

APLICAÇÕES DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA PARA O ESTUDO DE POLUENTES ORGÂNICOS EMERGENTES

Carla Grazieli Azevedo da Silva e Carol H. Collins*

Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, 13083-970 Campinas - SP, Brasil

Recebido em 12/7/10; aceito em 13/10/10; publicado na web em 18/2/11

APPLICATIONS OF HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY FOR THE STUDY OF EMERGING ORGANIC POLLUTANTS. Emerging organic pollutants (EOP) include many environmental contaminants based on commercial products such as pharmaceuticals, personal care products, detergents, gasoline, polymers, etc. EOP may be candidates for future regulation as they offer potential risk to environmental and human health due to their continual entrance into the environment and to the fact that even the most modern wastewater treatment plants are not able to totally transform / remove these compounds. High performance liquid chromatography is recommended to separate emerging organic pollutants with characteristics of high polarity and low volatility, especially pharmaceuticals, from environmental matrices.

Keywords: emerging organic pollutants; high performance liquid chromatography; environmental contaminants.

INTRODUÇÃO

Produtos químicos são amplamente utilizados na sociedade moderna, sendo produzidos mundialmente em larga escala para as mais variadas aplicações. No entanto, uma das desvantagens da produção e utilização destes está nos resíduos que são gerados, sejam eles derivados diretamente das atividades industriais ou produzidos após seu consumo pela sociedade, que podem impactar de forma negativa o meio ambiente.¹

Ao longo dos últimos anos, agências ambientais regulatórias dos países desenvolvidos vêm tentando estabelecer procedimentos de caracterização e controle de substâncias prejudiciais ao meio ambiente e mais especificamente à saúde humana.² Os chamados poluentes orgânicos, como o agrotóxico DDT (diclorodifeniltricloroetano), são um tópico de grande destaque dentro da ciência e tecnologia ambiental, sendo determinados desde os anos 70 em baixas concentrações nas matrizes ambientais.^{3,4}

Atualmente a Agência de Proteção Ambiental dos E.U.A. (USEPA, *United States Environmental Protection Agency*) apresenta uma lista com mais de 120 poluentes prioritários⁵ e a Comissão Europeia sobre Meio Ambiente (*European Commission for Environment*) designa 132 compostos perigosos ao meio ambiente^{2,6} sendo 12 deles classificados como as mais tóxicas substâncias conhecidas, os chamados poluentes orgânicos persistentes (POP).

POLUENTES ORGÂNICOS EMERGENTES

Poluentes orgânicos emergentes (POE) ou simplesmente contaminantes emergentes referem-se a qualquer composto químico presente numa variedade de produtos comerciais como medicamentos, produtos de uso veterinário, embalagens de alimentos, produtos de higiene, agrotóxicos, etc., ou ainda qualquer micro-organismo, que podem ser encontrados em matrizes ambientais e biológicas, que não são usualmente monitorados ou que ainda não possuem legislação regulatória correspondente, mas que apresentam risco potencial à saúde

humana e ao meio ambiente.^{7,8} Como risco potencial à saúde humana e ao meio ambiente pode-se citar a disfunção no sistema endócrino e reprodutivo de seres humanos e dos animais, abortos espontâneos, distúrbios metabólicos e incidência de neoplasias malignas, além da indução de bactérias mais resistentes.⁹⁻¹³ Ao contrário dos POP, não necessitam ser persistentes para causar efeitos negativos devido à entrada contínua desses compostos no meio ambiente, como resultado de processos industriais, descarte de produtos comerciais ou ainda por sua excreção na forma não metabolizada ou metabolizada, sendo lançados diretamente nos corpos d'água ou na rede de esgotos. Também podem ser descartados no solo e sedimentos, o que leva à contaminação de mananciais superficiais por escoamento e aquíferos por infiltração.¹⁴⁻¹⁶

A Tabela 1 traz a listagem das principais classes de poluentes orgânicos emergentes.

O grande progresso na instrumentação analítica nos últimos anos e o desenvolvimento de técnicas de extração mais robustas possibilitaram a detecção e identificação de novos compostos em faixas de concentração mais baixas, contribuindo, assim, para o melhor entendimento do problema de contaminação do meio ambiente.^{8,17} Dessa forma POE têm sido determinados nas mais variadas matrizes ambientais como águas, efluentes industriais, solos, sedimentos, emissões gasosas, amostras biológicas (urina, sangue, leite, saliva, tecidos, etc), alimentos e até ovos de pássaros,¹⁸ sendo que as matrizes aquosas são as mais analisadas.¹⁹⁻²¹ Os analitos que mais têm chamado a atenção da comunidade científica e, por isso, são os mais estudados, são os princípios ativos de fármacos, substâncias classificadas como interferentes endócrinos e substâncias contidas em produtos de higiene pessoal, devido ao fato de que até as mais modernas estações de tratamento de água e efluentes não apresentam processos de tratamento capazes de degradá-los ou eliminá-los completamente, principalmente os POE que apresentam alta solubilidade em água ou são pouco degradáveis, como fármacos polares.^{11,12,16}

CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA APLICADA AO ESTUDO DOS POE

As separações em química ambiental geralmente envolvem as duas técnicas cromatográficas mais conhecidas: a cromatografia

*e-mail: chc@iqm.unicamp.br

Tabela 1. Principais classes de poluentes orgânicos emergentes^{11,12,14}

Classe	Exemplos
Produtos farmacêuticos	
Antibióticos (uso humano ou veterinário)	clorotetraciclina, eritromicina, sulfametoxazol, lincomicina, trimetoprim
Analgésicos e anti-inflamatórios	ácido acetilsalicílico, diclofenaco, paracetamol, cetoprofeno, acetaminofeno, ibuprofeno
Drogas de uso psiquiátrico	diazepam, fluoxetina, carbamazepina, paroxetina
Reguladores lipídicos e seus metabólitos	benzafibrato, ácido clofibrico, ácido fenofibrico
β-Bloqueadores	atenolol, propranolol, metoprolol, betaxolol
Meio de contrastes de raio-X	iopamidol, diatrizoato, Iopromida, Iomeprol
Contraceptivos	etinilestradiol, desogestrel, mestranol
Produtos de higiene pessoal	
Fragrâncias	almíscaras nitrados, policíclicos e macrocíclicos
Protetores solares	benzofenonas, parabenos
Repelentes de insetos	N, N-dietiltoluamida
Antissépticos	triclosano, clorofeno
Interferentes endócrinos	
Retardantes de chama	difenil éteres polibromados (PBDE)
Aditivos industriais	ácido etilendiaminotetra-acético (EDTA), ácido nitriloacético (NTA)
Surfactantes (não iônicos)	alquilfenóis lineares, carboxilados (SPC) e etoxilados (APEO), compostos perfluorados
Aditivos de gasolina	metil- <i>t</i> -butil éter (MTBE)
Inibidores de corrosão	benzotriazóis, benzotiazóis
Hormônios naturais	17β-estradiol, progesterona, testosterona, estrona
Agrotóxicos	atrazina, clordano, dieldrin, hexaclorobenzeno
Hidrocarbonetos poliaromáticos (PAH)	benzo[<i>a</i>]pireno, fluoranteno, antraceno, naftaleno
Bifenilas policloradas (PCB)	3,3',4,4'- tetraclorobifenil (PCB 77), 3,4,4',5-tetraclorobifenil (PCB 81)
Ftalatos	dietilftalato, dibutilftalato
Dioxinas e Furanos	2,3,7,8-tetracloro- <i>p</i> -dioxina (2,3,7,8-TCDD)
Drogas de abuso	
	anfetaminas, cocaína, tetra-hidrocanabinol, 3,4- metileno-dioximetanfetamina (MDMA)

líquida de alta eficiência (HPLC, *high performance liquid chromatography*) e a cromatografia gasosa (GC, *gas chromatography*).

Diagramas de polaridade-volatilidade podem esquematizar de forma didática qual a técnica de separação a ser utilizada, dividindo os poluentes orgânicos de acordo com suas propriedades físico-químicas de volatilidade e polaridade.²² A Figura 1 pode ser interpretada da seguinte forma: poluentes voláteis e semivoláteis, não polares/lipofílicos são frequentemente separados por cromatografia gasosa. As separações por cromatografia gasosa podem utilizar detectores universais como detector de ionização por chama (FID, *flame ionization*

detector) ou ainda detectores de maior detectabilidade e seletividade, como o detector por captura de elétrons (ECD, *electron capture detector*) ou detector de nitrogênio e fósforo (NPD, *nitrogen-phosphorus detector*).²² A detecção utilizando espectrômetro de massas (MSD, *mass selective detector*) e ionização por impacto de elétrons tornou-se a mais utilizada, devido aos excelentes limites de detecção e às possibilidades de utilização de softwares de tratamento de dados com bibliotecas contendo milhares de espectros de massas para confirmação das estruturas dos compostos analisados. Este vem sendo o detector mais utilizado para determinação de poluentes orgânicos voláteis ou semivoláteis por GC.²³

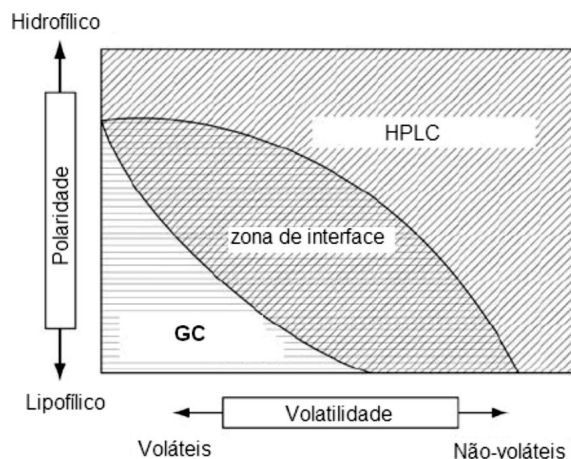


Figura 1. Faixa de aplicação da HPLC e GC para determinação de poluentes orgânicos emergentes baseados em suas propriedades físico-químicas de polaridade e volatilidade. Adaptado da ref. 22

Métodos baseados na HPLC são adequados para uma variedade de compostos orgânicos que apresentam polaridade mais alta e volatilidade mais baixa ou ainda elevada instabilidade térmica, características de alguns POE,^{22,24} o que pode ser visto através da Figura 2.

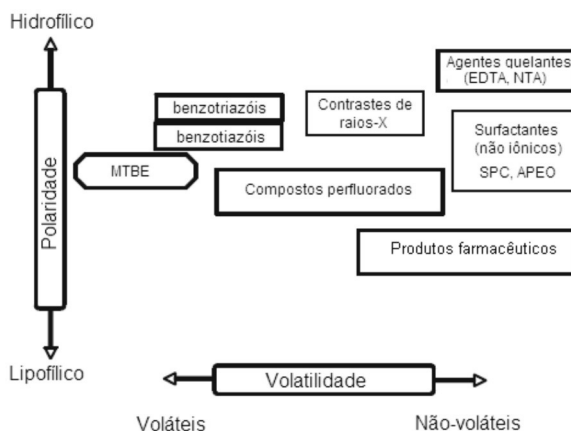


Figura 2. Posição de alguns dos poluentes orgânicos emergentes no diagrama de polaridade volatilidade. Adaptado da ref. 22

Propriedades físico-químicas dos analitos

O conhecimento das propriedades físico-químicas dos analitos é de extrema importância para evitar problemas na quantificação, que podem estar relacionados com reações secundárias, com impurezas ou degradações na sua estrutura durante a aplicação do método analítico. Por exemplo, os antibióticos tetraciclinas podem interagir de forma irreversível com os íons metálicos residuais presentes nos

sorventes dos cartuchos de extração em fase sólida à base de sílica modificada com grupos alquila (C_{18} , C_8 , etc) e certos metais podem catalisar a abertura do anel de β -lactamas. Esse problema pode ser resolvido adicionando-se um agente quelante à matriz a ser extraída (Na_2EDTA , por exemplo), ou substituindo o sorvente dos cartuchos por material polimérico.²⁵

A solubilidade dos analitos na amostra ambiental e no solvente de eluição, assim como na fase móvel a ser utilizada, também merece atenção. Por exemplo, alguns antibióticos formam complexos lipofílicos insolúveis em água quando na presença de cátions de metais alcalinos. Além disso, os padrões das penicilinas sofrem metanólise, quando solubilizados em metanol, devendo ser preparados em acetonitrila ou em outro solvente compatível.²⁵

Durante a etapa de detecção, quando se utiliza um espectrômetro de massas (MS), pode ocorrer algum tipo de fragmentação característica do analito, dependendo da faixa de pH que se encontra. Por exemplo, a eritromicina em solução ácida apresenta uma perda de massa de 18 Da, correspondente à perda de uma molécula de água.²⁵

Um dos parâmetros críticos a serem observados durante a determinação dos POE, principalmente fármacos, é o que se refere ao pH da amostra pois, em muitos casos, o pH do meio determina a forma química do analito em solução e, conseqüentemente, interfere na eficiência da extração. Por exemplo, o baixo percentual de recuperação do processo de extração de quinolonas foi melhorado após acidificação da solução em pH 2,5. No entanto, é importante escolher uma faixa de pH onde também não ocorra degradação dos analitos.²⁵

POE com características ácidas, como analgésicos e anti-inflamatórios não esteroidais (diclofenaco, naproxeno, ácido acetilsalicílico, etc.) ou básicas, como fármacos de uso psiquiátrico (fluoxetina, carbamazepina, etc.) ou analgésicos (morfina, codeína, etc.), necessitam do ajuste do pH da fase móvel, onde seu valor depende do pKa dos compostos a serem analisados.¹⁶ A concentração de tampão recomendada fica na faixa entre 2-20 mmol L^{-1} para evitar problemas de solubilidade na fase móvel, bem como facilitar o modo de ionização quando se utiliza o detector MS.¹⁶

Métodos de extração, limpeza e concentração dos analitos

A etapa de extração, limpeza (*clean-up*) e concentração é uma das mais importantes quando se realiza a determinação de POE, uma vez que as concentrações desses analitos nas matrizes ambientais ou biológicas complexas são baixas, podendo chegar até ng L^{-1} .¹⁶

A extração em fase sólida (SPE, *solid phase extraction*) é atualmente a técnica mais empregada para amostras líquidas, como matrizes de águas superficiais e efluentes.^{16,25} Os materiais sorventes dependem das características de acidez dos compostos analisados. Para antibióticos, medicamentos antifúngicos e antiparasitários de uso humano e veterinário, os materiais sorventes mais utilizados são os cartuchos com sorvente de copolímero divinilbenzeno e N-vinilpirrolidona que, por apresentarem características de interação mista hidrofílica-lipofílica, podem extrair analitos de média a alta polaridade, apresentando os melhores percentuais de recuperação.²⁶ Para extração de analitos com características mais básicas, como fármacos de uso psiquiátrico (por exemplo, fluoxetina, sertralina, etc.) e β -bloqueadores (por exemplo, propranolol, metoprolol, etc.) podem ser utilizados sorventes de copolímero divinilbenzeno e N-vinilpirrolidona modificados com grupos sulfonato, para troca catiônica. Para analitos com características ácidas, como fármacos da classe dos anti-inflamatórios não esteroidais (por exemplo, diclofenaco, naproxeno, etc.) podem ser utilizados sorventes com grupos dimetilbutilamina, capazes de realizar troca aniônica, ou à base de sílica modificada com C_{18} .¹⁶ Uma alternativa é a utilização de cartuchos em série, como utilizados na extração de 15 fármacos

com características distintas de acidez (básicos, neutros e ácidos)²⁷ ou na determinação de antibióticos da família das β -lactamas em amostras de alimentos de origem animal.²⁸ Para eluição dos analitos, são utilizados solventes com características polares, como acetona, metanol, acetonitrila e acetato de etila.^{16, 25, 26}

A extração em fase sólida em linha (*on-line solid-phase extraction*) aparece como um procedimento promissor devido às vantagens desse tipo de extração, principalmente devido à pequena manipulação de amostra em função da automação do processo extrativo, o que reduz os riscos de contaminação e o tempo de análise.^{22,29}

A microextração em fase sólida (SPME, *solid phase micro-extraction*) inicialmente foi utilizada para separações por GC. No entanto, essa técnica de extração pode ser aplicada também à HPLC, devido às vantagens que apresenta, como alto poder de concentração dos analitos sem a necessidade do uso de solventes, sendo utilizada para determinação de antibióticos em amostras de leite e anti-inflamatórios esteroidais em urina.³⁰

A microextração em fase líquida com a utilização de membranas de polipropileno (LPME, *liquid-phase microextraction*) é aplicada a amostras aquosas, oferecendo como vantagem a possibilidade de se utilizar uma pequena quantidade de amostra e de solvente extrator. Na LPME, analitos com elevado coeficiente de partição podem atingir elevados fatores de concentração, uma vez que são transferidos por difusão de um volume de amostra, da ordem de 1-5 mL, para um diminuto volume de extrato (5-50 μL).³¹ Nesse sentido, pode-se variar a relação de volume de amostra e solvente extrator de forma a se obter fatores de concentração desejáveis, de modo que fatores de concentração de 25000 vezes já foram obtidos a partir da LPME, utilizando membranas de polipropileno de 28 cm de comprimento, na determinação de fármacos antidepressivos em amostras de águas.³²

Para matrizes sólidas e semissólidas, como material biológico (tecidos) e alimentos, a extração por dispersão de matriz em fase sólida (MSPD, *matrix solid phase dispersion*) tem sido utilizada. Analitos presentes em tecido animal ou vegetal podem ser extraídos utilizando sílica com fases ligadas modificadas com grupos alquila (C_8 , C_{18}) ou à base de silicato de magnésio, principalmente para a extração de analitos de baixa polaridade, como bifenilas policloradas (PCB), bifenilas polibromadas (PBB) e hidrocarbonetos poliaromáticos (PAH).³³ Para material sedimentar (lodo de estação de tratamento de efluentes, solos, sedimentos de rio, lagos, etc.), a extração líquido/sólido pode utilizar o extrator Soxhlet ou a extração por líquido pressurizado (PLE, *pressurized liquid extraction*), sendo que a extração por líquido pressurizado, combinada ao pré-tratamento das amostras por liofilização, apresentou maior eficiência na extração de fármacos polares em amostras de lodo de uma estação de tratamento de efluentes na Alemanha.³⁴

A extração sortiva em barra de agitação (SBSE, *stir-bar sorptive extraction*), utilizando uma barra de agitação magnética revestida com polidimetilsiloxano (PDMS), o qual é a fase extratora, apresenta detectabilidade analítica de 50 até 250 vezes maior que SPME, uma vez que são utilizados volumes de revestimentos nas barras de 24 até 126 μL , valores bem maiores que os 0,5 μL do SPME. O resultado é limite de quantificação de ng mL^{-1} .³⁵ Além disso, essa técnica não gera resíduos e, na teoria, não há perdas do analito durante o processo de extração. Nesse sentido, essa técnica tem sido aplicada para determinação de fármacos em amostras biológicas (sangue, soro, plasma, urina, etc.) e hormônios sexuais em águas com recuperações de até 100,2% para o interferente endócrino mestranol.³⁶

Fases móveis e fases estacionárias para HPLC

As fases estacionárias mais utilizadas na HPLC para separação de compostos orgânicos são do tipo fase reversa (RP, *reversed phase*),

com base de sílica com grupos C_{18} . Fases estacionárias com grupos C_8 podem ser utilizadas para β -bloqueadores e antibióticos (tetraciclina, penicilinas, sulfonamidas e macrolídeos).^{16, 25}

As fases móveis utilizadas na RP-HPLC são misturas de metanol:água (MeOH:H₂O) ou acetonitrila:água (ACN:H₂O) com ajuste da força cromatográfica e seletividade da fase móvel até se obter resolução, R_s , suficiente para que ocorra a separação de todos os picos cromatográficos no mínimo tempo de análise. A adição de modificadores, como ácido fórmico, acetato de amônio, amônia, etc., é realizada com o objetivo de favorecer o processo de ionização dos analitos através do ajuste de pH do meio, melhorando suas interações com a fase móvel e a fase estacionária. O controle do pH do meio também pode ser realizado através do uso de fases móveis tampoadas. Quando se utiliza o detector espectrômetro de massas (MS) e o processo de ionização por eletronebulização (ESI, *electrospray-ionization*) também se podem utilizar modificadores, com o objetivo de favorecer o processo de ionização dos analitos.^{16, 25}

Detecção para HPLC

Os detectores de absorção espectrofotométrica na faixa do ultravioleta (UV) e por fluorescência foram inicialmente utilizados nos equipamentos de HPLC para análise de compostos que absorvem na região do ultravioleta ou são fluorescentes, incluindo alguns POE como surfactantes ou PAH.²² Algumas publicações recentes têm empregado a detecção por UV para determinação de antibióticos da classe das fluorquinolonas em matrizes biológicas (urina e músculo de frango)³⁷ e ambientais (efluente hospitalar)³⁷ ou anti-inflamatórios em efluentes,³⁸ ou o detector de fluorescência para determinação de produtos veterinários em amostras de leite bovino,³⁹ por se tratarem de equipamentos de mais baixo custo quando comparados com os HPLC-MS. Porém, os valores dos limites de detecção alcançados para detectores de UV são bem mais altos, na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$ a ng L^{-1} , comparados ao detector MS que consegue atingir limites de detecção da ordem de ng L^{-1} a pg L^{-1} , quando utilizado em série (MS/MS), oferecendo, também, a possibilidade de confirmação dos compostos analisados. Para análises ambientais com o propósito de triagem (*screening*), com limites de detecção na faixa de concentração de $\mu\text{g L}^{-1}$, o detector de UV pode ser perfeitamente utilizado ou ainda, quando a concentração dos analitos na matriz é elevada, como o caso das publicações citadas acima.^{37, 38}

O vasto emprego da HPLC-MS/MS em química ambiental¹⁶ é devido ao fato de que a maioria dos métodos oficiais da USEPA utiliza esse modo de separação e detecção,²⁴ inclusive para alguns POE que já apresentam método oficial de referência estabelecido,^{20, 40} devido aos bons limites de detecção, além da possibilidade de confirmação estrutural dos compostos analisados, combinada à robustez do método.⁴¹

O modo de ionização por eletronebulização é o mais utilizado na detecção com espectrômetro de massas (MS) por se tratar de uma forma de ionização mais versátil para analitos com polaridade mediana a muito polares e pouco voláteis, como é o caso da maioria dos fármacos, ou analitos termicamente instáveis, como alguns antibióticos, quando comparado com o modo de ionização química à pressão atmosférica (APCI, *atmospheric pressure chemical ionization*), que utiliza aquecimento na sonda na faixa de 300–400 °C para a dessorção térmica dos analitos.²⁵

O modo de ionização dos analitos depende dos tipos de sítios, ácidos ou básicos, que as moléculas apresentam. Fármacos anti-inflamatórios não esteroidais, derivados do ácido fenil acético, foram ionizados no modo negativo $[M-H]^-$, com perda típica de CO_2 (m/z 44), produzindo o íon benzílico o qual é estabilizado pelo efeito de conjugação do anel aromático. A detectabilidade para fármacos ácidos foi testada em ESI e APCI, onde foi aproximadamente 10 vezes

maior utilizando o modo de ionização ESI quando comparada ao modo de ionização por APCI.¹⁶ O mesmo resultado foi obtido com fármacos utilizados como reguladores lipídicos.¹⁶ Fármacos com sítios básicos, como o fármaco de uso psiquiátrico carbamazepina e seus metabólitos, foram determinados em amostras aquosas utilizando o modo positivo $[M+H]^+$, sendo que a perda característica dos principais metabólitos é a do grupo HNCO (m/z 43), com detectabilidade maior por ESI do que quando ionizados pelo modo de APCI.¹⁶

Os analisadores de massas mais utilizados para detecção dos analitos são o triplo quadrupolo (QqQ) para o modo sequencial (massas em série), por tempo de voo (TOF, *time of flight*) e o íon trap. O analisador tipo TOF foi empregado na determinação de fármacos (analgésicos, antibióticos, β -bloqueadores e antiepilépticos) em amostras de águas superficiais, águas subterrâneas e efluentes por apresentar maior detectabilidade, faixa dinâmica linear e exatidão de massa do que os analisadores do tipo triplo quadrupolo (QqQ), porém os melhores limites de detecção foram encontrados para o analisador do tipo QqQ.¹⁶

Recentemente, o analisador híbrido tipo quadrupolo-tempo de voo (Q-TOF, *quadrupole time-of-flight hybrid analyzer*) tem sido utilizado por oferecer melhor resolução e detectabilidade do que os do tipo quadrupolo convencional, sendo aplicado para identificação e quantificação de metabólitos desconhecidos de fármacos.^{16, 22, 25}

Efeito de matriz

Matrizes complexas como águas superficiais ou esgotos domésticos podem exercer efeito de matriz elevado, ocorrendo efeitos que podem diminuir ou aumentar o sinal do analito, principalmente quando se trabalha com detectores de alta detectabilidade como o MS em série (MS/MS). Isso pode ser resolvido através da utilização de padrões internos (PI) com estrutura semelhante à dos compostos a serem analisados ou compostos isotopicamente marcados, cuja área será comparada nas injeções das soluções padrão e nas injeções da matriz para verificar se houve alguma variação nas áreas dos compostos devido ao efeito de matriz.^{16, 25} (Figura 1S, material suplementar).

ALGUNS EXEMPLOS DE DETERMINAÇÃO DE POE

Produtos farmacêuticos

Os produtos farmacêuticos são a classe de poluentes orgânicos emergentes que mais têm chamado a atenção dos pesquisadores, devido aos números crescentes de utilização de medicamentos. Esses números são considerados alarmantes em países desenvolvidos, como é o caso da Alemanha, onde o consumo de medicamentos superou (desde 2001) a quantidade de 100 toneladas por ano (Figura 2S, material suplementar).⁴² A quantidade real de medicamentos consumidos é ainda maior, pois nesses dados não estão inclusos medicamentos consumidos sem receituário médico ou adquiridos ilegalmente. No caso do Brasil, os números de consumo de medicamentos podem ainda ser maiores, porém ainda não há dados disponíveis.

A análise de produtos farmacêuticos em amostras ambientais aquosas foi inicialmente realizada utilizando a cromatografia gasosa acoplada ao detector por espectrometria de massas (GC-MS). Quando a análise envolvia fármacos ou metabólitos polares, como diclofenaco, ibuprofeno, ácido clofibrato, etc., a etapa de derivatização era necessária.⁴³ No entanto, essa etapa apresenta algumas desvantagens tais como o fato de ser trabalhosa, de contribuir para baixos percentuais de recuperação dos analitos e ao alto custo dos reagentes derivatizantes.

Vários trabalhos recentes⁴³⁻⁴⁶ utilizam métodos analíticos baseados na separação por HPLC com detecção por espectrometria de massas em série com ionização por ESI (HPLC-ESI-MS/MS) para

a determinação de fármacos em matrizes aquosas. Tal fato pode ser explicado pela versatilidade desse modo de ionização, podendo ser utilizado para analitos com polaridades que variam entre médias e altas, com detectabilidade melhor por ESI do que com APCI.⁴⁶

Os métodos desenvolvidos⁴³⁻⁴⁶ empregando HPLC-ESI-MS/MS conseguem atingir limites de detecção e quantificação na ordem de ng L⁻¹, utilizando extração em fase sólida (SPE) com material sorvente de copolímero divinilbenzeno e N-vinilpirrolidona, com percentuais de recuperação dos analitos que variaram de 41 até 101%, como pode ser visualizado na Tabela 2.

Métodos convencionais de tratamento de efluentes não são capazes de eliminar totalmente os fármacos que chegam às estações de tratamento de esgotos urbanos. A análise de efluente tratado de uma planta de tratamento de efluentes na Espanha quantificou a presença de metoprolol, propranolol, carbamazepina, ácido salicílico, benzaflibrato, ibuprofeno, acetaminofeno, diclofenaco, naproxen e ácido clofibrato na faixa de concentração entre 0,01-0,69 µg L⁻¹, evidenciando que o processo de tratamento de efluentes realizado não foi efetivo para eliminar esses fármacos.⁴⁴ (Figura 3S, material suplementar). No mesmo trabalho, foi analisada a água do Rio Ebro, um dos maiores da Península Ibérica, onde os fármacos acetaminofeno, cafeína, carbamazepina, benzaflibrato, diclofenaco e ibuprofeno foram quantificados na faixa de concentração de 9-240 ng L⁻¹.⁴⁴

Um tópico de interesse dentro do estudo dos POE é a separação de fármacos e metabólitos com estereoisômeros em matrizes ambientais. Fármacos como β-bloqueadores adrenergéticos e os inibidores de recaptção de serotonina são administrados como misturas racêmicas. Porém, esses compostos, quando presentes em amostras de águas superficiais, podem interagir com os organismos vivos devido à presença de enzimas quirais desses ambientes. Por exemplo, para humanos, o enantiômero (-) de um β-bloqueador é geralmente 25-100 vezes mais eficiente do que seu enantiômero (+) e sua pureza óptica é perfeitamente determinada como fármaco. Porém, quando análises ambientais são realizadas, nem sempre se leva em conta a atividade

quiral dos compostos e análises enantioespecíficas podem indicar possíveis interações desses fármacos e seus metabólitos com a biota.⁴⁷

Separações quirais podem ser realizadas por vários métodos, utilizando a separação por GC, a HPLC e a eletroforese capilar (CE, *capillary electrophoresis*). Entretanto, analitos polares como os β-bloqueadores, por exemplo, necessitam da etapa de derivatização para serem analisados pela GC, enquanto a CE requer detectores de MS para analitos com concentrações da ordem de µg L⁻¹, sendo menos comuns do que equipamentos de HPLC com esse tipo de detector. Dessa forma, um método para análise de fármacos quirais pode ser obtido empregando-se colunas quirais em HPLC-MS/MS.⁴⁷

A Figura 3 apresenta a separação enantiomérica de seis β-bloqueadores (atenolol, metoprolol, nadolol, solatol, pindolol, propranolol), dois inibidores de recaptção de serotonina (citalopram e fluoxetina), além de um fármaco utilizado como broncodilatador (salbutamol), utilizando um procedimento para a determinação de fármacos em amostras de esgotos domésticos não tratados e após o tratamento de efluentes coletados na região metropolitana da cidade de Edmonton (Canadá). A extração dos compostos foi realizada por SPE com cartuchos de sorvente de copolímero divinilbenzeno e N-vinilpirrolidona, e a resolução em seus pares de enantiômeros foi feita com a fase estacionária (FE) quiral Chirobiotic VTM (à base de vancomicina de alta pureza, uma glicoproteína macrocíclica), em HPLC-ESI-MS/MS. O composto quiral (+)-levobunolol e sua mistura racêmica foram utilizados como padrão interno.⁴⁷

As amostras de esgotos domésticos não tratados apresentaram concentrações de β-bloqueadores entre 10 e 971 ng L⁻¹ e após o tratamento de efluentes entre 14 e 664 ng L⁻¹. A análise enantiomérica indicou que houve transformação enantiosseletiva, onde os fármacos administrados na forma (R)-(+)-atenolol e (R)-(-)-fluoxetina sofreram racemização após serem metabolizados, sendo determinados como mistura racêmica nas amostras de efluentes. Já o fármaco propranolol, administrado como mistura racêmica, sofreu transformação enantiosseletiva, com excesso do enantiômero (S)-(-)-propranolol.

Tabela 2. Resultados para métodos utilizando HPLC-ESI-MS/MS na determinação de produtos farmacêuticos em amostras aquosas

	Ref. 43	Ref. 44	Ref. 45	Ref. 46
Fármacos	paracetamol, trimetoprim, sulfametoxazol, propanolol, eritromicina, dextropropoxifeno, tamoxifeno, lofepramina, diclofenaco, ácido mefenâmico, ibuprofeno, ácido clofibrato	acetaminofeno, cafeína, metoprolol, ácido salicílico, propranolol, carbamazepina, benzaflibrato, naproxeno, diclofenaco, ibuprofeno	cloropromazepina, cloroquinona, closantel, fluoxetina, flufenazida, miconazol, midazolam, ácido niflumico, proclorperazina, trifluoperazina, trifluoroperidol	claritromicina, eritromicina, lincomicina, ciprofloxacina, amoxicilina, sulfametoxazol, oleandromicina, tilmicosin, oxitetraciclina, ciclofosfamida, metotrexato, ibuprofeno, salbutamol, atenolol, enalapril, diazepam, carbamazepina, furosemida, omeprazol, ranitina, benzaflibrato, ácido clofibrato, 17-α-etinilestradiol, estrona
Tipo de matriz	água de rio, torneira e mar	água de rio e efluente doméstico	água tratada	água de rio e efluente doméstico
Cartucho (SPE)	Strata TM X	Oasis HLB TM	Strata TM X	Oasis MCX TM e LiChrolut EN
Fase estacionária	Luna [®] C18 (250 x 10,0 mm com partículas de 10 µm)	Kromasil [®] 100 C18 (250 x 4,6 mm com partículas de 5 µm)	Luna [®] C18 (250 x 2,0 mm com partículas de 5 µm)	Luna [®] C8 (50 x 2 mm com partículas de 3 µm)
Fase móvel	metanol 10 mmol L ⁻¹ em acetato de amônio com HCl (pH 6) e ácido acético 0,87 mol L ⁻¹	ácido acético 0,5% (pH 2,8) e acetonitrila	acetato de amônio 20 mmol L ⁻¹ com 1% de ácido fórmico e metanol	ácido fórmico 0,1% (pH 2) e acetonitrila
Modo de separação	gradiente	gradiente	gradiente	gradiente
LD (ng L ⁻¹)	0,03-0,96	3-15	1-20	0-1
LQ (ng L ⁻¹)	0,08-3,19	não foi citado	não foi citado	não foi citado
Rec. (%)	60-96	41-101	> 60	> 70
CV(%)	< 10 (n=3)	2 - 38 (n=3)	4 - 13 (n=6)	8 (n=3)

LD: Limite de detecção do método; LQ: Limite de quantificação do método; Rec.(%): Recuperação (%); CV(%): Coeficiente de variação (%).

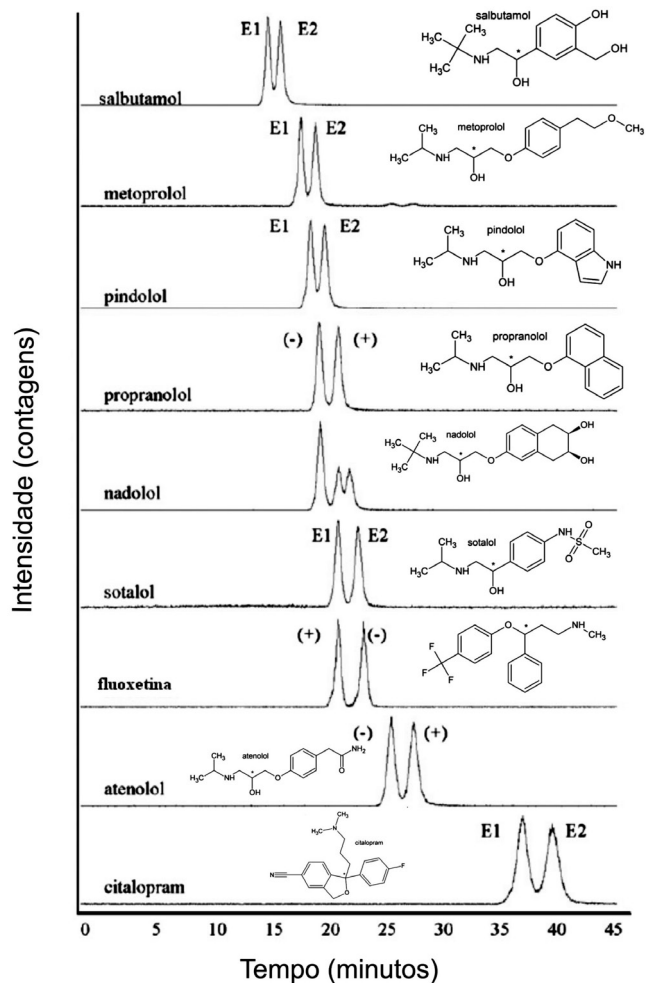


Figura 3. Cromatograma (HPLC-MS/MS) da solução padrão 50 ng mL^{-1} da mistura racêmica resolvida para cada um dos fármacos analisados. Coluna: Chirobiotic V™ ($250 \times 4,6 \text{ mm}$, com partículas de $5 \mu\text{m}$), com coluna de guarda nitrílica ($10 \times 3 \text{ mm}$). Condições cromatográficas: modo de eluição isocrático; fase móvel: metanol e solução aquosa de acetato de amônio 20 mmol L^{-1} acidificada à pH 4 com ácido fórmico $0,1\%$, $90:10 \text{ (v/v)}$; vazão: $0,5 \text{ mL min}^{-1}$; volume de injeção: $25 \mu\text{L}$; detecção: MS em série. Adaptado da ref. 47

Tal fato comprovou a suposição dos autores de que há transformação enantiosseletiva durante o tratamento de efluentes causada pela degradação enzimática de bactérias, sendo, segundo eles, o primeiro método desenvolvido para determinação de fármacos quirais de classes diferentes em amostras de esgotos domésticos não tratados e após o seu tratamento.⁴⁷

Produtos de higiene pessoal

Produtos de higiene pessoal como POE são um tópico que tem despertado crescente interesse, devido seu intenso uso mundial como forma de proteger ou melhorar a saúde humana e dos animais, pois se sabe que esses produtos chegam até as estações de tratamento de efluentes em concentrações potencialmente tóxicas ao meio ambiente onde não são totalmente eliminados.⁴⁸

O triclosano (2,4,4'-tricloro-2'-hidroxifenil éter) está presente na maioria dos cremes dentais, antissépticos bucais, sabonetes para profilaxia, desodorantes e desinfetantes domésticos, onde tem ação bactericida de amplo espectro. Também pode ser incorporado em polímeros e fibras, sendo encontrado em efluentes tratados na concentração entre $5\text{-}90 \text{ ng L}^{-1}$. Estudos relacionam a presença do

triclosano em águas superficiais de lagos e rios com o desequilíbrio da cadeia alimentar, devido sua ação tóxica a certos tipos de algas e organismos aquáticos.⁴⁹

A concentração máxima permitida de triclosano em produtos de higiene e cuidado pessoal é de $0,30\%$ (m/m), de acordo com a Diretiva 76/768/CEE da União Europeia, e os rótulos dos produtos devem expressar a quantidade presente nas formulações.⁴⁹ Com o objetivo de verificar se a dosagem máxima de triclosano está sendo respeitada e de entender como se dá a sua entrada no meio ambiente através dos esgotos domésticos, foi utilizado um método para determinação em amostras de cremes dentais, saliva e esgoto doméstico⁴⁹ utilizando HPLC com detector por arranjo de diodos (DAD, *diode array detection*), uma vez que a molécula do triclosano absorve na região do UV. O processo extrativo empregado foi extração por sorção em barra de agitação (SBSE) recoberta com polímero polidimetilsiloxano (PDMS). A concentração de triclosano encontrada em saliva avaliada imediatamente após a escovação foi de $1,6 \text{ mg L}^{-1}$, e foi $26,5 \mu\text{g L}^{-1}$ após o período de 12 h, comprovando a presença de triclosano durante esse período.⁴⁹

A Figura 4 mostra o cromatograma dos diferentes tipos de amostras utilizando a calibração por adição de padrão para avaliar o efeito de matriz. O valor de triclosano em creme dental foi de $1284 \mu\text{g L}^{-1}$, o que corresponde a $0,27\%$ (m/m) do produto, valor abaixo do limite máximo permitido pela Diretiva 76/768/CEE da União Europeia.⁴⁹

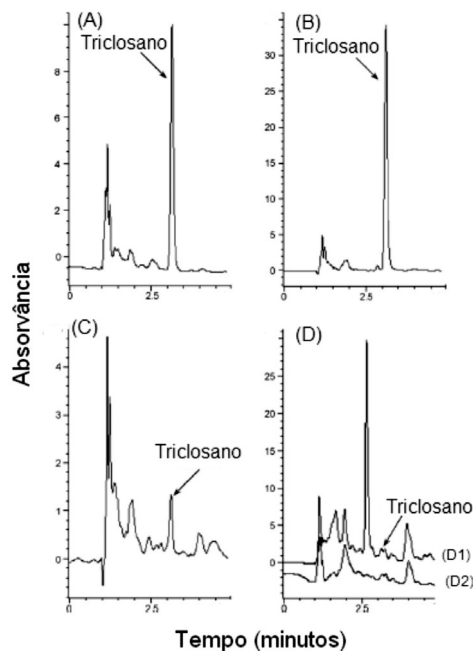


Figura 4. Cromatogramas (HPLC-DAD) obtidos para a análise de (A) creme dental comercial; (B) saliva imediatamente após a escovação; (C) saliva 12 h após a escovação (C); (D1) amostras de esgoto doméstico e (D2) efluente tratado. Amostras coletadas na cidade de Lisboa, Portugal. Coluna: Teknokroma® ODS-A com grupos C18 ($150 \times 4,0 \text{ mm}$, com partículas de $5 \mu\text{m}$). Condições cromatográficas: modo de eluição isocrático; fase móvel: acetonitrila e solução aquosa de ácido fosfórico $0,1\%$, $80:20 \text{ (v/v)}$; vazão: $1,0 \text{ mL min}^{-1}$; volume de injeção: $20 \mu\text{L}$; temperatura de análise: $25 \text{ }^\circ\text{C}$; detecção por DAD a 230 nm . Adaptado da ref. 49

Interferentes endócrinos

Interferentes endócrinos são substâncias químicas que podem literalmente interferir no funcionamento natural do sistema endócrino de espécies animais, inclusive os seres humanos, causando câncer

e prejudicando os sistemas reprodutivos. Podem ser de origem antropogênica, denominados de xenoestrogênios ou biogênica, por exemplo, os estrogênios presentes no metabolismo animal (estrone, progesterona, testosterona, etc.) e no metabolismo das plantas, os fitoestrogênios.⁹ Os xenoestrogênios podem ser representados pelos hormônios sintéticos de medicamentos contraceptivos ou utilizados na pecuária animal ou, ainda, substâncias produzidas para uso na indústria ou na agricultura, como os agrotóxicos (atrazina, lindano, clordano, dieldrin, hexaclorobenzeno, etc.), bifenilas policloradas (PCB), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH), surfactantes não iônicos (alquilfenóis), ftalatos, dioxinas e furanos, entre outros,¹² que, por apresentarem características lipofílicas, podem ser determinados em tecidos adiposos, leite materno, espermatozoides e sangue.

Os ftalatos representam um dos grupos de interferentes endócrinos mais estudados, devido a sua grande utilização como aditivos na indústria de polímeros. O bis(2-etil-hexil)ftalato (DEHP) é amplamente utilizado para aumentar a flexibilidade do PVC (policloreto de vinila), sendo utilizado na proporção de até 40% m/m.⁵⁰ Estudos revelam que o DEHP está relacionado a efeitos carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos, além de afetar o sistema reprodutivo de humanos e animais com redução da quantidade de espermatozoides e diminuição da mobilidade dos espermatozoides.⁵⁰

DEHP e seu metabólito mono(2-etil-hexil)ftalato (MEHP) foram determinados em amostras de plasma seminal, a fim de relacionar sua presença com a incidência de infertilidade em pacientes italianos através da extração líquido-líquido, utilizando uma mistura de solventes (metanol, *n*-hexano e éter etílico acidificado com ácido fosfórico) e posterior separação e detecção por HPLC-DAD.⁵⁰ Aplicando o método validado, os resultados da análise de amostras de plasma seminal de 10 pacientes inférteis revelou concentrações na faixa de 0,200-0,570 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para DEHP e 0,550-0,950 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para MEHP, relacionando a exposição ambiental aos ftalatos estudados com a incidência de infertilidade masculina (Figura 5).⁵⁰

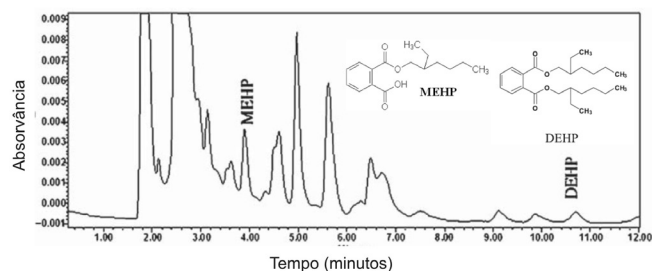


Figura 5. Cromatogramas (HPLC-DAD) obtidos para amostra de plasma seminal de um paciente infértil, fortificada com 0,920 g mL^{-1} de MEHP e 280 g mL^{-1} de DEHP. Coluna Spherisorb® S5 ODS2 com grupos C18 (250 x 4,6 mm, com partículas de 5 μm). Condições cromatográficas: modo de eluição isocrático; fase móvel acetoneitrila e solução aquosa de ácido fosfórico 0,1% (pH 3,0), 90:10 (v/v); vazão: 1,0 mL min^{-1} ; volume de injeção: 20 μL ; temperatura de análise: 20 $^{\circ}\text{C}$.; detecção por DAD a 220 nm. Adaptado da ref. 50

Uma forma de contaminação com interferentes endócrinos conhecida é através da alimentação. Alquilfenóis e bisfenol A (BPA) apresentaram elevada toxicidade crônica em testes realizados *in vitro* e *in vivo*, além de serem persistentes no meio ambiente. Octilfenol (OP) e nonilfenol (NP) são amplamente utilizados como surfactantes não iônicos em produtos de limpeza, sendo descartados nos esgotos domésticos. O bisfenol A é o monômero utilizado na produção de resinas epóxi, policarbonatos e como antioxidante de polímeros, que são utilizados em várias embalagens de alimentos.⁵¹

Um dos estudos pioneiros⁵¹ na determinação simultânea de octilfenol, nonilfenol e bisfenol A foi realizado em carnes (suína, gado,

frango, pato, coelho, peixe e carneiro) na China, utilizando PLE com posterior limpeza com SPE utilizando cartuchos de amino-propil. A separação foi realizada por HPLC com detector MS em série e ionização por ESI. A validação do método foi realizada na faixa de 1,0 até 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ pelo procedimento de calibração externa com padrão interno 4-*n*-nonilfenol, apresentando coeficiente de correlação (*r*) superior a 0,99.⁵¹

A eficiência de extração foi avaliada pela determinação do percentual de recuperação dos analitos em amostras de carne fortificadas com soluções padrão (Figura 4S, material suplementar). Foram encontradas concentrações entre 0,27 e 7,08 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de bisfenol A, e entre 0,49 e 55,98 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de nonilfenol em todos os tipos de carnes analisadas. Octilfenol apareceu em concentrações mais baixas (abaixo do LQ), sendo detectado somente em amostras de peixe.⁵¹

POE no Brasil

No Brasil, a principal fonte de contaminação ambiental das águas se dá através de esgotos domésticos não tratados, uma vez que a grande maioria dos efluentes urbanos não passa pelo processo de tratamento terciário para remoção de nutrientes e desinfecção. De acordo com a Pesquisa Nacional de Saneamento Básico (realizada pelo IBGE, em 2002) 82% desses efluentes são descartados em rios que são utilizados para o abastecimento de água potável.⁵² Um estudo⁵³ com amostras de água superficial dos rios Atibaia, Ribeirão Anhumas, Capivari e Jundiá (Bacia do rio Atibaia), localizados na região metropolitana da cidade de Campinas, no Estado de São Paulo, em 2006, utilizando a técnica de SPE para extração dos analitos e a HPLC com detectores DAD e fluorescência, revelou a presença de paracetamol, cafeína, ácido acetilsalicílico, di-*n*-butilftalato, bisfenol A, 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol nas faixas de concentração entre 0,005 até 41,7 $\mu\text{g L}^{-1}$ refletindo, assim, o baixo percentual de tratamento da Região Metropolitana de Campinas, especialmente nas regiões onde a densidade populacional é mais elevada.⁵³ Um estudo posterior¹⁷ com amostras de água superficial da mesma região (Bacia do rio Atibaia) e amostras de efluente não tratado da cidade de Campinas, realizado utilizando HPLC com detecção por MS em série com ionização por ESI no modo negativo, encontrou valores de estrogênios e xenoestrogênios, estrone, 17 β -estradiol, estriol, 17 α -etinilestradiol, bisfenol A, 4-*n*-octilfenol e 4-*n*-nonilfenol, nas faixas de 2,2 até 39 ng L^{-1} sendo que os maiores valores foram encontrados para bisfenol A, que apresentou concentrações que variaram entre 25 até 84 ng L^{-1} , valores que evidenciam a maior detectabilidade e especificidade do detector de massas acoplado ao sistema de separação por HPLC, que atingiu limites de quantificação da ordem de ng L^{-1} , quando comparada com o detector DAD do estudo anterior.^{17,53}

POE foram estudados em amostras de água de rio da cidade do Rio de Janeiro,¹ onde foram determinados 19 interferentes endócrinos como estrogênio, progesterona, estrone, estradiol, etc., através da HPLC acoplada ao detector de MS em série, ionização por ESI e extração por SPE. Os resultados revelaram níveis mais elevados para os fitoestrogênios (daidzeína, coumestrol e genisteína), com valores de até 366 ng L^{-1} , seguidos por progesterona com 47 ng L^{-1} e de estrogênios e seus conjugados com até 7 ng L^{-1} . Os resultados mostraram que os compostos analisados estão ocasionalmente presentes em níveis relativamente altos, indicando que os rios estudados receberam carga de efluentes não tratados de diferentes fontes e/ou o tratamento de efluentes não foi eficiente para sua completa remoção.¹

Xenoestrogênios foram determinados em amostras de águas superficiais utilizadas para abastecimento na região metropolitana de Belo Horizonte, em Minas Gerais, usando a HPLC acoplada ao detector de MS em série, com analisador TOF.⁵⁴ O período de amostragem foi de 1 ano, sendo que foi encontrada a presença de 17 β -estradiol,

17 α -etinilestradiol e 4-*n*-nonilfenol, com concentrações mais altas para o composto 4-*n*-nonilfenol, que chegou a atingir 1918 ng L⁻¹, e para o composto estradiol, até 54 ng L⁻¹. Um ponto interessante do trabalho é a coleta de amostras de efluentes em diferentes pontos da estação de tratamento, contribuindo assim para o desenvolvimento e melhora nesse processo, visto que foi evidenciado que as etapas de filtração com areia, floculação, sedimentação e cloração não foram eficientes para remoção completa dos interferentes endócrinos estudados.⁵⁴

Como forma de monitorar processos de tratamento de efluentes mais eficientes na remoção de POE (nonilfenol, benzafibrato, dibutilftalato e bisfenol A), amostras de esgoto sanitário e de efluentes de um sistema combinado de tratamento com reator de leito de lodo anaeróbio de fluxo ascendente, seguido de pós-tratamento aeróbio com filtros biológicos percoladores, coletadas no Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental-UFMG foram analisadas por HPLC acoplada ao detector de MS em série, com ionização por ESI, utilizando analisador TOF e extração por SPE.⁵⁵ Foi observado que a combinação do tratamento de efluentes por vias anaeróbias-aeróbias foi suficiente para degradar os POE benzafibrato e bisfenol A. No entanto, os ftalatos apresentaram perfil de mais difícil remoção, mesmo após o tratamento aeróbio.⁵⁵ O trabalho também merece destaque pelo fato de utilizar fenolftaleína como padrão interno, um reagente de baixo custo e de fácil acesso a qualquer laboratório de química analítica.

Estudos de degradação de POE são de extrema importância para avaliar a cinética de transformação desses compostos, bem como estudar quais são os novos compostos formados e sua potencial toxicidade. Nesse sentido, pode-se citar a utilização da HPLC combinada ao detector de UV e MS que avaliou a cinética de degradação do interferente endócrino etinilestradiol utilizando a oxidação por ozonólise.⁵⁶

TENDÊNCIAS EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA APLICADA AO ESTUDO DOS POE

As tendências em cromatografia líquida de alta eficiência aplicada ao estudo dos POE incluem o uso da cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC, *ultra-performance liquid chromatography*), a cromatografia líquida bidimensional (LC-LC) e a cromatografia por interação hidrofílica (HILIC, *hydrophilic interaction chromatography*).

A UHPLC representa um dos últimos avanços da cromatografia líquida, empregando fases estacionárias com partículas de diâmetros menores (em torno de 2 μ m) comparadas às empregadas em HPLC.⁵⁷ O uso destas partículas, juntamente com altas velocidades lineares da fase móvel (FM), permite reduzir o tempo de análise, enquanto mantém a resolução e eficiência de separação, proporcionando picos menos alargados (5-10 s), além de diminuir drasticamente o tempo de análise, para aproximadamente 10 min ou menos.²⁰

Um exemplo de UHPLC aplicada ao estudo de POE é a determinação de 23 produtos farmacêuticos, de diferentes classes incluindo analgésicos, anti-inflamatórios, reguladores lipídicos, fármacos de uso psiquiátrico, agentes antiúlcera, antibióticos e β -bloqueadores (Tabela 3), em um tempo médio de análise de menos de 10 min (Figura 6), utilizando como detector espectrômetro de massas com analisador Q-TOF, sendo um dos primeiros trabalhos empregando a UHPLC na determinação de poluentes orgânicos emergentes.⁵⁸

Os filtros UV do grupo dos parabenos (ésteres alquílicos e arílicos do ácido *p*-hidroxibenzoico) são encontrados na maioria dos bloqueadores solares e cosméticos do mercado com fator de proteção solar (FPS), podendo também ser encontrados como preservantes em alimentos e medicamentos, devido a sua ação bactericida. A presença de parabenos em tumores mamários na faixa de concentração média de 12 ng g⁻¹ intensificou seu estudo como POE.¹³

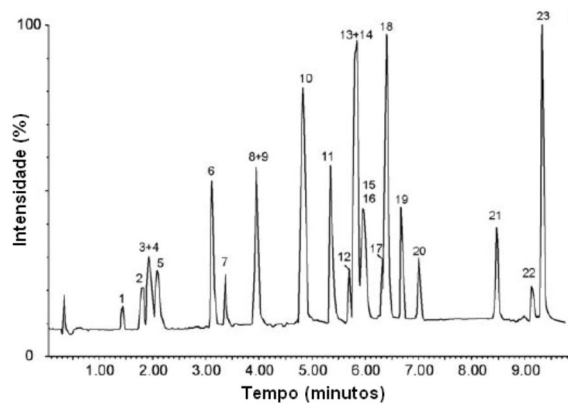


Figura 6. Cromatograma (UHPLC-ESI-Q-TOF) da separação da solução padrão de 23 produtos farmacêuticos. A ordem de eluição dos compostos encontra-se na Tabela 3. A concentração do padrão foi de 100 ng mL⁻¹. Coluna Acquity™ C18 (5 cm x 2.1 mm, com partículas de 1,7 μ m). Condições cromatográficas: modo de eluição por gradiente, utilizando como solvente A: tampão acetato de amônio:ácido acético 5 mmol L⁻¹ (pH 4,8), e solvente B: acetonitril:metanol 2:1 (v/v); iniciando com 5% da fase móvel B, por 1 min, com aumento linear até 60% de B em 7 min, após aumento de B até 90% em 2 min; vazão: 400 μ L min⁻¹; volume de injeção: 10 μ L; detecção por MS em série. Adaptado da ref. 58

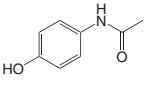
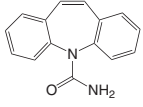
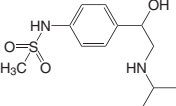
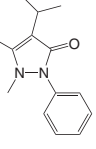
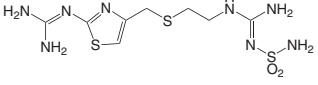
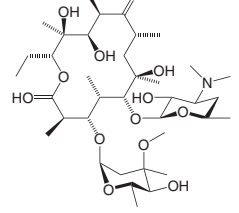
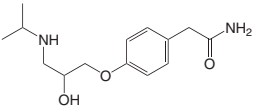
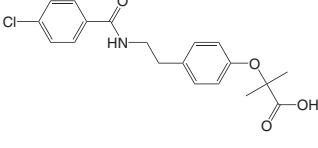
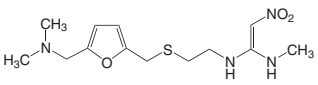
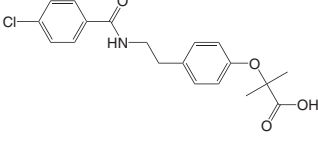
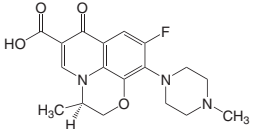
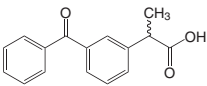
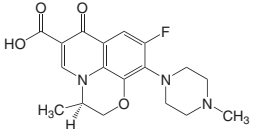
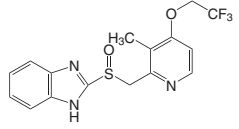
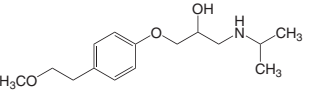
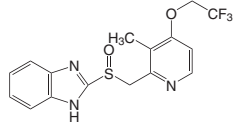
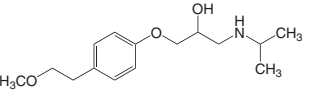
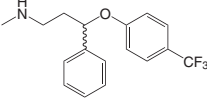
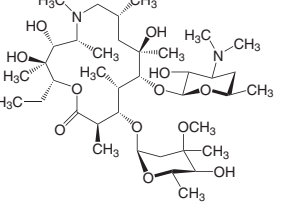
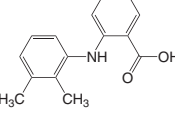
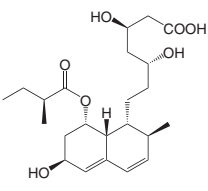
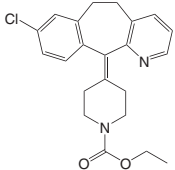
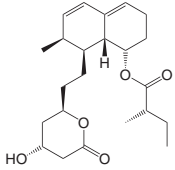
Um estudo empregando a UHPLC-ESI-MS/MS determinou quatro parabenos (metilparabeno, etilparabeno, benzilparabeno e propilparabeno), dois agentes microbianos (triclosano e triclocarban) e três filtros UV do grupo das benzofenonas (2,4-di-hidrôxibenzofenona, 2,2-di-hidrôxi-4-metoxibenzofenona e 3-benzofenona), além de octocrileno e ácido octildimetil-*p*-aminobenzoico, outros dois filtros UV, em águas superficiais da região da Catalunha (Espanha).⁵⁹ Através da UHPLC acoplada ao detector MS em série, foi possível identificar e quantificar todos os analitos com um tempo médio de análise de 9 min com excelente resolução dos picos, diminuindo o efeito de matriz, sendo encontradas concentrações de 3-benzofenona (7 ng L⁻¹) na água de rio e concentrações de metilparabeno (5613 ng L⁻¹) e propilparabeno (1945 ng L⁻¹) em amostras de esgoto a serem tratadas na estação de tratamento de efluentes (Figura 5S, material suplementar).⁵⁹

Um método utilizando UHPLC-ESI-MS/MS⁶⁰ foi empregado para o estudo de 24 hormônios (estriol, trembolona, boldenona, nandrolona, bisfenol A, zeranol, 17 β -estradiol, testosterona, 17 α etinilestradiol, di-hidrodiestilbestrol, metiltestosterona, etisterona, dietilbestrol, dienestrol, estrona, levonorgestrel, didrogesterona, ciproterona, megestrol, progesterona, noretisterona, clormadinona, 4-*n*-nonilfenol e 4-*n*-octilfenol) em tecidos biológicos de animais aquáticos num tempo de análise de 12 min. A extração dos analitos foi realizada por SPE utilizando como sorvente copolímero divinilbenzeno e N-vinilpirrolidona. Foram encontradas concentrações de bisfenol A na faixa de 0,5 até 6,2 μ g kg⁻¹ em amostras de camarão.⁶⁰

O uso de drogas de abuso (DOA, *drugs of abuse*) é um indiscutível problema da sociedade atual. Um importante aumento no consumo de cocaína e cannabis, separadamente ou associada com derivados do ópio e estimulantes da família das anfetaminas tem sido verificado, segundo estudos do Centro Europeu de Monitoramento de Drogas (*European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction*), sendo que o abuso destas substâncias sempre está associado a consequências negativas à sociedade, como aumento da utilização do sistema de saúde por parte dos usuários e maior incidência de crimes.⁶¹

Nove drogas de abuso ou seus metabólitos, incluindo anfetaminas, metanfetaminas, cocaína, heroína e metadona, foram analisadas por HILIC⁶² utilizando na etapa de extração a SPE (com material sorvente à

Tabela 3. Produtos farmacêuticos do cromatograma (UHPLC-ESI-Q-TOF) da separação da solução padrão de 23 produtos farmacêuticos mostrado na Figura 6

Fármaco	Pico	Estrutura	Utilização	Fármaco	Pico	Estrutura	Utilização
Acetaminofeno	1		Anti-inflamatório	Carbamazepina	13		Fármaco de uso psiquiátrico
Sotalol	2		β-Bloqueador	Propifenazona	14		Analgésico
Famotidina	3		Antiúlcera	Eritromicina	15		Antibiótico
Atenolol	4		β-Bloqueador	Benzafibrato	16		Regulador lipídico
Ranitidina	5		Antiúlcera	Cetoprofeno	17		Anti-inflamatório
Trimetoprim	6		Antibiótico	Paroxetina	18		Fármaco de uso psiquiátrico
Ofloxacina	7		Antibiótico	Lansoprazol	19		Antiúlcera
Sulfametoxazol	8		Antibiótico	Fluoxetina	20		Fármaco de uso psiquiátrico
Metoprolol	9		β-Bloqueador	Ácido mefenâmico	21		Analgésico
Azitromicina	10		Antibiótico	Loratadina	22		Anti-histamínico
Propranolol	11		β-Bloqueador	Mevastatin	23		Regulador lipídico
Pravastatina	12		Regulador lipídico				

base de copolímero divinilbenzeno e N-vinilpirrolidona ou copolímero divinilbenzeno e N-vinilpirrolidona modificada com grupos sulfonato (para os analitos de características básicas) e detecção MS em série, em amostras de esgotos coletados em estações de tratamento da Bélgica. Padrões deuterados dos analitos foram utilizados para padronização interna. A separação por HILIC (Figura 7) mostrou excelente desempenho para todos os compostos, especialmente os de características hidrofílicas, os quais eluíram primeiramente (como anfetaminas e derivados), ou altamente polares (como a ecgonina metiléster, um dos principais metabólitos da cocaína) que não apresentavam retenção em RP-HPLC, mostrando assim a importância e aplicabilidade desta nova modalidade de separação, onde foram detectadas drogas de abuso na faixa de 1 até 819 ng L⁻¹, com exceção da 6-monoacetilmorfina.⁶³

Esse último artigo traz uma das tendências de diagnóstico não invasivo sobre o consumo de drogas ilícitas em países desenvolvidos, que envolve a amostragem da excreção urinária de usuários em águas e esgotos a fim de se tomar medidas de prevenção e tratamento de dependência de drogas de abuso, chamada “epidemiologia de esgoto” (“*sewage epidemiology*”), que já foi aplicada a estudos em diversos países como Bélgica, Espanha, Itália, Irlanda, Estados Unidos e Reino Unido.⁶¹ Esse procedimento é uma alternativa às técnicas usuais de amostragem diretamente nos fluidos biológicos (sangue, urina, soro, etc.), que necessitam de voluntários para sua quantificação, conferindo às autoridades de saúde e policial, tendências, padrões de uso, áreas de maior incidência, etc., que poderiam servir para melhorar e intensificar campanhas de prevenção, além de contribuir para o estudo de contaminação ambiental pelas drogas ilícitas, bem como da eficiência da sua remoção pelos sistemas de tratamento de efluentes em uso.^{61,63}

A cromatografia líquida bidimensional é uma alternativa interessante quando se realizam análises em amostras complexas, como amostras biológicas, por exemplo, pois com o aumento de uma dimensão tem-se também o aumento da capacidade de pico e, conseqüentemente, o processo de separação é melhorado.⁶⁴⁻⁶⁶

Leite de vaca, uma matriz complexa pelo seu alto teor de gordura e proteínas, foi analisado por cromatografia líquida bidimensional, acoplada a um detector amperométrico, para a determinação de sulfametoxazol e trimetoprim, medicamentos utilizados para prevenir ou tratar infecções do trato respiratório e gastrointestinal, com limite de detecção (LD) entre 15 até 25 µg L⁻¹.⁶⁷

PERSPECTIVAS

Como perspectivas para a área de cromatografia líquida aplicada ao estudo de poluentes orgânicos emergentes destacam-se a identificação de metabólitos e produtos de transformação, bem como o alcance de limites de detecção e quantificação ainda menores.

A HPLC também estará intimamente ligada à legislação ambiental aplicada, pois, atualmente, para a grande maioria dos POE ainda não há concentrações máximas permitidas estabelecidas pela legislação.

Os grandes desafios estão voltados para o estudo de possíveis novos POE, como nanomateriais e siloxanos, amplamente utilizados na sociedade, estando presentes na formulação de vários produtos (cosméticos, protetores solares, roupas, automóveis e eletrônicos) e os possíveis riscos à saúde e ao meio ambiente que eles podem causar.

Estudos de biorremediação e processos avançados de tratamento de efluentes, como a oxidação química e fotoquímica por meio dos processos oxidativos avançados (POA), ozonólise, nanofiltração, osmose reversa, biorreatores de membrana, etc., provavelmente utilizarão a cromatografia líquida de alta eficiência como ferramenta chave no monitoramento dos processos de degradação dos POE em ambientes artificiais ou naturais.

CONCLUSÃO

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma das técnicas de separação de grande destaque dentro da química analítica e da

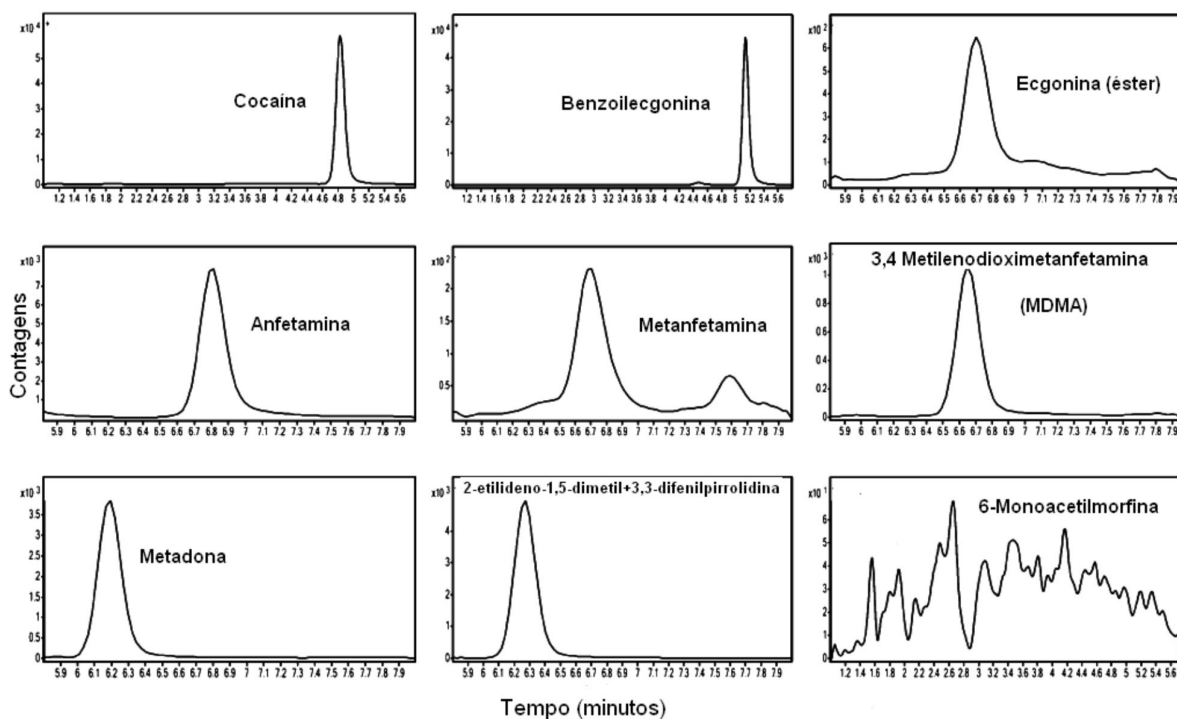


Figura 7. Cromatograma (HILIC-ESI-MS/MS) da separação de drogas de abuso e seus metabólitos de uma amostra de efluente coletada em uma planta de tratamento de esgoto na Bélgica. Coluna Luna® HILIC (15 cm x 3 mm, com partículas de 5 µm). Condições cromatográficas: modo de eluição por gradiente, utilizando como solvente A: tampão acetato de amônio 5 mmol L⁻¹ e solvente B: acetonitrila; iniciando com 95% da fase móvel B, por 0,5 min, seguido do decréscimo linear de B até 50% em 7,5 min; vazão: 0,4 mL min⁻¹; volume de injeção: 5 µL; detecção por MS em série. Adaptado da ref. 63

ciência ambiental, sendo utilizada como uma excelente ferramenta para os mais variados estudos envolvendo os poluentes orgânicos emergentes.

A maioria dos trabalhos publicados na área está voltada para o estudo de fármacos no meio ambiente, principalmente em amostras aquosas, mas podem ser encontrados na literatura vários estudos com outros poluentes orgânicos emergentes em várias matrizes ambientais. Os detectores que utilizam espectrômetro de massas são os mais empregados, devido às baixas concentrações que esses analitos apresentam, sendo este o único detector que permite a confirmação estrutural dos analitos, principalmente quando usado em série.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Está disponível gratuitamente em <http://quimicanova.s bq.org.br>, na forma de arquivo PDF, com acesso livre. Nesse material encontram-se as Figuras 1S a 5S.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e à FAPESP pelo apoio financeiro e bolsas.

Este trabalho é uma contribuição do Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Analíticas Avançadas (INCTAA).

REFERÊNCIAS

- Kuster, M.; Azevedo, D. A.; De Alda, M.J.L.; Aquino Neto, F.R.; Barceló, D.; *Environ. Int.* **2009**, *35*, 997.
- Hutzinger, O. Em *The Handbook of Environmental Chemistry*; Barceló, D., ed.; Springer-Verlag: Berlin, 2006, vol. 1, p. XIII.
- D'Amato, C.; Torres, J. P. M.; Malm, O.; *Quim. Nova* **2002**, *25*, 995.
- Saldanha, G.C.; Bastos, W. R.; Torres, J. P. M.; Malm, O.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, *21*, 306.
- <http://www.epa.gov/waterscience/methods/pollutants.htm>, acessada em Janeiro 2011.
- Official Journal of the European Communities; Council Directive on pollution caused by certain dangerous substances discharged into the aquatic environment of the Community (76/464/EEC), N° L129/23.
- La Farré, M.; Pérez, S.; Kantiani, L.; Barceló, D.; *Trends Anal. Chem.* **2008**, *27*, 991.
- Kuster, M.; De Alda, M. J. L.; Hernando, M. D.; Petrovic, M.; Martín-Alonso, J.; Barceló D.; *J. Hydrol.* **2008**, *358*, 112.
- Kuster, M.; De Alda, M. J. L.; Barceló D. Em *The Handbook of Environmental Chemistry*; Barceló, D.; Petrovic, M.; Agüera, A., eds.; Springer-Verlag: Berlin, 2005, vol. 5, p. 1-24.
- Hoenicke, R.; Oros, D. R.; Oram, J. J.; Tabersk, K. M.; *Environ. Res.* **2007**, *105*, 132.
- Bila, D. M.; Dezotti, M.; *Quim. Nova* **2003**, *26*, 523.
- Ghiselli, G.; Jardim, W. F.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 695.
- Darbre P. D.; Aljarrah, A.; Miller, W. R.; Coldham, N. G.; Sauer, M. J.; Pope, G. S.; *J. Appl. Toxicol.* **2004**, *24*, 5.
- Barceló, D.; *Trends Anal. Chem.* **2003**, *10*, 14.
- Lopes, L.; Marchi, M. R. R.; Souza, J. B. G.; Moura, J. A.; Lorenzon, C. S.; Cruz, C.; Amaral, J. A.; *Quim. Nova* **2010**, *33*, 639.
- Petrovic, M.; Cruz, H. M. S.; Barceló, D.; *J. Chromatogr. A* **2005**, *1067*, 1.
- Sodré, F. F.; Pescara, I. C.; Montagner, C. C.; Jardim, W. F.; *Microchem. J.* **2010**, *96*, 92.
- Koester, C. J.; *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 3737.
- Richardson, S. D.; *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 3807.
- Richardson, S. D.; Ternes, T.; *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 4295.
- Richardson, S. D.; *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 4645.
- Giger, W.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *393*, 37.
- Azevedo, D. A.; Lacorte, S.; Vinhas, T.; Viana, P.; Barceló, D.; *J. Chromatogr. A* **2000**, *879*, 13.
- Barceló, D. Em *Applications of LC-MS in Environmental Chemistry*, Journal of Chromatography Library; Barceló, D., ed.; Elsevier: Amsterdam, 1996, vol. 59, p. VI.
- Hernandez, F.; Sancho, J. V.; Guerrero, M. I. C.; *Trends Anal. Chem.* **2007**, *26*, 466.
- Díaz-Cruz, M. S.; Barceló, D.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *386*, 973.
- Lavén, M.; Alsberga, T.; Yub, Y.; Adolfsson-Ericia, M.; Sun, H.; *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 49.
- Pérez, M. I. B.; García, A. M. C.; Irruela, C.; Gracia, L. G.; Blanco, C.; *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 8355.
- Pozo, O. J.; Guerrero, C.; Sancho, J. V.; Ibanez, M.; Pitarch, E.; Hogendoorn, E.; Hernandez, F.; *J. Chromatogr. A* **2006**, *1103*, 83.
- Lord, H.; Pawliszyn, J.; *J. Chromatogr. A* **2000**, *902*, 17.
- Oliveira, A. R. M.; Magalhães, I. R. S.; Santana, F. J. M.; Bonato, P. S.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 637.
- Ho, T. S.; Vasskog, T.; Anderssen, T.; Jensen, E.; Rasmussen, K. E.; Pedersen-Bjergaard, S.; *Anal. Chim. Acta* **2007**, *592*, 1.
- Fidalgo-Used, N. U.; Blanco-González, E. B.; Sanz-Medel, A. S.; *Anal. Chim. Acta* **2007**, *590*, 1.
- Sena, R. F.; Tambosi, J. L.; Moreira, R. F. P.; José, H. J.; Gebhardt, W.; Schröder, H. F.; *Quim. Nova* **2010**, *33*, 1194.
- Rodrigues, A. C.; Queiroz, M. E. C.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 1814.
- Almeida, C.; Nogueira, J. M. F.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, *41*, 1303.
- Kumar, A.; Malik, A. K.; Tewary, D. K.; Singh, B.; *J. Sep. Sci.* **2008**, *31*, 294.
- Aguilar-Arteaga, K.; Rodriguez, J. A.; Miranda, J. M.; Medina, J.; Barrado, E.; *Talanta* **2010**, *80*, 1152.
- Kolberg, D. I. S.; Presta, M. A.; Wickert, C.; Adaima, M. B.; Zanella, R.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, *20*, 220.
- http://www.epa.gov/safewater/methods/analyticalmethods_ogwdw.htm, acessada em Janeiro 2011.
- Jacomini, A. E.; De Camargo, P. B.; Avelar, W. E. P.; Bonato, P.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, *20*, 107.
- Ternes, T. A.; Meisenheimer, M.; McDowell, D.; Sacher, F.; Brauch, H.-J.; Haist, B. H.; Preuss, G. G.; Wilme, U.; Seibert, N.; *Environ. Sci. Technol.* **2002**, *36*, 3855.
- Nebot, C.; Gibb, S. W.; Boyd, K. G.; *Anal. Chim. Acta* **2007**, *598*, 87.
- Pedrouzo, M.; Reverté, S.; Borrull, F.; Pocurull, E.; Marcé, R. M.; *J. Sep. Sci.* **2007**, *30*, 297.
- Roberts, P. H.; Bersuder P.; *J. Chromatogr. A* **2006**, *1134*, 143.
- Castiglioni, C.; Bagnati, R.; Calamari, D.; Fanelli, R.; Zuccato, E. A.; *J. Chromatogr. A* **2005**, *1092*, 206.
- MacLeod, S. L.; Sudhir, P.; Wong, C. S.; *J. Chromatogr. A* **2007**, *1170*, 23.
- Tixier, C.; Singer, H. P.; Canonica, S.; Muller, S. R.; *Environ. Sci. Technol.* **2002**, *36*, 3482.
- Silva, A. R. M.; Nogueira, J. M. F.; *Talanta* **2008**, *74*, 1498.
- Mazzeo, P.; Di Pasquale, D.; Ruggieri, F.; Fanelli, M.; D'Archivio, A. A.; Carlucci, G.; *Biomed. Chromatogr.* **2007**, *21*, 1166.
- Shao, B.; Han, H.; Li, D.; Mab, Y.; Tu, X.; Wua, Y.; *Food Chem.* **2007**, *105*, 1236.
- Sodré, F. F.; Locatelli, M. A. F.; Jardim, W. F.; *Water, Air, Soil Pollut.* **2010**, *206*, 57.
- Sodré, F. F.; Montagner, M. A. F.; Jardim, W. F.; *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.* **2007**, *2*, 187.
- Moreira, D. S.; Aquino, S. F.; Afonso, R. J. C. F.; Santos, E. P. P. C.; Pádua, V. L.; *Environ. Technol.* **2009**, *30*, 1041.
- Leite, G. S.; Franco, R. J. C.; Aquino, S. F.; *Quim. Nova* **2010**, *33*, 734.
- Vieira, K. M.; Nascentes, C. C.; Augusti, R.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, *21*, 787.

57. Maldaner, L.; Jardim, I. C. S. F.; *Quim. Nova* **2009**, *32*, 214.
58. Petrovic, M.; Gros, M.; Barceló, D.; *J. Chromatogr., A* **2006**, *1124*, 68.
59. Pedrouzo, M.; Borrull, F.; Marcé, R. M.; Pocurull, E.; *J. Chromatogr., A* **2009**, *1216*, 6994.
60. Xu, Y. J.; Tian, X. H.; Zhang, X. Z.; Gong, X. H.; Zhang, S. J.; Liu, H. H.; Zhang, L. M.; *Am. Lab.* **2010**, *7*, 11.
61. van Nuijs, A. L. N.; Tarcomnicu, I.; Bervoets, L.; Blust, R.; Jorens, H. N.; Covaci, A.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *395*, 819.
62. Maldaner, L.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; *Quim. Nova* **2010**, *33*, 1559.
63. Bijlsma, L.; Sancho, J. V.; Pitarch, E.; Ibáñez, M.; Hernández, F.; *J. Chromatogr., A* **2009**, *1216*, 3078.
64. Svec, F.; *Chem. Educ.* **1997**, *2*, 1.
65. Malerod, H.; Lundanes, E.; Greibrokk, T.; *Anal. Methods* **2010**, *2*, 110.
66. Dugo, P.; Cacciola, F.; Kumm, T.; Dugo, G.; Mondello, L.; *J. Chromatogr., A* **2008**, *1184*, 353.
67. Andrade, L. S.; Moraes, M. C.; Rocha-Filho, R. C.; Fatibello-Filho, O.; Cass, Q. B.; *Anal. Chim. Acta* **2009**, *654*, 127.