováveis e de baixo custo devem ser amplamente explorados para seu devido uso em técnicas de extração, além disso a redução do consumo de reagentes e solventes podem ser testados possibilitando a obtenção de resultados satisfatórios na determinação de fármacos em amostras de peixes. Sendo a técnica proposta por este estudo, uma ferramenta útil para estudos ambientais que visem a detecção de fármacos em peixes e futuras tomadas de decisão acerca do assunto.

# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-DEGS, Y.; KHRAISHEH, M. A.; TUTUNJI, M. F. Sorption of lead ions on diatomite and manganese oxides modified diatomite. **Water Research,** v. 35, n. 15, p. 3724-8, 2001.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International,** v. 86, n. 2, p. 412-31, 2003.

ANVISA. **PORTARIA Nº 3.916, de 30 de outubro de 1998**.

ANVISA. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. 899, R. N. 2003.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. In: (Ed.). **Official Methods of Analysis AOAC International**. 16th ed. AOAC (CDROM). Washington, DC, 2000.

ARIAS, J. L.; ROMBALDI, C.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. Alternative sorbents for the dispersive solid-phase extraction step in quick, easy, cheap, effective, rugged and safe method for extraction of pesticides from rice paddy soils with determination by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A,** v. 1360, p. 66-75, Sep 19 2014.

BAIRD, C.; CANN, M. **Química ambiental**. Bookman, 2008. ISBN 9788536300023.

BARKER, S. A. Matrix solid phase dispersion (MSPD). **Journal of Biochemical and Biophysical Methods,** v. 70, n. 2, p. 151-62, 2007.

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, 1989.

BARTHOLOW, M. TOP 200 DRUGS OF 2012. **Pharmacy Times 2013,** v. 79, n. 9, p. 42-44, 2013. Disponível em: < www.pharmacytimes.com >.

BATTISTI, M. V. R.; CAMPANA-FILHO, S. P. Obtenção e caracterização de quitina e quitosanas de cascas de Macrobrachium rosembergii. **Química Nova,** v. 31, p. 2014-2019, 2008.

BEAUSSE, J. Selected drugs in solid matrices: a review of environmental determination, occurrence and properties of principal substances. **TrAC Trends in Analytical Chemistry,** v. 23, n. 10-11, p. 753-761, 2004.

BICUDO, R. C. **Avaliação de Sistemas de Cromatografia Líquida Uni e Bidimensional Acopladas a Espectrometria de Massas na Análise de Proteoma dos Corpos Protéicos do Milho**. 2007. Tese (Doutorado). Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo

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

BLASCO, C.; FONT, G.; PICÓ, Y. Comparison of microextraction procedures to determine pesticides in oranges by liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A,** v. 970, n. 1–2, p. 201-212, 2002.

BONFIGLIO, R.; KING, R. C.; OLAH, T. V.; MERKLE, K. The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds. **Rapid Communications in Mass Spectrometry,** v. 13, n. 12, p. 1175-1185, 1999.

BRASIL. **Lei nº 10.858, de 13 de abril de 2004**.

CALDAS, S. S. **Otimização e Validação de Métodos Empregando DLLME, SPE, HPLC-DAD e LC-ESI-MS/MS para Determinação de Agrotóxicos em Água Subterrânea**. 2009. Dissertação (Mestrado). Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande

CALDAS, S. S.; BOLZAN, C. M.; GUILHERME, J. R.; SILVEIRA, M. A.; ESCARRONE, A. L.; PRIMEL, E. G. Determination of pharmaceuticals, personal care products, and pesticides in surface and treated waters: method development and survey. **Environmental Science and Pollution Research International,** v. 20, n. 8, p. 5855-63, 2013a.

CALDAS, S. S.; MARIAN BOLZAN, C.; JAIME DE MENEZES, E.; LAURA VENQUIARUTI ESCARRONE, A.; DE MARTINEZ GASPAR MARTINS, C.; BIANCHINI, A.; GILBERTO PRIMEL, E. 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. 63-8, 2013b.

CALDERON-PRECIADO, D.; JIMENEZ-CARTAGENA, C.; PENUELA, G.; BAYONA, J. M. Development of an analytical procedure for the determination of emerging and priority organic pollutants in leafy vegetables by pressurized solvent extraction followed by GC-MS determination. **Analytical and Bioanalytical Chemistry,** v. 394, n. 5, p. 1319-27, 2009.

CAPRIOTTI, A. L.; CAVALIERE, C.; LAGANÀ, A.; PIOVESANA, S.; SAMPERI, R. Recent trends in matrix solid-phase dispersion. **TrAC Trends in Analytical Chemistry,** v. 43, p. 53-66, 2013.

CARDOSO, L. V.; TOMASINI, D.; SAMPAIO, M. R. F.; CALDAS, S. S.; KLEEMANN, N.; PRIMEL, E. G.; GONÇALVES, F. F. Optimization and validation of a method using SPE and LC-APCI-MS/MS for determination of pharmaceuticals in surface and public supply water. **Journal of the Brazilian Chemical Society,** v. 22, p. 1944-1952, 2011.

CARMODY, O.; FROST, R.; XI, Y.; KOKOT, S. Surface characterisation of selected sorbent materials for common hydrocarbon fuels. **Surface Science,** v. 601, n. 9, p. 2066-2076, 2007.

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

CERQUEIRA, M. B.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. New sorbent in the dispersive solid phase extraction step of quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe for the extraction of organic contaminants in drinking water treatment sludge. **Journal of Chromatography A,** v. 1336, p. 10-22, 2014.

CHEN, L.; LI, B. Determination of imidacloprid in rice by molecularly imprinted-matrix solid-phase dispersion with liquid chromatography tandem mass spectrometry. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci,** v. 897, p. 32-6, 2012.

CHEN, Y.; GUO, Z.; WANG, X.; QIU, C. Sample preparation. **Journal of Chromatography A,** v. 1184, n. 1-2, p. 191-219, 2008.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova,** v. 31, p. 623-636, 2008.

CHU, X.-G.; HU, X.-Z.; YAO, H.-Y. Determination of 266 pesticide residues in apple juice by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography–mass selective detection. **Journal of Chromatography A,** v. 1063, n. 1-2, p. 201-210, 2005.

CLARKE, B. O.; SMITH, S. R. Review of 'emerging' organic contaminants in biosolids and assessment of international research priorities for the agricultural use of biosolids. **Environ Int,** v. 37, n. 1, p. 226-47, 2011.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Editorada Unicamp, 2006. ISBN 9788526807044.

CORILO, Y. E. Analisadores de Massas - Quadropolo. 2014. Disponível em: < http://www.espectrometriademassas.com.br/ >. Acesso em: 14/07/2014.

CUNNINGHAM, V. L.; BINKS, S. P.; OLSON, M. J. Human health risk assessment from the presence of human pharmaceuticals in the aquatic environment. **Regulatory Toxicology and Pharmacology,** v. 53, n. 1, p. 39-45, 2009.

DAUGHTON, C. G.; TERNES, T. A. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? **Environmental Health Perspectives,** v. 107 Suppl 6, p. 907-38, 1999.

DÓREA, J. G. Persistent, bioaccumulative and toxic substances in fish: Human health considerations. **Science of The Total Environment,** v. 400, n. 1-3, p. 93-114, 2008.

DOTTO, G. L.; VIEIRA, M. L. G.; PINTO, L. A. A. Kinetics and Mechanism of Tartrazine Adsorption onto Chitin and Chitosan. **Industrial & Engineering Chemistry Research,** v. 51, n. 19, p. 6862-6868, 2012.

DRUGBANK. **Open Data Drug & Drug Target Database**. http://www.drugbank.ca/,

DU, B.; PEREZ-HURTADO, P.; BROOKS, B. W.; CHAMBLISS, C. K. Evaluation of an isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry method for pharmaceuticals in fish. **Journal of Chromatography A,** v. 1253, p. 177-83, 2012.

DUARTE, F. A.; SOARES, B. M.; VIEIRA, A. A.; PEREIRA, E. R.; MACIEL, J. V.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. Assessment of modified matrix solid-phase dispersion as sample preparation for the determination of CH3Hg+ and Hg2+ in fish. **Analytical Chemistry,** v. 85, n. 10, p. 5015-22, 2013.

EC. European Commision. 2014. Disponível em: < http://ec.europa.eu/index_pt.htm >. Acesso em: 22/06/2014.

ECONOMOU, A.; BOTITSI, H.; ANTONIOU, S.; TSIPI, D. 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. 5856-67, 2009.

ELLIS, J. B. Pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in urban receiving waters. **Environmental Pollution,** v. 144, n. 1, p. 184-9, 2006.

ESPLUGAS, S.; BILA, D. M.; KRAUSE, L. G. T.; DEZOTTI, M. Ozonation and advanced oxidation technologies to remove endocrine disrupting chemicals (EDCs) and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in water effluents. **Journal of Hazardous Materials,** v. 149, n. 3, p. 631-642, 2007.

FAN, Y. B.; YIN, Y. M.; JIANG, W. B.; CHEN, Y. P.; YANG, J. W.; WU, J.; XIE, M. X. Simultaneous determination of ten steroid hormones in animal origin food by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Food Chemistry,** v. 142, p. 170-7, 2014.

FDA. **Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation**, 2013.

FDA. Food and Drug Administration. 2014. Disponível em: < http://www.fda.gov/ >. Acesso em: 22/06/2014.

FISCHER, L. G.; PEREIRA, L. E. D.; VIEIRA, J. P. **PEIXES ESTUARINOS E COSTEIROS**. 2ª edição. 2011.

FUNASA. **Edital de chamamento público nº 1/2014** 2014.

GALUS, M.; JEYARANJAAN, J.; SMITH, E.; LI, H.; METCALFE, C.; WILSON, J. Y. Chronic effects of exposure to a pharmaceutical mixture and municipal wastewater in zebrafish. **Aquatic Toxicology,** v. 132-133, p. 212-22, 2013.

GANAN, J.; MORANTE-ZARCERO, S.; GALLEGO-PICO, A.; GARCINUNO, R. M.; FERNANDEZ-HERNANDO, P.; SIERRA, I. Evaluation of a molecularly imprinted polymer for determination of steroids in goat milk by matrix solid phase dispersion. **Talanta,** v. 126, p. 157-62, 2014.

GARCIA-LOPEZ, M.; CANOSA, P.; RODRIGUEZ, I. Trends and recent applications of matrix solid-phase dispersion. **Analytical and Bioanalytical Chemistry,** v. 391, n. 3, p. 963-74, 2008.

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

GILTROW, E.; ECCLES, P. D.; WINTER, M. J.; MCCORMACK, P. J.; RAND-WEAVER, M.; HUTCHINSON, T. H.; SUMPTER, J. P. Chronic effects assessment and plasma concentrations of the beta-blocker propranolol in fathead minnows (Pimephales promelas). **Aquatic Toxicology,** v. 95, n. 3, p. 195-202, 2009.

GOBAS, F. A. P. C.; WILCOCKSON, J. B.; RUSSELL, R. W.; HAFFNER, G. D. Mechanism of Biomagnification in Fish under Laboratory and Field Conditions. **Environmental Science & Technology,** v. 33, n. 1, p. 133-141, 1998.

GONZÁLEZ-MARIÑO, I.; RODRÍGUEZ, I.; QUINTANA, J. B.; CELA, R. Matrix solid-phase dispersion followed by gas chromatography-mass spectrometry for the determination of triclosan and methyl triclosan in sludge and sediments. **Analytical and Bioanalytical Chemistry,** v. 398, n. 5, p. 2289-2297, 2010.

GOULART, M. R.; SILVEIRA, C. B. D.; CAMPOS, M. L.; ALMEIDA, J. A. D.; MANFREDI-COIMBRA, S.; OLIVEIRA, A. F. D. Metodologias para reutilização do resíduo de terra diatomácea, proveniente da filtração e clarificação da cerveja. **Química Nova,** v. 34, p. 625-629, 2011.

GRITTI, F.; GUIOCHON, G. Adsorption mechanism in reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A,** v. 1115, n. 1-2, p. 142-163, 2006.

GROS, M.; RODRÍGUEZ-MOZAZ, S.; BARCELÓ, D. Fast and comprehensive multi-residue analysis of a broad range of human and veterinary pharmaceuticals and some of their metabolites in surface and treated waters by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A,** v. 1248, p. 104-121, 2012.

HASHEMI, M.; CHASTEEN, T. G. Hofmeister effect challenge. **Analytical and Bioanalytical Chemistry,** v. 400, n. 3, p. 643-4, 2011.

HAZELTON, P. D.; COPE, W. G.; MOSHER, S.; PANDOLFO, T. J.; BELDEN, J. B.; BARNHART, M. C.; BRINGOLF, R. B. Fluoxetine alters adult freshwater mussel behavior and larval metamorphosis. **Science of Total Environment,** v. 445-446, p. 94-100, 2013.

HC. Health Canada. 2014. Disponível em: < http://www.hc-sc.gc.ca/index-eng.php >. Acesso em: 25/06/2014.

HELALEH, M. I.; AL-RASHDAN, A.; IBTISAM, A. Simultaneous analysis of organochlorinated pesticides (OCPs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) from marine samples using automated pressurized liquid extraction (PLE) and Power Prep clean-up. **Talanta,** v. 94, p. 44-9, 2012.

HENDRICKSON, C. L. Eletrospray Ionization. 2014. Disponível em: < http://www.magnet.fsu.edu/ >. Acesso em: 15/07/2014.

HODGSON, E. **A Textbook of Modern Toxicology**. Wiley, 2010. ISBN 9780470617656.

HUERTA, B.; JAKIMSKA, A.; GROS, M.; RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; BARCELO, D. Analysis of multi-class pharmaceuticals in fish tissues by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A,** v. 1288, p. 63-72, 2013.

IBOPE. **CENSO 2010**. Instituto Brasileiro de Opinião Pública e Estatística 2013.

INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos analíticos,** v. DOQ-CGCRE-008, Brazil, 2010.

ISLAM, K. N.; BAKAR, M. Z. B. A.; NOORDIN, M. M.; HUSSEIN, M. Z. B.; RAHMAN, N. S. B. A.; ALI, M. E. Characterisation of calcium carbonate and its polymorphs from cockle shells (< i> Anadara granosa</i>). **Powder Technology,** v. 213, n. 1, p. 188-191, 2011.

KLOSTERHAUS, S. L.; GRACE, R.; HAMILTON, M. C.; YEE, D. Method validation and reconnaissance of pharmaceuticals, personal care products, and alkylphenols in surface waters, sediments, and mussels in an urban estuary. **Environment International,** v. 54, p. 92-9, 2013.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. **Química Farmacêutica**. Guanabara Koogan, 2008. ISBN 9788527714839.

KOSMA, C. I.; LAMBROPOULOU, D. A.; ALBANIS, T. A. Occurrence and removal of PPCPs in municipal and hospital wastewaters in Greece. **Journal of Hazardous Materials,** v. 179, n. 1-3, p. 804-17, 2010.

KOSTICH, M. S.; LAZORCHAK, J. M. Risks to aquatic organisms posed by human pharmaceutical use. **Science of Total Environment,** v. 389, n. 2-3, p. 329-39, 2008.

KRISTENSON, E.; BRINKMAN, U.; RAMOS, L. Recent advances in matrix solid-phase dispersion. **TrAC Trends in Analytical Chemistry,** v. 25, n. 2, p. 96-111, 2006.

LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. RiMa, 2004. ISBN 9788576560258.

LAPWORTH, D. J.; BARAN, N.; STUART, M. E.; WARD, R. S. Emerging organic contaminants in groundwater: A review of sources, fate and occurrence. **Environmental Pollution,** v. 163, p. 287-303, 2012.

LEHOTAY, S. J.; MASTOVSKA, K.; YUN, S. J. Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes. **Journal of AOAC International,** v. 88, n. 2, p. 630-8, 2005.

LI, J.; LIU, D.; WU, T.; ZHAO, W.; ZHOU, Z.; WANG, P. A simplified procedure for the determination of organochlorine pesticides and polychlorobiphenyls in edible vegetable oils. **Food Chem,** v. 151, p. 47-52, 2014.

LICHTENSTEIN, A. H. Summary of American Heart Association Diet and Lifestyle Recommendations Revision 2006. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology,** v. 26, n. 10, p. 2186-2191, 2006.

LINTELMANN, J.; KATAYAMA, A.; KURIHARA, N.; SHORE, L.; WENZEL, A. Endocrine disruptors in the environment - (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry,** v. 75, n. 5, p. 631-681, May 2003.

LOPES, R. P.; REYES, R. C.; ROMERO-GONZALEZ, R.; VIDAL, J. L.; FRENICH, A. G. Multiresidue determination of veterinary drugs in aquaculture fish samples by ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B,** v. 895-896, p. 39-47, 2012.

LU, Y.; ZHENG, T.; HE, X.; LIN, X.; CHEN, L.; DAI, Z. Rapid determination of chloramphenicol in soft-shelled turtle tissues using on-line MSPD-HPLC–MS/MS. **Food Chemistry,** v. 134, n. 1, p. 533-539, 2012.

MADUREIRA, T. V.; ROCHA, M. J.; CRUZEIRO, C.; RODRIGUES, I.; MONTEIRO, R. A.; ROCHA, E. The toxicity potential of pharmaceuticals found in the Douro River estuary (Portugal): evaluation of impacts on fish liver, by histopathology, stereology, vitellogenin and CYP1A immunohistochemistry, after sub-acute exposures of the zebrafish model. **Environmental Toxicology and Pharmacology,** v. 34, n. 1, p. 34-45, 2012.

MALIK, A. K.; BLASCO, C.; PICO, Y. Liquid chromatography-mass spectrometry in food safety. **Journal of Chromatography A,** v. 1217, n. 25, p. 4018-40, 2010.

MATUSZEWSKI, B. K. Standard line slopes as a measure of a relative matrix effect in quantitative HPLC–MS bioanalysis. **Journal of Chromatography B,** v. 830, n. 2, p. 293-300, 2006.

MOLINER-MARTINEZ, Y.; CAMPÍNS-FALCÓ, P.; MOLINS-LEGUA, C.; SEGOVIA-MARTÍNEZ, L.; SECO-TORRECILLAS, A. Miniaturized matrix solid phase dispersion procedure and solid phase microextraction for the analysis of organochlorinated pesticides and polybrominated diphenylethers in biota samples by gas chromatography electron capture detection. **Journal of Chromatography A,** v. 1216, n. 39, p. 6741-6745, 2009.

MOREAU, R. L. M.; SIQUEIRA, M. E. P. B. **Toxicologia analítica**. Guanabara Koogan, 2008. ISBN 9788527714327.

NIESSEN, W. M. A.; MANINI, P.; ANDREOLI, R. Matrix effects in quantitative pesticide analysis using liquid chromatography–mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews,** v. 25, n. 6, p. 881-899, 2006.

NUNEZ, O.; GALLART-AYALA, H.; MARTINS, C. P.; LUCCI, P. New trends in fast liquid chromatography for food and environmental analysis. **Journal of Chromatography A,** v. 1228, p. 298-323, 2012.

ORLANDO, E. A.; SIMIONATO, A. V. Extraction of tetracyclinic antibiotic residues from fish filet: comparison and optimization of different procedures using liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography A,** v. 1307, p. 111-8, 2013.

PAN, J.; ZHANG, C.; ZHANG, Z.; LI, G. Review of online coupling of sample preparation techniques with liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta,** v. 815, p. 1-15, 2014.

PAVLOVIĆ, D. M.; BABIĆ, S.; HORVAT, A. J. M.; KAŠTELAN-MACAN, M. Sample preparation in analysis of pharmaceuticals. **TrAC Trends in Analytical Chemistry,** v. 26, n. 11, p. 1062-1075, 2007.

PAVLOVIC, D. M.; PINUSIC, T.; PERISA, M.; BABIC, S. 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, 2012.

PENSADO, L.; CASAIS, M. C.; MEJUTO, M. C.; CELA, R. Application of matrix solid-phase dispersion in the analysis of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in fish samples. **Journal of Chromatography A,** v. 1077, n. 2, p. 103-109, 2005.

PETROVIC, M.; FARRÉ, M.; DE ALDA, M. L.; PEREZ, S.; POSTIGO, C.; KÖCK, M.; RADJENOVIC, J.; GROS, M.; BARCELO, D. Recent trends in the liquid chromatography–mass spectrometry analysis of organic contaminants in environmental samples. **Journal of Chromatography A,** v. 1217, n. 25, p. 4004-4017, 2010.

PINTO, L. D. S. **Espectrometria de Massa: Fundamentos e aplicações em proteômica** 2011.

PRIMEL, E. G.; CALDAS, S. S.; ESCARRONE, A. L. V. Multi-residue analytical methods for the determination of pesticides and PPCPs in water by LC-MS/MS: a review. **Central European Journal of Chemistry,** v. 10, n. 3, p. 876-899, 2012.

QUINTANA, M. C.; RAMOS, J. J.; HERNÁNDEZ, L.; RAMOS, L. Determination of residual phenothiazines in liver by matrix solid phase dispersion combined wit hplc with fluorescesce detection. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies,** v. 33, n. 2, p. 270-282, 2009.

RAMIREZ, A. J.; BRAIN, R. A.; USENKO, S.; MOTTALEB, M. A.; O'DONNELL, J. G.; STAHL, L. L.; WATHEN, J. B.; SNYDER, B. D.; PITT, J. L.; PEREZ-HURTADO, P.; DOBBINS, L. L.; BROOKS, B. W.; CHAMBLISS, C. K. Occurrence of pharmaceuticals and personal care products in fish: results of a national pilot study in the United States. **Environmental Toxicology and Chemistry,** v. 28, n. 12, p. 2587-97, 2009.

RAMIREZ, A. J.; MOTTALEB, M. A.; BROOKS, B. W.; CHAMBLISS, C. K. Analysis of Pharmaceuticals in Fish Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry,** v. 79, n. 8, p. 3155-3163, 2007.

RAVI KUMAR, M. N. V. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers,** v. 46, n. 1, p. 1-27, 2000.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova,** v. 27, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, F. A. D. L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C.; SILVA, L. R. D.; SCHNEIDER, R. P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova,** v. 31, p. 164-171, 2008.

RICCIO, M. F. Analisadores de Massa - Triplo Quadropolo. 2014. Disponível em: < http://www.espectrometriademassas.com.br/ >. Acesso em: 14/07/2014.

RICHARDSON, S. D.; TERNES, T. A. Water analysis: emerging contaminants and current issues. **Analytical Chemistry,** v. 83, n. 12, p. 4614-48, 2011.

RIDGWAY, K.; LALLJIE, S. P.; SMITH, R. M. Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. **Journal of Chromatography A,** v. 1153, n. 1-2, p. 36-53, 2007.

RODRIGUES, S. A. **Otimização e Validação de Métodos Empregando MSPD, QuEChERS Modificado e LC-ESI-MS/MS para Determinação de Agrotóxicos em Cebola**. 2010. Dissertação (Mestrado). Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande

RODRIGUES, S. A.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. A simple; efficient and environmentally friendly method for the extraction of pesticides from onion by matrix solid-phase dispersion with liquid chromatography-tandem mass spectrometric detection. **Analytica Chimica Acta,** v. 678, n. 1, p. 82-9, 2010.

RODRIGUEZ-GONZALEZ, N.; GONZALEZ-CASTRO, M. J.; BECEIRO-GONZALEZ, E.; MUNIATEGUI-LORENZO, S.; PRADA-RODRIGUEZ, D. Determination of triazine herbicides in seaweeds: Development of a sample preparation method based on Matrix Solid Phase Dispersion and Solid Phase Extraction Clean-up. **Talanta,** v. 121, p. 194-8, 2014.

SANCO. **Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed.**, Document nº SANCO/12571, 2013.

SEBASTIA, N.; SOLER, C.; SORIANO, J. M.; MANES, J. Occurrence of aflatoxins in tigernuts and their beverages commercialized in Spain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 58, n. 4, p. 2609-12, 2010.

SELF, R. L.; WU, W.-H. Determination of eight biogenic amines in selected seafood products by MSPD extraction followed by UHPLC-Orbitrap MS. **Journal of Food Composition and Analysis,** v. 27, n. 2, p. 169-173, 2012.

SHEN, Z. L.; YUAN, D.; ZHANG, H.; HU, M.; ZHU, J. H.; ZHANG, X. Q.; SU, Q. D. Matrix solid phase dispersion-accelerated solvent extraction for determination of OCP residues in fish muscles. **Journal of the Chinese Chemical Society,** v. 58, n. 4, p. 494-502, 2011.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de química analítica**. Pioneira Thomson Learning, 2006.

SMITH, R. M. Before the injection—modern methods of sample preparation for separation techniques. **Journal of Chromatography A,** v. 1000, n. 1-2, p. 3-27, 2003.

STACKELBERG, P. E.; GIBS, J.; FURLONG, E. T.; MEYER, M. T.; ZAUGG, S. D.; LIPPINCOTT, R. L. Efficiency of conventional drinking-water-treatment processes in removal of pharmaceuticals and other organic compounds. **Science of Total Environment,** v. 377, n. 2-3, p. 255-72, May 15 2007.

STUART, M.; LAPWORTH, D.; CRANE, E.; HART, A. Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater. **Science of Total Environment,** v. 416, p. 1-21, 2012.

SU, R.; WANG, X.; XU, X.; WANG, Z.; LI, D.; ZHAO, X.; LI, X.; ZHANG, H.; YU, A. Application of multiwall carbon nanotubes-based matrix solid phase dispersion extraction for determination of hormones in butter by gas chromatography mass spectrometry. **Journal of Chromatography A,** v. 1218, n. 31, p. 5047-54, 2011.

SUBEDI, B.; DU, B.; CHAMBLISS, C. K.; KOSCHORRECK, J.; RUDEL, H.; QUACK, M.; BROOKS, B. W.; USENKO, S. Occurrence of pharmaceuticals and personal care products in German fish tissue: a national study. **Environmental Science Technology,** v. 46, n. 16, p. 9047-54, 2012.

SUBEDI, B.; MOTTALEB, M. A.; CHAMBLISS, C. K.; USENKO, S. Simultaneous analysis of select pharmaceuticals and personal care products in fish tissue using pressurized liquid extraction combined with silica gel cleanup. **Journal of Chromatography A,** v. 1218, n. 37, p. 6278-84, 2011.

TAO, Y.; ZHU, F.; CHEN, D.; WEI, H.; PAN, Y.; WANG, X.; LIU, Z.; HUANG, L.; WANG, Y.; YUAN, Z. Evaluation of matrix solid-phase dispersion (MSPD) extraction for multi-fenicols determination in shrimp and fish by liquid chromatography-electrospray ionisation tandem mass spectrometry. **Food Chemistry,** v. 150, p. 500-6, 2014.

TOGUNDE, O. P.; OAKES, K. D.; SERVOS, M. R.; PAWLISZYN, J. Optimization of solid phase microextraction for non-lethal in vivo determination of selected pharmaceuticals in fish muscle using liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A,** v. 1261, p. 99-106, 2012.

TOMASINI, D.; SAMPAIO, M. R. F.; CARDOSO, L. V.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. Comparison of dispersive liquid–liquid microextraction and the modified QuEChERS method for the determination of fipronil in honey by high performance liquid chromatography with diode-array detection. **Analytical Methods,** v. 3, n. 8, p. 1893, 2011.

TSAI, D. Y.; CHEN, C. L.; DING, W. H. Optimization of matrix solid-phase dispersion for the rapid determination of salicylate and benzophenone-type UV absorbing substances in marketed fish. **Food Chemistry,** v. 154, p. 211-6, 2014.

TSAI, W. T.; LAI, C. W.; HSIEN, K. J. Characterization and adsorption properties of diatomaceous earth modified by hydrofluoric acid etching. **Journal of Colloid and Interface Science,** v. 297, n. 2, p. 749-54, 2006.

VALDES, M. E.; AME, M. V.; BISTONI, M. D.; WUNDERLIN, D. A. Occurrence and bioaccumulation of pharmaceuticals in a fish species inhabiting the Suquia River basin (Cordoba, Argentina). **Science of Total Environment,** v. 472C, p. 389-396, 2013.

VILLAVERDE-DE-SÁA, E.; QUINTANA, J.; RODIL, R.; FERRERO-REFOJOS, R.; RUBÍ, E.; CELA, R. Determination of perfluorinated compounds in mollusks by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry,** v. 402, n. 1, p. 509-518, 2012.

WANG, J.; GARDINALI, P. R. Analysis of selected pharmaceuticals in fish and the fresh water bodies directly affected by reclaimed water using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry,** v. 404, n. 9, p. 2711-20, 2012.

WANG, S.; AMORNWITTAWAT, N.; BANATLAO, J.; CHUNG, M.; KAO, Y.; WEN, X. Hofmeister effects of common monovalent salts on the beetle antifreeze protein activity. **Thr Journal of Physical Chemistry B,** v. 113, n. 42, p. 13891-4, 2009.

WANG, S.; XU, Y.; PAN, C.; JIANG, S.; LIU, F. Application of matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography–mass spectrometry to fungicide residue analysis in fruits and vegetables. **Analytical and Bioanalytical Chemistry,** v. 387, n. 2, p. 673-685, 2007.

WEN, Y.; CHEN, L.; LI, J.; LIU, D.; CHEN, L. Recent advances in solid-phase sorbents for sample preparation prior to chromatographic analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry,** v. 59, p. 26-41, 2014.

WILLE, K.; DE BRABANDER, H. F.; VANHAECKE, L.; DE WULF, E.; VAN CAETER, P.; JANSSEN, C. R. Coupled chromatographic and mass-spectrometric techniques for the analysis of emerging pollutants in the aquatic environment. **TrAC Trends in Analytical Chemistry,** v. 35, p. 87-108, 2012.

WILLE, K.; KIEBOOMS, J. A.; CLAESSENS, M.; RAPPE, K.; VANDEN BUSSCHE, J.; NOPPE, H.; VAN PRAET, N.; DE WULF, E.; VAN CAETER, P.; JANSSEN, C. R.; DE BRABANDER, H. F.; VANHAECKE, L. Development of analytical strategies using U-HPLC-MS/MS and LC-ToF-MS for the quantification of micropollutants in marine organisms. **Analytical and Bioanalytical Chemistry,** v. 400, n. 5, p. 1459-72, 2011.

ZHANG, X.; OAKES, K. D.; WANG, S.; SERVOS, M. R.; CUI, S.; PAWLISZYN, J.; METCALFE, C. D. In vivo sampling of environmental organic contaminants in fish by solid-phase microextraction. **TrAC Trends in Analytical Chemistry,** v. 32, p. 31-39, 2012.

# PRODUÇÃO CIENTÍFICA REFERENTE AO TRABALHO

**TRABALHO EM ANAIS DE CONGRESSOS:**

- HERTZOG, G.I.; ESCARRONE, A. L. V.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. - **Estudo de método para determinação de fármacos em peixe empregando MSPD e LC-ESI-MS/MS** – XV ENPOS 2013 (Pelotas – RS);
- SOARES, K. L.; ROMBALDI, C.; HERTZOG, G. I.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. - **Emprego da MSPD para extração de fármacos de peixes empregando diferentes suportes sólidos** – SIMCRO 2014 (Campos de Jordão – SP);
- ARIAS, J. L. de O.; ROMBALDI, C.; HERTZOG, G. I.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. - **Extração de contaminantes orgânicos empregando conchas de mexilhão como suporte sólido para MSPD** – SIMCRO 2014 (Campos de Jordão – SP);
- HERTZOG, G. I.; ROMBALDI, C.; SOARES, K. L.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. - **Suportes sólidos alternativos para extração de fármacos em diferentes espécies de peixes usando MSPD e LC-MS/MS** – MPU 2014 (Rio Grande – RS);
- CADAS, S. S.; ARIAS, J. L. de O.; ROMBALDI, C.; HERTZOG, G. I.; SOBRINHO, J. P. V.; MARTINS, A.; PRIMEL, E. G. - **Estudo do uso de concha de mexilhão como suporte sólido para MSPD na extração de compostos orgânicos de amostras de mexilhão dourado** – 3ER CUQA 2014 (Montevideo - UY).

**ARTIGO SUBMETIDO:**

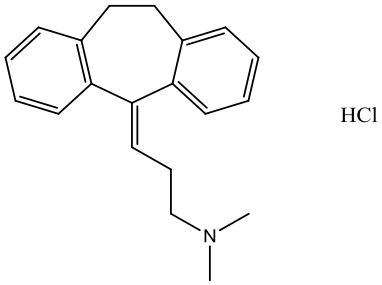
Hertzog, G. I.; SOARES, K. L.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. - **Study of vortex assisted MSPD and LC-MS/MS using alternative solid supports for pharmaceutical extraction from fish** – Journal of Chromatography A (submetido em 12/09/2014);

**ABSTRACT**

A procedure based on vortex matrix solid-phase dispersion (MSPD) for the extraction of fifteen multiclass pharmaceutical from fish samples with determination by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC- MS/MS) was validated. Florisil, C18, diatomaceous earth, chitin and chitosan were evaluated as solid supports. Best results were obtained with 0.5 g of diatomaceous earth, 0.5 g of sodium sulfate and 5 mL of methanol. Analytical recoveries ranged from 58% to 128% with RSD lower than 15%. LOQ values for the fifteen compounds ranged from 5 ng $g^{-1}$ to 1000 ng $g^{-1}$. The method under investigation has shown to be a simple and fast extraction tool with minimum instrumentation and low amount of reagent, resulting in method low cost. Besides, alternative materials, such as chitin and chitosan, which were applied to the dispersion step for the first time, showed to be interesting alternatives to be used.

# ANEXO

**Amitriptilina, cloridrato**




Nome químico: 3-(10,11-diidro-5H-dibenzo[a,b]cicloheptено-5-ilideno)-N,N-dimetil-I–propanamina;

Classe terapêutica: antidepressivo, antineurético;

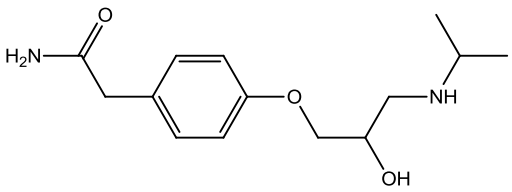
Fórmula molecular: $C_{20}H_{23}N$ HCl; Peso molecular: 313,87;

Número no Chemical Abstracts Service (CAS): 549-18-8;

pKa: 9,4; Log Kow: 4,92;

Antidepressivos bastante usado como sedativo, seu mecanismo de ação não é elucidado, entretanto sabe-se que este não age inibindo a monoaminoxidase e também não age por estimulação do sistema nervoso central.

**Atenolol**




Nome químico: (RS)-2-[4-[2-hidroxi-3-(1-metiletilamino)propoxi]fenil]etanamida;

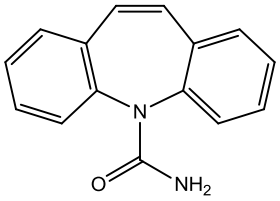
Classe terapêutica: anti hipertensivo; Fórmula molecular: $C_{14}H_{22}N_2O_3$;

Peso molecular: 266,34; Número CAS: 29122-68-7;

pKa: 9,6; Log Kow: 0,16;

β-bloqueador, amplamente usado como tratamento da hipertensão. Esta classe de fármacos é caracterizada pela ação seletiva bloqueando receptores do tipo beta-1. Além disto este fármaco é composto por uma mistura racêmica S(-)Atenolol e S(+)Atenolol, sendo que o S(-)Atenolol é responsável por atividade inotrópica negativa. O atenolol, assim como outros β-bloqueadores, não tem seu mecanismo elucidado.

**Carbamazepina**




Nome químico (IUPAC): 5H-Dibenzo[b,f]azepina-5-carboxamida;

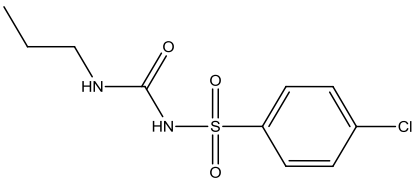
Classe terapêutica: antiepilético; Fórmula molecular: $C_{15}H_{12}N_2O$;

Peso molecular: 236,27; Número CAS: 298-46-4;

pKa: 15,9; Log Kow: 2,45;

Derivado da dibenzazepina atua estabilizando a membrana do nervo hiperexcitado, inibindo assim a descarga neuronal repetitiva e reduz a propagação sináptica dos impulsos excitatórios. Seu mecanismo de ação é pouco elucidado, considera-se que o principal mecanismo de ação deste é dado pelo bloqueio de canais de sódio voltagem dependente.

**Clorpropamida**




Nome químico (IUPAC): 1-[(4-clorobenzeno)sulfonil]-3-propilureia;

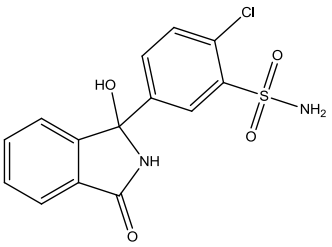
Classe terapêutica: hipoglicêmico; Fórmula molecular: $C_{10}H_{13}ClN_2O_3S$;

Peso molecular: 276,74; Número CAS: 94-20-2;

pKa: 5,1; Log Kow: 2,3;

Benzenosulfonamida, age aumentando a secreção ou exocitose de insulina pelo pâncreas, isto ocorre devido a este se ligar a canais de potássio sensíveis a ATP e reduzindo a condução de potássio pela membrana levando a despolarização. A despolarização leva ao estimulo do fluxo de cálcio para o interior da célula elevando a concentração deste na célula elevando a secreção de insulina.

**Clortalidona**




Nome químico (IUPAC): 2-cloro-5-(1-hidroxi-3-oxo-2,3-dihidro-1H-isoindol-1-il)benzeno-1-sulfonamida;

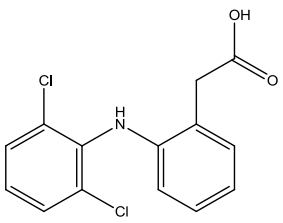
Classe terapêutica: diurético tiazidico; Fórmula molecular: $C_{14}H_{11}ClN_2O_4S$;

Peso molecular: 338,77; Número CAS: 77-36-1;

pKa: 8,6; Log Kow: 0,8;

Fármaco com ação diurética, este fármaco age na porção proximal do túbulo contornado distal, inibindo a reabsorção de NaCl e gerando reabsorção de cálcio, aumentado a liberação de sódio e água para o túbulo coletor cortical, e aumento de fluxo conduzindo a aumento de excreção de potássio e água.

**Diclofenaco**



Nome químico (IUPAC): 2-{2-[(2,6-diclorofenil)amino]fenil} ácido acético;

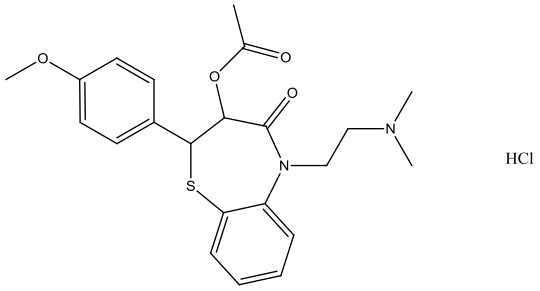
Classe terapêutica: AINE; Fórmula molecular: $C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$;

Peso molecular: 296,15; Número CAS: 15307-86-5;

pKa: 4,2; Log Kow: 4,5;

Fármaco com o mecanismo de ação definido pela inibição da biossíntese de prostaglandinas. Este fármaco tem sua aplicação em dor, febre e doenças reumáticas.

**Diltiazem, cloridrato**




Nome químico (IUPAC): (2S,3S)-5-[2-(dimetilamino)etil]-2-(4-metoxifenil)-4-oxo-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-3-il acetato;

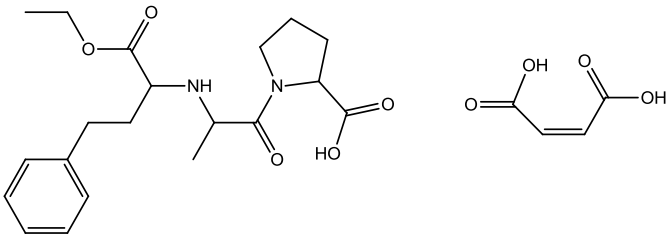
Classe terapêutica: anti-hipertensivo; Fórmula molecular: $C_{22}H_{26}N_2O_4S$ HCl;

Peso molecular: 450,97; Número CAS: 42399-41-7;

pKa: 12,8; Log Kow: 2,8;

Bloqueador de canais de cálcio, diminui a concentração de cálcio intracelular, no tecido vascular causa o relaxamento da musculatura lisa.

**Enalapril, maleato**




Nome químico (IUPAC): (2S)-1-[(2S)-2-{[(2S)-1-etoxi-1-oxo-4-fenilbutan-2-il]amino}propanoil]pirrolidina-2-ácido carboxílico;

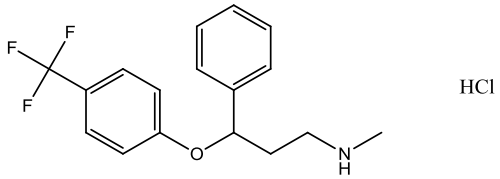
Classe terapêutica: anti-hipertensivo; Fórmula molecular: $C_{20}H_{28}N_2O_5$ $C_4H_4O_4$;

Peso molecular: 492,45; Número CAS: 75847-73-3;

pKa: 3,7; Log Kow: 0,1;

Anti-hipertensivo inibidor especifico da enzima conversora de angiotensina. Inibindo este enzima não há formação de angiotensina II, um potente vasoconstritor, que estimula a secreção de aldosterona.

**Fluoxetina, cloridrato**




Nome químico (IUPAC): metil({3-fenil-3-[4-(trifluorometil)fenoxi]propil})amina;

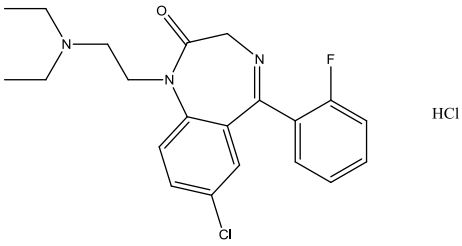
Classe terapêutica: antidepressivo; Fórmula molecular: $C_{17}H_{18}F_3NO$ HCl;

Peso molecular: 345,77; Número CAS: 54910-89-3;

pKa: 9,8; Log Kow: 4,0;

Inibidor seletivo da receptação de serotonina, seu mecanismo de ação é baseado na hipótese das aminas, onde a diminuição da atividade de amina, como a serotonina e a norepinefrina, resultam em depressão.

**Flurazepam, cloridrato**




Nome químico (IUPAC): 7-cloro-1-[2-(dietilamino)etil]-5-(2-fluorofenil)-2,3-dihidro-1H-1,4-benzodiazepin-2-ona;

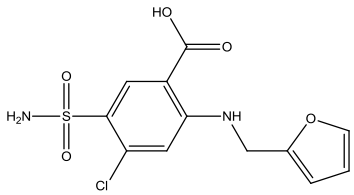
Classe terapêutica: distúrbio do sono; Fórmula molecular: $C_{21}H_{23}ClFN_3O$ HCl;

Peso molecular: 424,33; Número CAS: 17617-23-1;

pKa: 9,8; Log Kow: 4,0;

Derivado da benzodiazepina, agente hipnótico, aumenta o tempo de sono. Flurazepam atua em receptores GABA-A, estes são responsáveis por abrir os canais de cloro no receptor, levando a aumento do fluxo de cloro e consequente hiperpolarização celular.

**Furosemida**




Nome químico (IUPAC): 4-cloro-2-[(furan-2-ilmetil)amino]-5-ácido sulfamoilbenzoico;

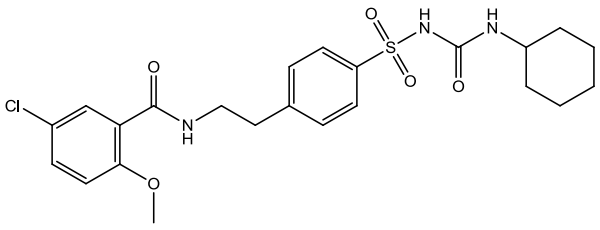
Classe terapêutica: diurético; Fórmula molecular: $C_{12}H_{11}ClN_2O_5S$;

Peso molecular: 330,74; Número CAS: 54-31-9;

pKa: 4,2; Log Kow: 2,0;

Diurético usado para hipertensão, este inibe a reabsorção de água por bloqueio dos co-transportadores de sódio-potássio-cloro na alça de Henle, com isto há alteração da osmose, do interstício e lúmen, para reabsorção de água pelo nefron.

**Glibenclamida**




Nome químico (IUPAC): 5-cloro-N-[2-(4-{[(ciclohexilcarbamoil)amino]sulfonil}vfenil)etil]-2-metoxibenzamida;

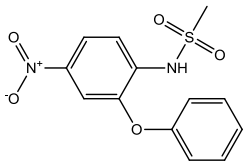
Classe terapêutica: hipoglicêmico; Fórmula molecular: $C_{23}H_{28}ClN_3O_5S$;

Peso molecular: 494,00; Número CAS: 10238-21-8;

pKa: 4,3; Log Kow: 4,7;

Fármaco com ação hipoglicemiante, do grupo das sulfonilureias, atua estimulando as células β do pâncreas, tais células são responsáveis pela produção de insulina, levando ao aumento da produção de insulina e consequente normalização do metabolismo de carboidratos.

**Nimesulida**



Nome químico (IUPAC): N-(4-nitro-2-fenoxifenil)metanosulfonamida;

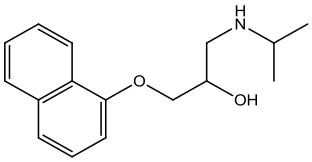
Classe terapêutica: AINE; Fórmula molecular: $C_{13}H_{12}N_2O_5S$;

Peso molecular: 308,31; Número CAS: 51803-78-2;

pKa: 6,7; Log Kow: 2,6;

AINE com mecanismo de ação envolvendo diversos mediadores do processo inflamatório, como ciclo-oxigenase-2 (COX-2) mediada pro prostaglandina, radicais livres, enzimas proteolíticas e histamina.

**Propranolol**



Nome químico (IUPAC): [2-hidroxi-3-(naftalen-1-iloxi)propil](propan-2-il)amina;

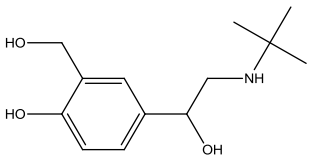
Classe terapêutica: anti-hipertensivo; Fórmula molecular: $C_{16}H_{21}NO_2$;

Peso molecular: 259,34; Número CAS: 525-66-6;

pKa: 9,4; Log Kow: 3,5;

O mecanismo de ação deste fármaco é pouco elucidado, podendo estar associado a diminuição do débito cardíaco, inibição de secreção de renina pelo sistema renal e diminuição do tônus simpático dos centros motores do cérebro. Propranolol também atua reduzindo a enxaqueca, possivelmente devido a receptores β-adrenérgicos presentes na pia-máter do cérebro.

**Salbutamol**



Nome químico (IUPAC): 4-[2-(tert-butilamino)-1-hidroxietil]-2-(hidroximetil)fenol;

Classe terapêutica: tratamento da asma; Fórmula molecular: $C_{13}H_{21}NO_3$;

Peso molecular: 239,31; Número CAS: 18559-94-9;

pKa: 10,3; Log Kow: 1,4;

Broncodilatador que atua de forma agonista em receptores β2-adrenérgicos da musculatura dos pulmões. Os receptores β2-adrenérgicos do pulmão quando sofrem ação agonista fazem com que ocorra o relaxamento da musculatura facilitando a respiração em casos de asma.

# APÊNDICE A

**Tabela 20.** Variáveis analisadas no Planejamento Fatorial Fracionado $2^{5-1}$ e respostas obtidas para cada analito em cada tratamento.

| Tratamento | Variáveis Analisadas | | | | | Analitos | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | A (g) | B (g) | C (g) | D (mL) | E (0/50) | Amitriptilina | Atenolol | Carbamazepina | Clorpropamida | Clortalidona | Diclofenaco | Diltiazem | Enalapril |
| 1 | -1 (0,5) | -1 (0,5) | -1 (0,5) | -1 (5) | -1 (0) | 20.167.979 | 4.235.612 | 36.780.921 | 6.098.950 | 718.329 | 1.386.371 | 566.935.750 | 17.183.710 |
| 2 | 1 (1,5) | -1 (0,5) | -1 (0,5) | -1 (5) | 1 (50) | 16.442.854 | 2.775.103 | 33.437.684 | 4.295.072 | 605.994 | 740.801 | 537.804.188 | 16.567.168 |
| 3 | -1 (0,5) | 1 (1,5) | -1 (0,5) | -1 (5) | 1 (50) | 21.263.531 | 4.650.690 | 36.973.526 | 6.177.195 | 779.916 | 1.426.010 | 621.691.521 | 18.430.942 |
| 4 | 1 (1,5) | 1 (1,5) | -1 (0,5) | -1 (5) | -1 (0) | 18.058.618 | 2.564.806 | 31.084.503 | 4.826.807 | 630.498 | 824.023 | 576.162.417 | 16.726.667 |
| 5 | -1 (0,5) | -1 (0,5) | 1 (1,5) | -1 (5) | 1 (50) | 22.656.882 | 4.555.012 | 35.715.272 | 6.288.804 | 784.169 | 1.629.803 | 661.530.063 | 18.779.216 |
| 6 | 1 (1,5) | -1 (0,5) | 1 (1,5) | -1 (5) | -1 (0) | 16.877.767 | 3.132.380 | 32.544.814 | 4.112.731 | 663.985 | 845.434 | 586.176.042 | 16.847.768 |
| 7 | -1 (0,5) | 1 (1,5) | 1 (1,5) | -1 (5) | -1 (0) | 21.213.907 | 4.550.082 | 32.022.518 | 6.548.977 | 764.483 | 1.500.000 | 640.829.188 | 17.981.978 |
| 8 | 1 (1,5) | 1 (1,5) | 1 (1,5) | -1 (5) | 1 (50) | 17.662.120 | 2.596.281 | 31.374.367 | 4.227.663 | 569.752 | 782.917 | 553.145.146 | 15.581.943 |
| 9 | -1 (0,5) | -1 (0,5) | -1 (0,5) | 1 (15) | -1 (0) | 24.006.350 | 7.885.390 | 31.865.858 | 7.990.282 | 840.788 | 2.064.067 | 680.336.000 | 17.595.612 |
| 10 | 1 (1,5) | -1 (0,5) | -1 (0,5) | 1 (15) | 1 (50) | 21.955.140 | 4.783.935 | 34.722.264 | 6.457.239 | 765.129 | 1.248.730 | 650.765.667 | 19.068.066 |
| 11 | -1 (0,5) | 1 (1,5) | -1 (0,5) | 1 (15) | 1 (50) | 21.005.410 | 6.751.624 | 29.939.977 | 7.014.416 | 682.197 | 2.012.831 | 603.259.292 | 15.286.596 |
| 12 | 1 (1,5) | 1 (1,5) | -1 (0,5) | 1 (15) | -1 (0) | 22.981.341 | 4.939.420 | 37.417.321 | 6.375.273 | 742.844 | 1.357.617 | 666.413.729 | 18.932.818 |
| 13 | -1 (0,5) | -1 (0,5) | 1 (1,5) | 1 (15) | 1 (50) | 21.897.338 | 7.460.546 | 28.638.780 | 7.478.800 | 784.241 | 2.231.824 | 661.937.063 | 16.794.154 |
| 14 | 1 (1,5) | -1 (0,5) | 1 (1,5) | 1 (15) | -1 (0) | 19.801.753 | 4.988.117 | 31.243.467 | 6.381.912 | 712.570 | 1.242.657 | 637.909.313 | 17.534.029 |
| 15 | -1 (0,5) | 1 (1,5) | 1 (1,5) | 1 (15) | -1 (0) | 20.424.765 | 6.901.641 | 31.205.363 | 7.496.661 | 769.708 | 1.579.940 | 644.641.542 | 14.973.510 |
| 16 | 1 (1,5) | 1 (1,5) | 1 (1,5) | 1 (15) | 1 (50) | 17.799.109 | 5.161.739 | 35.025.126 | 6.618.779 | 768.097 | 1.310.360 | 607.157.605 | 16.912.431 |
| 17 | 0 (1,0) | 0 (1,0) | 0 (1,0) | 0 (10) | 0 (0) | 18.257.708 | 4.615.419 | 32.607.357 | 6.365.550 | 727.359 | 1.019.721 | 577.505.833 | 15.940.086 |
| 18 | 0 (1,0) | 0 (1,0) | 0 (1,0) | 0 (10) | 0 (0) | 18.562.236 | 5.027.698 | 39.183.142 | 7.095.461 | 719.767 | 1.334.375 | 612.981.479 | 18.673.595 |
| 19 | 0 (1,0) | 0 (1,0) | 0 (1,0) | 0 (10) | 0 (0) | 21.999.520 | 5.294.248 | 35.057.740 | 7.374.729 | 814.418 | 1.098.473 | 643.265.708 | 17.482.863 |
| 20 | 0 (1,0) | 0 (1,0) | 0 (1,0) | 0 (10) | 0 (50) | 21.375.267 | 5.069.645 | 34.563.219 | 6.820.510 | 722.850 | 1.355.751 | 622.297.563 | 16.971.631 |
| 21 | 0 (1,0) | 0 (1,0) | 0 (1,0) | 0 (10) | 0 (50) | 21.362.333 | 5.447.037 | 36.557.773 | 7.525.686 | 778.603 | 1.166.881 | 670.410.250 | 17.699.855 |
| 22 | 0 (1,0) | 0 (1,0) | 0 (1,0) | 0 (10) | 0 (50) | 19.797.957 | 4.797.776 | 34.172.024 | 7.191.114 | 732.826 | 1.179.480 | 622.363.771 | 16.531.394 |

**Tabela 20.** Variáveis analisadas no Planejamento Fatorial Fracionado 25-1 e respostas obtidas para cada analito em cada tratamento (continuação)

| Tratamento | Variáveis Analisadas | | | | | Analitos | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | A (g) | B (g) | C (g) | D (mL) | E (0/50) | Fluoxetina | Flurazepam | Furosemida | Glibenclamida | Nimesulida | Propranolol | Salbutamol |
| 1 | -1 (0,5) | -1 (0,5) | -1 (0,5) | -1 (5) | -1 (0) | 1.967.858 | 41.988.319 | 2.534.677 | 16.379.761 | 6.882.248 | 33.382.266 | 11.504.730 |
| 2 | 1 (1,5) | -1 (0,5) | -1 (0,5) | -1 (5) | 1 (50) | 1.533.328 | 40.578.560 | 1.394.474 | 11.237.953 | 5.990.766 | 30.978.889 | 7.633.032 |
| 3 | -1 (0,5) | 1 (1,5) | -1 (0,5) | -1 (5) | 1 (50) | 2.008.878 | 45.145.715 | 2.128.516 | 17.429.028 | 8.342.343 | 37.789.596 | 13.377.869 |
| 4 | 1 (1,5) | 1 (1,5) | -1 (0,5) | -1 (5) | -1 (0) | 2.034.829 | 40.864.571 | 1.569.823 | 10.680.777 | 7.125.844 | 31.932.571 | 7.582.084 |
| 5 | -1 (0,5) | -1 (0,5) | 1 (1,5) | -1 (5) | 1 (50) | 1.673.958 | 47.152.979 | 2.148.335 | 17.856.041 | 9.460.421 | 37.569.660 | 14.357.764 |
| 6 | 1 (1,5) | -1 (0,5) | 1 (1,5) | -1 (5) | -1 (0) | 1.877.710 | 39.285.884 | 1.354.183 | 12.537.761 | 7.303.594 | 31.882.620 | 8.841.966 |
| 7 | -1 (0,5) | 1 (1,5) | 1 (1,5) | -1 (5) | -1 (0) | 2.827.613 | 46.436.050 | 2.555.834 | 17.719.042 | 10.993.104 | 39.604.374 | 13.217.394 |
| 8 | 1 (1,5) | 1 (1,5) | 1 (1,5) | -1 (5) | 1 (50) | 1.322.159 | 37.870.275 | 1.254.878 | 11.748.995 | 7.310.181 | 30.531.107 | 7.732.385 |
| 9 | -1 (0,5) | -1 (0,5) | -1 (0,5) | 1 (15) | -1 (0) | 2.373.658 | 47.004.173 | 3.281.599 | 20.450.534 | 14.575.836 | 42.531.628 | 22.905.990 |
| 10 | 1 (1,5) | -1 (0,5) | -1 (0,5) | 1 (15) | 1 (50) | 2.406.873 | 46.188.214 | 2.293.629 | 16.861.588 | 10.890.985 | 38.544.835 | 13.553.785 |
| 11 | -1 (0,5) | 1 (1,5) | -1 (0,5) | 1 (15) | 1 (50) | 2.290.573 | 42.229.454 | 2.420.243 | 17.727.705 | 12.661.888 | 37.004.167 | 19.902.383 |
| 12 | 1 (1,5) | 1 (1,5) | -1 (0,5) | 1 (15) | -1 (0) | 1.645.308 | 48.334.302 | 2.064.409 | 17.189.907 | 10.470.518 | 39.266.356 | 13.405.676 |
| 13 | -1 (0,5) | -1 (0,5) | 1 (1,5) | 1 (15) | 1 (50) | 2.638.199 | 46.451.125 | 2.792.107 | 19.608.325 | 11.942.582 | 40.532.414 | 21.950.395 |
| 14 | 1 (1,5) | -1 (0,5) | 1 (1,5) | 1 (15) | -1 (0) | 2.065.667 | 47.225.581 | 2.460.451 | 17.241.692 | 11.217.303 | 39.150.109 | 14.943.575 |
| 15 | -1 (0,5) | 1 (1,5) | 1 (1,5) | 1 (15) | -1 (0) | 2.230.666 | 47.689.897 | 2.641.354 | 17.518.839 | 12.670.738 | 39.703.073 | 20.351.249 |
| 16 | 1 (1,5) | 1 (1,5) | 1 (1,5) | 1 (15) | 1 (50) | 2.210.123 | 46.399.161 | 2.246.867 | 17.194.623 | 11.594.146 | 38.627.641 | 14.306.899 |
| 17 | 0 (1,0) | 0 (1,0) | 0 (1,0) | 0 (10) | 0 (0) | 2.449.414 | 44.503.584 | 2.233.244 | 15.621.517 | 12.268.447 | 38.025.801 | 13.289.780 |
| 18 | 0 (1,0) | 0 (1,0) | 0 (1,0) | 0 (10) | 0 (0) | 2.193.023 | 48.945.857 | 2.241.823 | 17.944.702 | 10.826.986 | 40.234.055 | 13.739.197 |
| 19 | 0 (1,0) | 0 (1,0) | 0 (1,0) | 0 (10) | 0 (0) | 3.037.238 | 50.004.882 | 2.570.599 | 16.806.782 | 14.278.299 | 42.499.662 | 15.024.036 |
| 20 | 0 (1,0) | 0 (1,0) | 0 (1,0) | 0 (10) | 0 (50) | 1.546.010 | 46.512.123 | 2.297.627 | 17.095.314 | 11.689.746 | 40.479.483 | 15.072.991 |
| 21 | 0 (1,0) | 0 (1,0) | 0 (1,0) | 0 (10) | 0 (50) | 2.417.471 | 52.507.811 | 2.809.598 | 16.234.612 | 13.346.055 | 43.706.871 | 15.443.940 |
| 22 | 0 (1,0) | 0 (1,0) | 0 (1,0) | 0 (10) | 0 (50) | 1.942.226 | 49.628.660 | 2.517.653 | 15.553.068 | 11.580.912 | 40.542.505 | 14.476.580 |

A = massa de amostra; B = massa de terra diatomácea; C = massa de $Na_2SO_4$; D = volume de MeOH; E = limpeza com 50mg de C18.

# APÊNDICE B

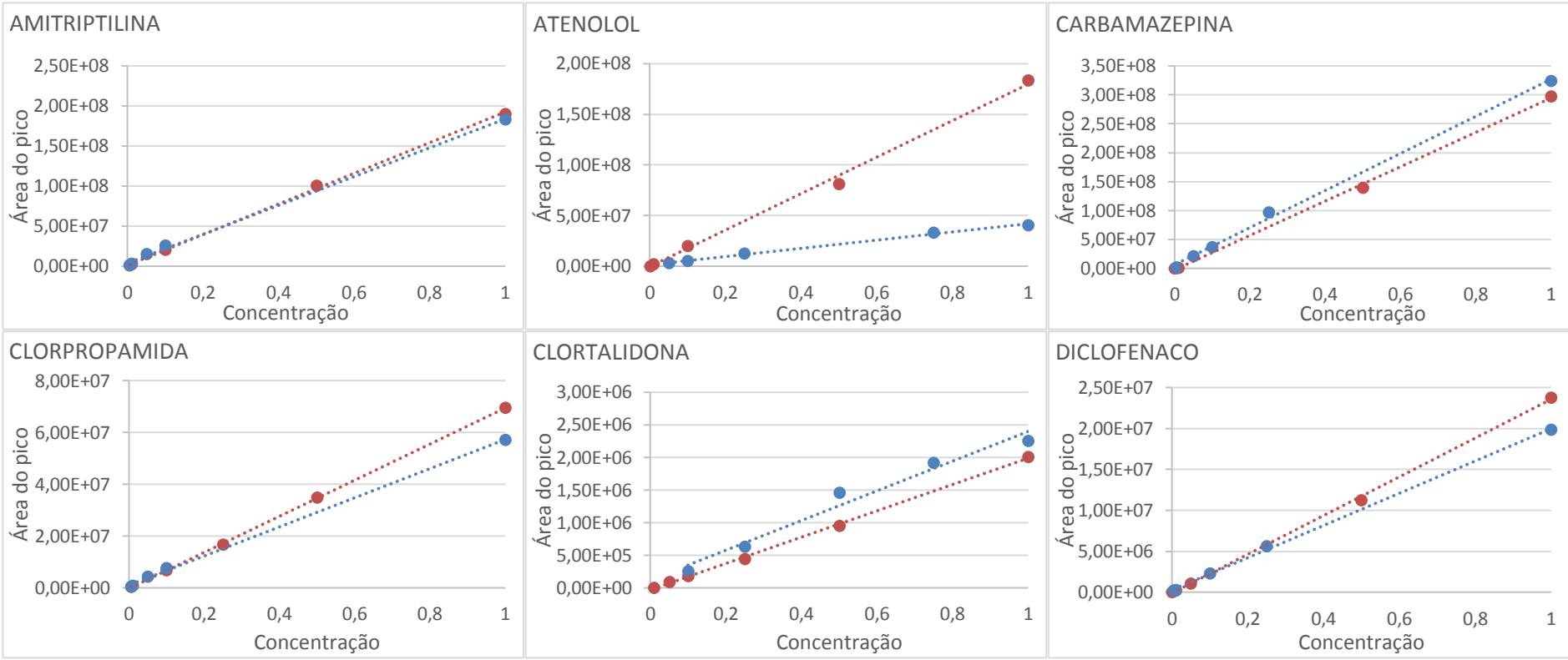



**Figura 16.** Superposição das curvas analíticas no solvente e no extrato demonstrando o efeito matriz ao longo das curvas analíticas. Curvas e pontos em vermelho indicam curva no solvente e curvas e pontos em azul indicam curva no extrato

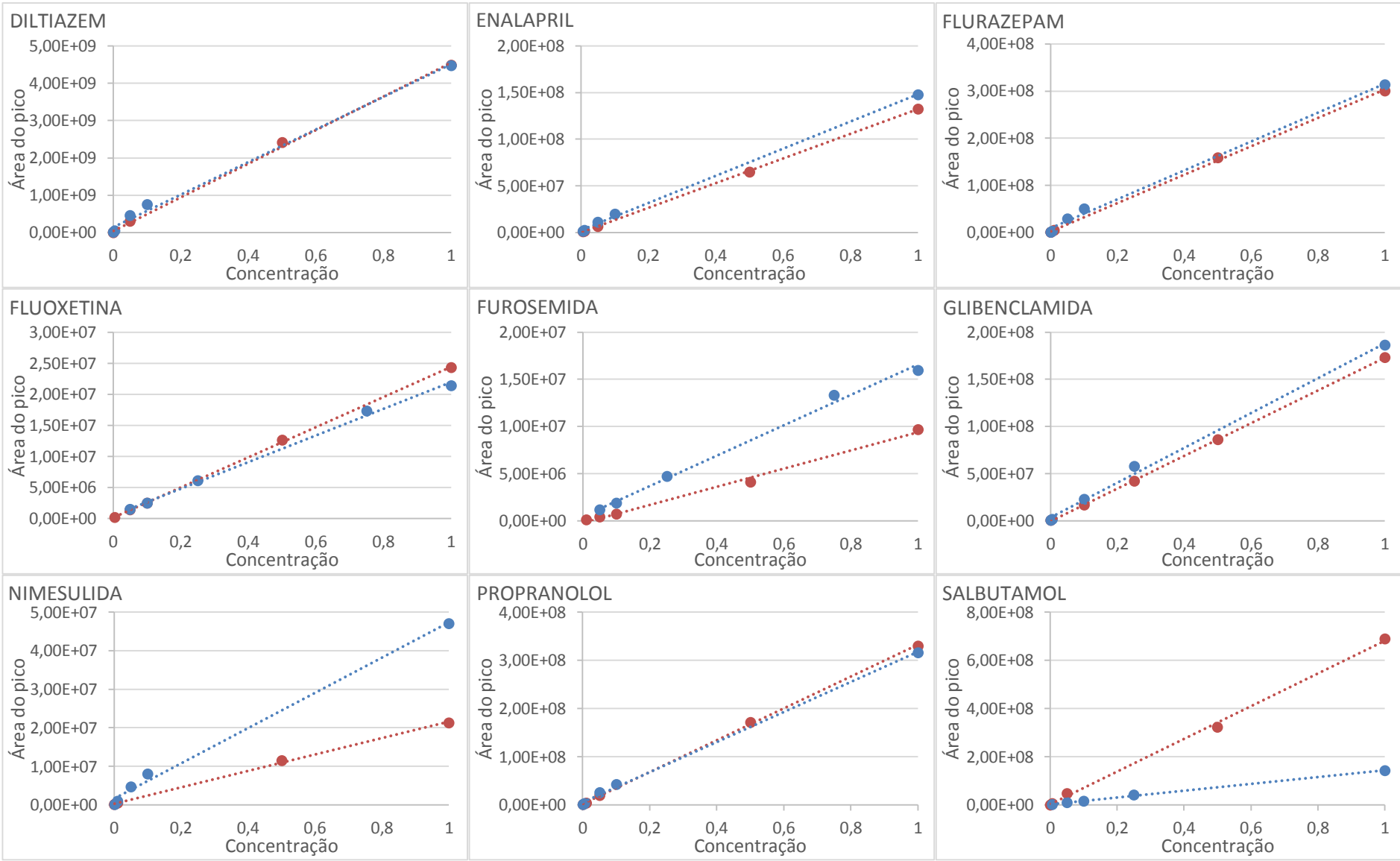



**Figura 17.** Superposição das curvas analíticas no solvente e no extrato demonstrando o efeito matriz ao longo das curvas analíticas. (cont.)