

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
Grupo de Síntese Orgânica e CLAE

**“Métodos para a determinação enantiomérica
dos fármacos omeprazol,
lansoprazol e pantoprazol em águas residuais e
de estuário”**

Kenia Lourenço Vanzolini

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Química, área de concentração Química Orgânica.

Orientadora: Prof^a Dra. Quezia Bezerra Cass

*** Bolsista FAPESP**

São Carlos – SP

2009

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

V285mp

Vanzolini, Kenia Lourenço.

Métodos para a determinação enantiomérica dos fármacos omeprazol, lansoprazol e pantoprazol em águas residuais e de estuário / Kenia Lourenço Vanzolini. -- São Carlos : UFSCar, 2009.

138 f.

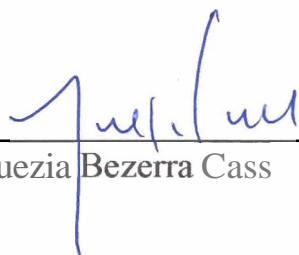
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Cromatografia líquida de alta eficiência. 2. Fármacos quirais. 3. Colunas RAM. I. Título.

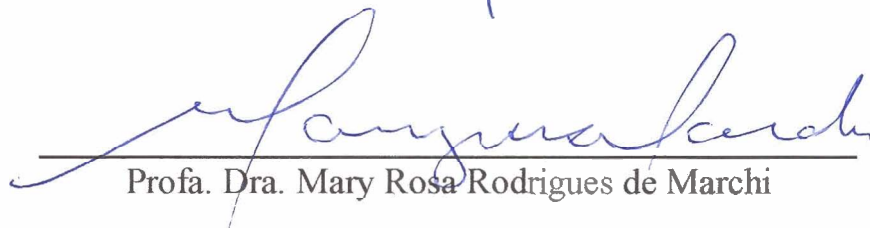
CDD: 543.0894 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Mestrado

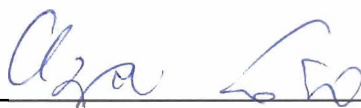
Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de dissertação de mestrado da candidata Kenia Lourenço Vanzolini, realizada em 17 de abril de 2009:



Profa. Dra. Quezia Bezerra Cass



Profa. Dra. Mary Rosa Rodrigues de Marchi



Profa. Dra. Ilza Lobo

Dedico esta dissertação...
... aos meus maravilhosos pais, José e Neusa, pelo apoio e amor a mim
demonstrado durante toda minha vida.
... e a meu irmão Igor, pelo amor e amizade, mas além disso por cuidar de
nossos pais na minha ausência.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Quezia Cass pela orientação, incentivo e dedicação durante o desenvolvimento deste trabalho, além do excelente exemplo de profissionalismo.

A todos os professores do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

À Dra. Juliana Cristina Barreiro pelos ensinamentos e ajuda durante o mestrado.

Às professoras Dra. Regina V. Oliveira e Dra. Neila M. Cassiano pelas produtivas discussões, amizade e incentivo.

Ao Alexandre A. Cruz pela amizade e disponibilidade no reparo de equipamentos.

Aos meus amigos do Grupo de Síntese Orgânica e CLAE: Aline A. Becaro, Ângela C. De Pietro, Ariele F. Fogolin, Bianca R. Lopes, Bruna N. O. C. Moreira, Fernando C. C. R. de Paula, Fernando G. Almeida, Graziani F. Côrrea, Lúcia R. R. Martins, Mariana Coimbra, Marina Denadai, Patrícia Polachini, Rejane Carla de Souza, Tiago de C. Lourenço, Túlio F. Galatti, Vanessa M. Urban e Vinícius Carvalho. Agradeço a todos pela amizade construída nestes anos, pelo clima de apoio mútuo, incentivo, colaboração e momentos de descontração.

A todos os amigos dos laboratórios vizinhos e da turma de Bacharel em Química 2003, por estarem sempre presentes, me apoiando e incentivando.

À Kátia Roberta A. Belaz e Marcela C. de Moraes pela amizade irrestrita, conselhos e apoio.

Às minhas amigas Lya Rebelo, Paola M. F. F. de Souza, Ellen V. Sartoreli, Stella H. Maganhi, Natália Sattolo, por todo carinho, todas as conversas, risadas e companhia nestes anos morando em “república”.

A Dalyde Lima, Gabriela Byzynski e Manuela O. Castaldini, pela amizade incondicional vivida durante esses anos na cidade de São Carlos.

Aos meus amigos Juliano Fonseca, Marcelo Motta, Marcos F. Carvalho, Rafael de Oliveira, Rafael Sundermann, Rodrigo B. Lima e Sergio S. Ferrão Jr., pelo carinho, amizade, apoio e baladas nos finais de semana.

Àqueles que, incondicionalmente, sempre fizeram todo o possível para que eu chegasse até aqui e alcançasse esta conquista. Aos meus pais, José Antônio e Neusa, e meu irmão Igor, todo o meu amor, carinho e gratidão.

Ao meu melhor amigo e namorado Fábio N. Sposito, pelo carinho, incentivo, apoio, cumplicidade e alegria.

Ao Bóris pela companhia nas noites de redação de relatórios e desta dissertação.

Ao corpo técnico e administrativo do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

À FAPESP pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
RESUMO.....	xviii
ABSTRACT.....	xx
1 – INTRODUÇÃO.....	1
1.1 – Fármacos no meio ambiente.....	1
1.1.1 – A trajetória do fármaco no meio ambiente.....	5
1.2 – Contaminantes quirais.....	6
1.3 – Cromatografia quiral.....	8
1.4 – Fármacos selecionados.....	17
1.4.1 – Omeprazol, lansoprazol e pantoprazol.....	19
1.5 – Pré-tratamento de amostras ambientais.....	24
1.5.1 – Métodos por injeção direta.....	26
1.5.1.1 – Fases LPS (Large Particles Supports).....	27
1.5.1.2 – Fases RAM (Restricted Access Media).....	27
1.6 – Espectrometria de massas.....	30
2 – OBJETIVOS.....	32
3 – JUSTIFICATIVAS.....	33
3 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	35
3.1 – Generalidades.....	35
3.2 – Derivação do suporte 3-aminopropilsílica.....	37
3.3 – Síntese do tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose.....	38
3.4 – Síntese do tris (3,5-dimetóxfenilcarbamato) de amilose.....	38
3.5 – Recobrimento do suporte APS-Nucleosil com tris (arilcarbamato) sintetizado.....	39
3.6 – Empacotamento das colunas analíticas.....	40
3.7 – Preparo das colunas RAM-BSA.....	41
3.7.1 – Sílicas utilizadas.....	41
3.7.2 – Empacotamento das colunas.....	41

3.7.3 – Imobilização das fases hidrofóbicas com BSA.....	41
3.8 – Caracterização das áreas de estudo e pontos de coleta.....	42
3.9 – Avaliação da eficiência de exclusão das substâncias húmicas pelas colunas RAM-BSA.....	46
3.10 – Desenvolvimento dos métodos analíticos.....	46
3.10.1 – Preparo das soluções padrão do omeprazol, lansoprazol e pantoprazol.....	46
3.10.2 – Preparo das soluções de calibração e controle de qualidade.....	48
3.10.3 – Obtenção das curvas analíticas.....	48
3.11 – Parâmetros analíticos adotados para validação de fármacos em matrizes aquáticas.....	50
3.11.1 – Seletividade.....	51
3.11.2 – Recuperação.....	51
3.11.3 – Precisão e exatidão.....	51
3.11.4 – Limite de quantificação (LQ) e detecção (LD).....	52
3.11.5 – Estabilidade.....	52
3.12 – Análises das amostras.....	53
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
4.1 – Colunas RAM-BSA.....	54
4.1.1 – Preparo das colunas RAM-BSA.....	55
4.1.2 – Exclusão das substâncias húmicas pelas colunas RAM-BSA.....	57
4.2 – Síntese, caracterização e avaliação das fases tris (arilcarbamatos) de amilose.....	64
4.2.1 – Avaliação da enantiorresolução e enantioseparação dos fármacos omeprazol, lansoprazol e pantoprazol na CSP-1 e CSP-2 no modo reverso de eluição.....	69
4.3 – Desenvolvimento e validação do método enantiosseletivo LC-LC/UV-vis para o fármaco omeprazol.....	71
4.3.1 – Validação do método.....	76
4.3.1.1 – Seletividade.....	76
4.3.1.2 – Linearidade.....	77
4.3.1.3 – Precisão e exatidão.....	79
4.3.1.4 – Eficiência de extração.....	80
4.3.1.5 – Limites de quantificação e detecção.....	81

4.3.1.6 – Estabilidade das amostras.....	82
4.3.2 – Aplicação do método.....	83
4.4 – Desenvolvimento e validação do método enantiosseletivo LC-LC/UV-vis para os fármacos lansoprazol e pantoprazol.....	85
4.4.1. – Seletividade.....	90
4.4.2 – Linearidade.....	90
4.4.3 – Precisão e exatidão.....	92
4.4.4 – Eficiência de extração.....	94
4.4.5 – Limites de quantificação e detecção.....	95
4.4.6 – Estabilidade das amostras.....	95
4.4.7 – Aplicação do método.....	96
4.5 – Desenvolvimento e validação do método enantiosseletivo LC-LC/ESI-MS ² para os fármacos lansoprazol e pantoprazol.....	99
4.5.1 – Avaliação do efeito de matriz no LC-LC/ESI-MS ²	112
4.5.2 – Validação do método.....	116
4.5.3 – Aplicação do método.....	120
5 – CONCLUSÕES.....	123
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	125

LISTA DE ABREVIATURAS

λ	Comprimento de onda
α	Fator de separação
4-MBC	4-(Methylbenzylidene)-camphor
ACN	Acetonitrila
ADS	Alquil-Diol-Sílica (<i>Alkyl-Diol-Silica</i>)
ANA	Agência Nacional de Águas
APS	3-aminopropilsílica
BSA	Albumina Sérica Bovina (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
POPs	Poluentes Orgânicos Persistentes
MTBE	Éter metil-terciário butílico
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
C ₈	Octil-Sílica
C ₁₈	Octadecil-Sílica
GC/MS ²	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (<i>gas chromatography coupled to mass spectrometry</i>)
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
LC/MS ²	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (<i>high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry</i>)
CSP	Fase Estacionária Quiral (<i>Chiral Stationary Phase</i>)
CV	Coefficiente de Variação
Cys	Cisteína
d.i.	Diâmetro interno
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
H ⁺ /K ⁺ -ATP-ase	H ⁺ /K ⁺ Adenosina Tri-fosfatase
HSA	Albumina Sérica Humana (<i>Human Serum Albumin</i>)
ISPR	Fase de Superfície Interva Reversa (<i>Internal Surface</i>)

	<i>Reversed Phase</i>)
LD	Limite de Detecção
LPS	Large Particles Supports
LQ	Limite de Quantificação
MFP	Fase de Função Mista (<i>Mixed-Function Material</i>)
MIP	Polímeros Molecularmente Impressos (<i>Molecularly Imprinted Polymers</i>)
MT	Mato Grosso
pH	Potencial Hidrogeniônico
RAM	Fases de Acesso Restrito (<i>Restricted-Access Media</i>)
RAM-BSA	Fase RAM BSA Imobilizada
R _s	Resolução
SH	Substâncias Húmicas
SHP	Fase Hidrofóbica Blindada (<i>Shielded Hydrophobic Phase</i>)
SPS	Fase Semi-Permeável (<i>Semi Permeable Surface</i>)
SPE	Extração em fase sólida (<i>Solid Phase Extraction</i>)
THF	Tetraidrofurano
UV	Ultravioleta

LISTA DE TABELAS

1 – INTRODUÇÃO

TABELA 1.1 - Concentrações médias de fármacos detectados no meio ambiente aquático – Dados obtidos em amostras coletadas no Brasil.....	4
TABELA 1.2 – Seletores quirais.....	10
TABELA 1.3 – Exemplos de fases estacionárias quirais disponíveis comercialmente.....	11

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

TABELA 4.1 – Valores de TOC e pH das amostras coletadas.....	62
TABELA 4.2 – Principais bandas no infravermelho encontradas para as fases estacionárias quirais sintetizadas.....	68
TABELA 4.3 – Resultados da análise elementar das CSPs sintetizadas.....	68
TABELA 4.4 – Condições cromatográficas utilizadas para a exclusão das macromoléculas e eluição dos analitos na coluna RAM-BSA C ₈	73
TABELA 4.5 – Condições cromatográficas utilizadas no método LC-LC/UV-vis desenvolvido para o omeprazol.....	74
TABELA 4.6 – Precisão (CV%) e exatidão interdias e intradia do método desenvolvido.....	80
TABELA 4.7 – Eficiência de extração obtida para as amostras controle de qualidade do omeprazol.....	81
TABELA 4.8 – Valores de LQ e LD para cada enantiômero do fármaco omeprazol no método validado.....	81
TABELA 4.9 – Resultados do estudo de estabilidade em auto-injetor para o omeprazol em água residual.....	82
TABELA 4.10 – Alguns resultados do estudo de estabilidade à 4°C para o omeprazol em água residual.....	83
TABELA 4.11 – Condições cromatográficas utilizadas para a exclusão das macromoléculas e eluição dos fármacos lansoprazol e pantoprazol na coluna RAM-BSA C ₈ selecionada para este estudo.....	86
TABELA 4.12 – Condições cromatográficas utilizadas no método LC-LC/UV-vis desenvolvido para a análise simultânea dos fármacos lansoprazol e pantoprazol.....	88
TABELA 4.13 – Precisão (CV%) e exatidão interdias e intradia do método desenvolvido.....	93

TABELA 4.14 – Eficiência de extração obtida para as amostras controle de qualidade dos fármacos.....	94
TABELA 4.15 – Resultados do estudo de estabilidade em auto-injetor para o lansoprazol e pantoprazol em água residual.....	96
TABELA 4.16 – Exemplos de métodos utilizados para a determinação de fármacos no ambiente aquático.....	100
TABELA 4.17 – Fator Matriz calculado a partir dos resultados do método pós-extração.....	116
TABELA 4.18 – Precisão (CV%) e exatidão interdias e intradia do método desenvolvido.....	118
TABELA 4.19 – Eficiência de extração obtida para as amostras controle de qualidade dos fármacos.....	119
TABELA 4.20 – Resultados do estudo de estabilidade em auto-injetor para o lansoprazol e pantoprazol em água residual.....	120

LISTA DE FIGURAS

1 – INTRODUÇÃO

FIGURA 1.1 – Índice de tratamento de esgoto por estado e município, no Brasil.....	3
FIGURA 1.2 – Possíveis rotas de fármacos no meio ambiente.....	6
FIGURA 1.3 – Princípio da resolução quiral. (a) Fase estacionária quiral e mistura racêmica (b) Interação baseada na regra de três pontos (c) Formação do complexo diastereoisomérico intermediário e determinação da ordem de eluição.....	13
FIGURA 1.4 – Estrutura química da fase quiral triacetato de celulose.....	15
FIGURA 1.5 – Possíveis interações do carbamato com compostos quirais. Como exemplo, temos a fase estacionária quiral de polissacarídeo tris-[1-(S)-feniletilcarbamato] de amilose.....	16
FIGURA 1.6 – Representação estrutural de inibidores da bomba H^+/K^+ -ATPase.....	19
FIGURA 1.7 – Esquema do mecanismo de ação básico de inibição da secreção gástrica de HCl pelo omeprazol.....	20
FIGURA 1.8 – Metabolismo do omeprazol, exemplificado pelo S-(-)-omeprazol.....	21
FIGURA 1.9 – Estruturas propostas para os ácidos fúlvicos (A) e húmicos (B) presentes em águas naturais.....	26
FIGURA 1.10 – Esquema do mecanismo de exclusão de macromoléculas proposto.....	28

3 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

FIGURA 3.1 – Mapa da área de estudo (modificado do CBH-TJ). Pontos de coleta: 1 – Nascente; 2 – UFSCar; 3 – Universidade de São Paulo; 4 – Antiga usina da Companhia Paulista de Força e Luz.....	44
FIGURA 3.2 – Mapa das estações de coleta ao longo do curso do Rio Douro, Porto- Portugal.....	45

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

FIGURA 4.1 – Fases hidrofóbicas recobertas com albumina sérica bovina.....	55
--	----

FIGURA 4.2 – Etapas do preparo das colunas RAM-BSA.....	56
FIGURA 4.3 – Seqüência de reações para estabilização da BSA imobilizada – formação das Bases de Schiff.....	57
FIGURA 4.4 – Seqüência de reações para estabilização da BSA imobilizada – (2a) redução das Bases de Schiff e (2b) dos aldeídos residuais.....	57
FIGURA 4.5 – Sobreposição dos cromatogramas dos padrões de ácidos húmicos (AH) e fúlvicos (AF) aquáticos na coluna Tsk-gel® G3000PWXL. Condições cromatográficas: tampão fosfato (pH 6,8; 0,1 mol.L ⁻¹); Vazão:0,5 mL.min ⁻¹ ; Volume de injeção: 500 µL; λ _{máx} = 250 nm.....	58
FIGURA 4.6 – Sobreposição dos cromatogramas das amostras de água residual de São Carlos e água de estuário do Rio Douro na coluna Tsk-gel® G3000PWXL. Condições cromatográficas: tampão fosfato (pH 6,8; 0,1 mol.L ⁻¹ NaCl); Vazão:0,5 mL.min ⁻¹ ; Volume de injeção: 500 µL; λ _{máx} = 250 nm.....	59
FIGURA 4.7 – Esquema ilustrando o acoplamento em série RAM/Tsk-gel®.....	60
FIGURA 4.8 – Cromatogramas obtidos na coluna RAM-BSA C ₁₈ acoplada a uma coluna Tsk-gel® G3000PWXL: (A) amostra de água residual do ponto 3 de São Carlos e (B) amostra do estuário do Rio Douro. Condições cromatográficas: tampão fosfato (pH 6,8; 0,1 mol.L ⁻¹); Vazão:0,5 mL.min ⁻¹ ; Volume de injeção: 500µL; λ _{máx} = 250 nm.....	60
FIGURA 4.9 – Gráfico do percentual de exclusão das colunas RAM-BSA C ₁₈ e C ₈ para as amostras de água residual de São Carlos e do estuário do Rio Douro.....	61
FIGURA 4.10 – Cromatograma referente a amostra de água residual do ponto 3 de São Carlos, ponto 1 do mapa da Figura 3.1. Condições cromatográficas – Coluna RAM BSA C ₈ (5,0 x 0,46 cm d.i.); água Milli-Q, Vazão: 1,0 mL.min ⁻¹ ; Volume de injeção: 500µL; λ _{máx} =280nm.....	63
FIGURA 4.11 – Cromatogramas obtidos pelo acoplamento da coluna Tsk-gel® G3000PWXL a uma coluna RAM-BSA C ₁₈ dos padrões de poliestirenos sulfonados de sódio de diferentes pesos moleculares. Condições cromatográficas: tampão fosfato (pH 6,8; 0,1 mol.L ⁻¹ NaCl); Vazão: 0,5 mL.min ⁻¹ ; Volume de injeção: 500µL; λ _{máx} = 250 nm.....	64
FIGURA 4.12 – Esquema da síntese do tris (arilcarbamato) de amilose, utilizando o tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose como exemplo.....	65
FIGURA 4.13 – Esquema da reação do isocianato com água.....	66

FIGURA 4.14 - Carbamatos preparados para cobertura na sílica. CSP-1: tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose e CSP-2: tris (3,5-dimetóxi-fenilcarbamato) de amilose.....	66
FIGURA 4.15 – Espectro no IV da amilose não derivada.....	67
FIGURA 4.16 – Espectro no IV da CSP-1 sintetizada.....	67
FIGURA 4.17 – Sobreposição dos cromatogramas referentes às amostras de cada fármaco na concentração de 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ na CSP-1 (A) e na CSP-2 (B). Condições cromatográficas: ACN:H ₂ O (35:65); Vazão: 1,0 mL.min ⁻¹ ; Volume de injeção: 50 μL ; (A) $\lambda_{\text{máx}}$ = 302nm, (B) $\lambda_{\text{máx}}$ = 285nm.....	70
FIGURA 4.18 – Diagrama do sistema multidimensional utilizado para o desenvolvimento e validação do método. Posição 1: Coluna RAM e coluna quiral desacopladas; Posição 2: colunas RAM e quiral acopladas (transferência dos analitos).....	72
FIGURA 4.19 – (A) Cromatograma de água residual fortificada com omeprazol na concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ na coluna RAM-BSA C ₈ (5,0 x 0,46 cm d.i.). Condições cromatográficas de acordo com a Tabela 4.3.....	73
FIGURA 4.20 – Cromatograma da separação dos enantiômeros do fármaco omeprazol, na coluna CSP-1. Condições cromatográficas de acordo com a Tabela 4.4.....	75
FIGURA 4.21 – Cromatograma da separação dos enantiômeros do omeprazol (200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Condições cromatográficas de acordo com a Tabela 4.4.....	76
FIGURA 4.22 – Sobreposição do cromatograma da separação dos enantiômeros do omeprazol em água residual fortificada com o cromatograma da água residual sem a presença do analito. Condições cromatográficas de acordo com a Tabela 4.4.....	77
FIGURA 4.23 – Curvas analíticas para o (+)-omeprazol e (-)-omeprazol.....	78
FIGURA 4.24 – Cromatograma referente à amostra de CQM. Condições cromatográficas de acordo com a Tabela 4.4.....	84
FIGURA 4.25 – Cromatogramas referentes (A) à amostra de água do ponto 1(A) – branco e, (B) à amostra de água do rio Douro coletada no Ponto 6 (mapa da Figura 3.2). Condições cromatográficas de acordo com a Tabela 4.4.....	85
FIGURA 4.26 – Cromatograma de água do ponto 1(B) fortificada com lansoprazol e pantoprazol na concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ cada, na coluna RAM-BSA C ₈ (5,0 x 0,46 cm d.i.). Condições cromatográficas de acordo com a Tabela 4.10.....	87
FIGURA 4.27 – Cromatograma da separação dos enantiômeros dos fármacos lansoprazol e pantoprazol, na coluna CSP-2. Condições cromatográficas de acordo com a Tabela 4.11.....	89

FIGURA 4.28 – Cromatograma da separação dos enantiômeros do lansoprazol e pantoprazol (200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Condições cromatográficas de acordo com a Tabela 4.11.....	89
FIGURA 4.29 – Sobreposição do cromatograma da separação dos enantiômeros do lansoprazol e pantoprazol em água do ponto 1(B) fortificada, com o cromatograma da água residual sem a presença dos analitos. Condições cromatográficas de acordo com a Tabela 4.11.....	90
FIGURA 4.30 – Curvas analíticas para o (+)-lansoprazol e (-)-lansoprazol.....	91
FIGURA 4.31 – Curvas analíticas para o (+)- pantoprazol e (-)-pantoprazol.....	92
FIGURA 4.32 – Compostos de degradação para os fármacos lansoprazol e omeprazol em diferentes pHs.....	98
FIGURA 4.33 – Compostos de degradação por irradiação para o fármaco lansoprazol.....	98
FIGURA 4.34 – Compostos de degradação por irradiação para o fármaco omeprazol.....	99
FIGURA 4.35 – Cromatograma de uma amostra de água do ponto 1(B) fortificada com lansoprazol na concentração de 100 ng.mL^{-1} . Condições cromatográficas de acordo com a Tabela 4.11.....	110
FIGURA 4.36 – Espectro de massas referente à primeira banda do cromatograma da Figura 4.35.....	110
FIGURA 4.37 – Espectro de massas referente à segunda banda do cromatograma da Figura 4.35.....	111
FIGURA 4.38 – Cromatograma de uma amostra de água do ponto 1(B) fortificada com pantoprazol na concentração de 100 ng.mL^{-1} . Condições cromatográficas de acordo com a Tabela 4.11.....	111
FIGURA 4.39 – Espectro de massas referente à primeira banda do cromatograma da Figura 4.38.....	112
FIGURA 4.40 – Espectro de massas referente à segunda banda do cromatograma da Figura 4.38.....	112
FIGURA 4.41 – Esquema do sistema de infusão pós-coluna.....	114
FIGURA 4.42 – Efeito de matriz por infusão pós-coluna para o lansoprazol na concentração de 100 ng.mL^{-1} : (-) - água do ponto 1(B); (-) – água Milli-Q. Condições cromatográficas de acordo com a Tabela 4.11.....	115
FIGURA 4.43 – Efeito de matriz por infusão pós-coluna para o pantoprazol na concentração de 100 ng.mL^{-1} : (-) - água do ponto 1(B); (-) – água Milli-Q. Condições cromatográficas de acordo com a Tabela 4.11.....	115
FIGURA 4.44 – Cromatograma referente à amostra de CQM, (-) lansoprazol e (-) pantoprazol. Condições cromatográficas de acordo	121

com a Tabela 4.4.....

RESUMO

“Métodos para a determinação enantiomérica dos fármacos omeprazol, lansoprazol e pantoprazol em águas residuais e de estuário”.

O uso de colunas de fases de acesso restrito para injeção direta de amostras quimicamente complexas está consolidado, mas não para amostras ambientais. Este trabalho descreve as condições para exclusão de ácidos húmicos e fúlvicos aquáticos. As análises foram feitas comparando as áreas obtidas após injeção direta dos padrões numa coluna cromatográfica de permeação em gel (Tsk gel[®] G3000PWXL), e as obtidas no modo *in-line* com as colunas RAM-BSA. Através de uma curva de calibração utilizando padrões de poliestirenos sulfonatos de sódio com diferentes pesos moleculares foi determinado, na ordem de 18000 Da, o peso molecular das frações eluídas. Este trabalho reporta o desenvolvimento, validação e aplicação de métodos sensíveis, precisos e exatos, por cromatografia líquida de alta eficiência com injeção direta de amostras para a determinação enantiosseletiva dos fármacos omeprazol, pantoprazol e lansoprazol, em matrizes ambientais (água residual da cidade de São Carlos-Brasil e água do estuário do Rio Douro, Porto-Portugal). Os métodos foram desenvolvidos por cromatografia líquida multidimensional utilizando-se uma coluna de fase acesso restrito de albumina sérica bovina (RAM-BSA C₈), na primeira dimensão, para exclusão das macromoléculas e para extração dos fármacos. A separação enantiomérica do omeprazol foi realizada na segunda dimensão com uma coluna quiral, tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose em APS-Nucleosil e, para os métodos envolvendo a separação enantiomérica simultânea do lansoprazol e pantoprazol foi utilizada a coluna quiral tris (3,5-dimetoxifenilcarbamato) de amilose em APS-Nucleosil. Alíquotas de 500µL das amostras foram injetadas diretamente no sistema cromatográfico multidimensional com detecção por espectroscopia na região do ultravioleta-

visível (UV-vis). Os limites de quantificação obtidos para os enantiômeros do omeprazol foram de $15\mu\text{g.L}^{-1}$, e para os enantiômeros do lansoprazol e pantoprazol $5,0$ e $7,5\mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. Limites inferiores de quantificação foram obtidos para os enantiômeros do lansoprazol ($0,60\mu\text{g.L}^{-1}$) e pantoprazol ($0,40\mu\text{g.L}^{-1}$), pela substituição do detector de UV-vis por um espectrômetro de massas, no modo MRM (*Multiple Reaction Monitoring*), e aumento do volume de injeção para $1000\mu\text{L}$.

ABSTRACT

“Methods for the enantiomeric determination of omeprazole, lansoprazole and pantoprazole drugs in estuarine and wastewaters”.

The use of restricted access media columns for direct injection of samples chemically complex is consolidated, but not for environmental samples. This work describes the conditions for exclusion of aquatic fulvic and humic acids. The analyses were performed comparing the areas obtained after direct injection of standards in a chromatography column of gel permeation (Tsk gel[®] G3000PWXL), and those obtained in in-line mode with the RAM-BSA. Through a calibration curve, using standards of sodium polystyrene sulfonates of different molecular weights, in order of the 18000 Da, the molecular weight of eluted fractions were determined. This work reports the development, validation and application of sensitive, precise and accuracy methods, by high performance liquid chromatography with direct injection of samples for the enantioselective determination of omeprazole, lansoprazole and pantoprazole drugs in environmental matrices (wastewater from the city of São Carlos, Brazil and estuarine water of the River Douro, Porto-Portugal). The methods were developed by multidimensional liquid chromatography using an octyl restricted access media bovine serum albumin column (RAM-BSA C₈) in the first dimension for the exclusion of macromolecules and extraction of drugs. The enantiomeric separation of omeprazole was achieved in the second dimension with a chiral column, amylose tris (3,5-dimethylphenylcarbamate) coated onto APS-Nucleosil support, and the chiral column amylose tris (3,5-dimethoxyphenylcarbamate) coated onto APS-Nucleosil support it was used for simultaneous enantiomeric separation of lansoprazole and pantoprazole. Aliquots of 500 μ L of the samples were injected directly into the multidimensional chromatographic system with detection for ultraviolet-visible

spectroscopy (UV-vis). The quantification limits obtained for the enantiomers of omeprazole were $15\mu\text{g.L}^{-1}$, and for the enantiomers of lansoprazole and pantoprazole 5.0 and $7.5\mu\text{g.L}^{-1}$, respectively. Lower quantification limits were obtained for the enantiomers of lansoprazole ($0,60\mu\text{g.L}^{-1}$) and pantoprazole ($0,40\mu\text{g.L}^{-1}$) by replacement of the UV-vis detector for the mass spectrometer in a multiple reaction monitoring (MRM) mode and increasing the injection volume for $1000\mu\text{L}$.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Fármacos no meio ambiente

Os POPs (Poluentes Orgânicos Persistentes) e metais pesados, até o início dos anos 90, eram os poluentes de maior prioridade nos programas de monitoramento.¹⁻⁴ Atualmente uma nova classe de contaminantes, denominada “emergentes”, constituída por surfactantes, produtos farmacêuticos, de higiene pessoal e aditivos empregados na gasolina como o MTBE (éter metil-terc-butílico), vêm se destacando como um problema ambiental.^{1,3} No entanto, estudos envolvendo o monitoramento e efeitos adversos à biota são recentes, e chamam a atenção para o desenvolvimento de uma legislação que defina limites para a presença dessas substâncias no ambiente. Uma característica importante destes contaminantes é que eles não necessitam persistir no ambiente para causar efeitos negativos já que são introduzidos continuamente.¹⁻⁴

Os contaminantes polares, tais como os fármacos e outras classes de compostos (ex: pesticidas e alguns metabólitos) necessitam de uma atenção especial devido às suas propriedades físico-químicas (elevada solubilidade em água e baixa degradabilidade), já que são capazes de penetrar por todas as etapas de filtração natural e em estações de tratamento de esgotos (ETEs), comprometendo a qualidade da água potável.^{1,3} O tempo de meia-vida dos fármacos no ambiente aquático normalmente é de poucos dias ou horas entretanto, esta baixa persistência no ambiente é compensada pelo seu contínuo despejo, o que leva os organismos aquáticos a uma exposição crônica a estes compostos.⁵

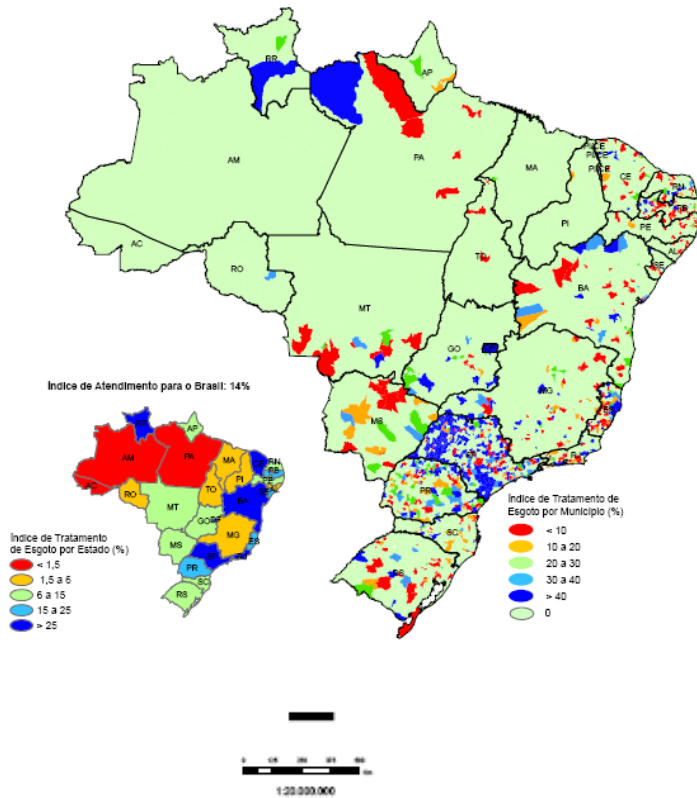
A toxicidade e o risco ambiental que os fármacos podem causar quando despejados no ambiente é uma área de pesquisa que vem aumentando com o passar dos anos. Trabalhos realizados nos últimos 10 anos, através de cálculos de risco ambiental e testes de toxicidade com microorganismos

aquáticos, algas e peixes, revelam os efeitos adversos que o despejo de fármacos em ambientes aquáticos ou terrestres pode causar na biota.⁵⁻¹³ De acordo com Daughton *et al.*¹⁴, dentre as classes de fármacos, os antibióticos despertam grande interesse uma vez que a presença deles no ambiente pode ocasionar a existência de bactérias resistentes. A classe de esteróides pode causar alterações na reprodução e no desenvolvimento dos organismos aquáticos.⁶

Anualmente, toneladas de medicamentos são produzidas e aplicadas na medicina humana e veterinária, o que torna a ocorrência dessas substâncias um importante tópico de pesquisa mundial. As maiores fontes de contaminação ambiental pelos fármacos são provenientes de águas residuais despejadas *in natura* e das ETEs.^{3,15} Esta última, em virtude da incompleta remoção desses contaminantes durante o tratamento, levando a uma grande quantidade dos fármacos originais e seus metabólitos despejados no ambiente aquático.^{3,15,16}

Dados da Agência Nacional de Águas (ANA) de 2005 mostram que a percentagem de tratamento de esgoto no Brasil é de apenas 14%, como pode ser observado no mapa da Figura 1.1. Sendo assim, o lançamento de esgoto doméstico *in natura* nos corpos hídricos é o principal fator que compromete a qualidade das águas utilizadas tanto para o abastecimento público como para a irrigação e recreação.¹⁷

O monitoramento de fármacos residuais no meio ambiente vem ganhando grande interesse devido ao fato de muitas dessas substâncias serem freqüentemente encontradas em efluentes das ETEs e águas superficiais, em concentrações na faixa de ng.L^{-1} a $\mu\text{g.L}^{-1}$.^{1,15} A Tabela 1.1 exemplifica a contaminação com fármacos do ambiente aquático brasileiro.



Estado	Índice de tratamento de esgoto (%)
Acre	0
Amazonas	0
Pará	1
Tocantins	2
Rondônia	2
Maranhão	2
Alagoas	3
Piauí	6
Minas Gerais	6
Rio Grande do Norte	6
Rio Grande do Sul	6
Amapá	7
Goias	10
Santa Catarina	12
Mato Grosso	14
Mato Grosso do Sul	15
Pernambuco	15
Sergipe	19
Espírito Santo	20
Paraná	20
Paraíba	24
Ceará	26
Roraima	26
Rio de Janeiro	32
São Paulo	32
Bahia	40
Distrito Federal	46
Total Brasil	14

FIGURA 1.1 - Índice de tratamento de esgoto por estado e município, no Brasil.¹⁷

Stumpf *et al.*¹⁸, determinaram a existência de resíduos de reguladores lipídicos, antiinflamatórios e alguns metabólitos em esgoto, efluentes de ETE e águas de rios no estado do Rio de Janeiro. A concentração média encontrada para a maioria dos fármacos estudados, nos efluentes da ETE apresentou-se na faixa de 0,100 a 1,00 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Nos rios, a concentração esteve entre 0,020 e 0,040 $\mu\text{g.L}^{-1}$, devido a uma remoção incompleta dos fármacos na

ETE (a taxa de remoção de cada fármaco variou de 12,0 a 90,0%) e pelo descarte de esgoto *in natura*.

TABELA 1.1 - Concentrações médias de fármacos detectados no meio ambiente aquático – Dados obtidos em amostras coletadas no Rio de Janeiro, Brasil.¹⁵

Substâncias	Concentrações médias ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Condições
Ácido clofibrico	1,00	Esgoto doméstico
	0,020 a 0,030	Água superficial
Bezafibrato	1,20	Esgoto doméstico
	1,00	Efluente de ETE
	0,025	Água superficial
Diclofenaco	0,020 a 0,060	Água superficial
17 α -etinilestradiol	0,005	Esgoto doméstico
17 β -estradiol	0,021	Esgoto doméstico
Estrona	0,020 a 0,050	Água superficial
	0,040	Esgoto doméstico
Ibuprofeno	0,010	Águas superficiais

Em outro estudo, Ternes *et al.*¹⁹ determinaram a quantidade de estrogênios naturais e contraceptivos sintéticos, em esgoto bruto e tratado. A técnica analítica utilizada foi a cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas (CG/MS-MS) aliada à extração em fase sólida (SPE) para tratamento da amostra. Em esgoto bruto, os estrogênios 17 β -estradiol e estrona foram detectados nas concentrações de 0,021 e 0,040 $\mu\text{g/L}$, respectivamente. As taxas de remoção para o efluente tratado em filtro biológico foram de 67,0% para a estrona, 92,0% para o 17 β -estradiol e 64,0% para o estrogênio usado como contraceptivo, 17 α -etinilestradiol. Para o efluente tratado no tanque de lodo ativado, as taxas para a estrona, 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol foram, respectivamente, 83,0, 99,9 e 78,0%.

Trabalhos recentes como o de Feitosa-Fenizzola *et al.*²⁰, Yang *et al.*²¹ e Batt *et al.*²² analisam a presença de diferentes antibióticos em águas residuais, utilizando como ferramenta analítica CLAE/MS-MS associado à extração em fase sólida, para desenvolver e validar métodos multi-residuais para a quantificação dos fármacos.

1.1.1 - A trajetória do fármaco no meio ambiente

Após a administração, seja na medicina humana ou veterinária, os fármacos são absorvidos, metabolizados e excretados pelo organismo. Assim, uma quantidade significativa dos compostos originais e também de seus metabólitos são excretados na urina e nas fezes.⁵

Na ETE, o fármaco pode ter 3 caminhos: ser mineralizado a gás carbônico e água (ex: biodegradação do ácido acetilsalicílico); passar por um processo metabólico ou degradar parcialmente (ex: penicilina); ser persistente no meio (ex: clofibrato).¹⁵

Alguns fármacos também podem ser absorvidos pelo lodo do fundo dos tanques de decantação nas ETE e, assim, contaminar o ambiente terrestre quando este sedimento for utilizado como fertilizante agrícola.¹² Uma outra maneira de contaminar os solos é a através das fezes de animais ao qual foram administrados fármacos. Devido ao processo de escoamento superficial e/ou percolação vertical, estes fármacos podem atingir as águas subterrâneas e também podem ser carregados pela chuva, sendo despejados em águas superficiais.¹² A Figura 1.2 mostra possíveis fontes e caminhos para os fármacos descartados no meio ambiente.

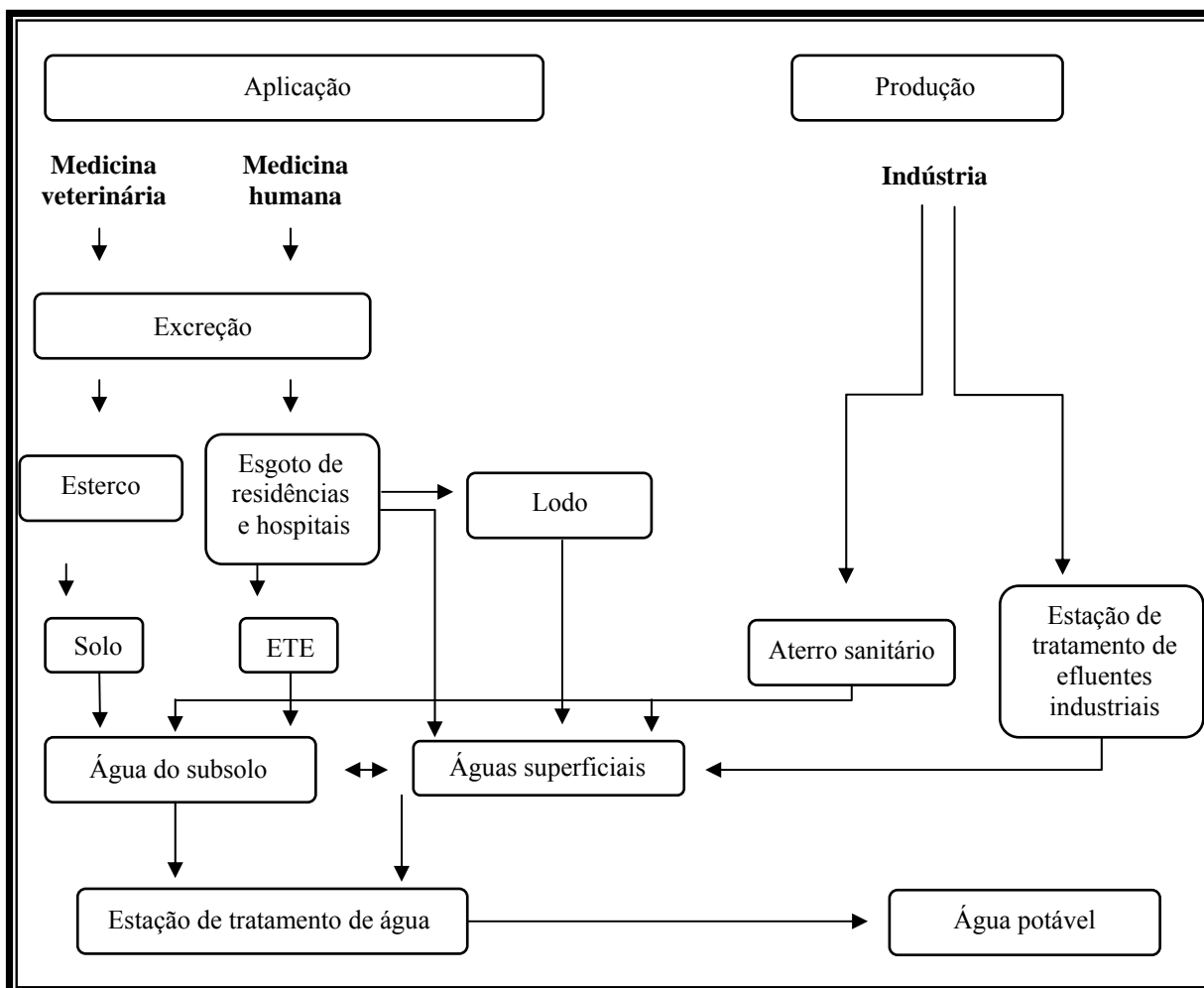


FIGURA 1.2 - Possíveis rotas de fármacos no meio ambiente.^{3,15,23}

Estudos envolvendo a investigação do impacto ambiental causado por fármacos em ambiente aquático são relevantes, sendo necessário o conhecimento da quantidade dessas substâncias no meio ambiente, assim como o monitoramento tanto na forma ativa ou como metabólitos, que possam causar efeitos adversos à biota.¹⁵

1.2 - Contaminantes quirais

Nos últimos anos têm-se enfatizado a contaminação do meio ambiente por compostos quirais, os quais apresentam propriedades termodinâmicas similares, mas diferenças em ação quando no meio ambiente e/ou em sistemas biológicos.^{24,25}

Uma maior importância em um controle no despejo de contaminantes quirais no meio ambiente tem sido dada a partir da década de 90.^{24,25} Isto porque grande parte dos compostos orgânicos são quirais e estes são despejados no ambiente como misturas racêmicas.²⁴ Os enantiômeros normalmente apresentam diferenças toxicológicas e biológicas e também os processos bioquímicos, na natureza, são estereoespecíficos.²⁶ Assim, enquanto um enantiômero pode ser metabolizado por microorganismos o outro pode ser acumulado no meio ambiente, como no caso dos pesticidas quirais, onde um dos enantiômeros é ativo contra insetos, ervas daninhas e outras pragas e a outra forma é inativa.^{24,25}

Nos últimos anos têm sido crescente o emprego da cromatografia quiral com detecção por espectrometria de massas para a separação e detecção destes enantiômeros mesmo em baixas concentrações, o que permite estudar seus comportamentos individuais na natureza.²⁴ Pesquisas recentes têm mostrado que o comportamento de compostos quirais no meio ambiente não é claro, já que não é sempre possível prever as transformações estereosseletivas.²⁵

Os fármacos, em sua grande maioria, são comercializados na forma de mistura racêmica (na proporção de 1:1 de cada enantiômero). No entanto, quando expostos aos sistemas aquáticos esta relação não é mantida em virtude da presença de microorganismos, os quais são responsáveis pelo metabolismo diferenciado entre os enantiômeros com processos enzimáticos estereosseletivos.^{24,27} Um exemplo é o estudo realizado por Buser *et al.*²⁸ que investigaram a composição do filtro de UV 4-MBC no ambiente aquático, ressaltando que o 4-MBC existe na forma dos diastereoisômeros (E) e (Z), no qual foram observadas diferenças na concentração dos enantiômeros (R) e (S) nas amostras de esgoto *in natura* e tratado indicando a ocorrência de biodegradação enantiosseletiva.

A degradação ou biodegradação enantiosseletiva de compostos quirais também foi observada por Liu *et al.*²⁹ trabalhando com inseticidas quirais organofosforados e piretróides. Foi observada uma grande diferença entre os enantiômeros em relação à toxicidade em invertebrados de água doce, além de uma degradação enantiosseletiva.

1.3 - Cromatografia Quiral

O uso da CLAE para a determinação da pureza enantiomérica de compostos quirais, obtenção de enantiômeros puros em grandes escalas, estudos farmacocinéticos e farmacodinâmicos de cada enantiômero, fez com que esta técnica se desenvolvesse rapidamente nos últimos anos.^{30,31}

Os enantiômeros podem ser separados, por CLAE, pelo método indireto ou direto.^{32,33}

A maneira clássica para se resolver enantiômeros, pelo método indireto, envolve a derivação da mistura enantiomérica com um reagente quiral, resultando na formação dos respectivos diastereoisômeros que, por apresentarem propriedades termodinâmicas distintas, podem ser separados usando fases estacionárias aquirais³²⁻³⁴. Aminas, carbamatos e uréias são os produtos diastereoisoméricos mais comuns das reações de misturas racêmicas com reagentes quirais.³⁴

Esse método apresenta a vantagem de se trabalhar com fases convencionais. No entanto, para obter somente a formação de um par de diastereoisômeros é necessária uma alta pureza do reagente quiral e, em condições de cromatografia preparativa, faz-se necessário a conversão dos diastereoisômeros para se obter os enantiômeros na sua forma pura, tornando o processo indireto desvantajoso.³²⁻³⁴ Uma outra desvantagem é a possível formação de proporções diferentes de produto, através de uma reação incompleta entre o composto quiral e o reagente quiral.³³

Uma outra maneira para a separação de enantiômeros, por CLAE, envolve a resolução direta destes, onde é necessário que exista um reconhecimento quiral entre a mistura enantiomérica e o seletor quiral. Este seletor quiral deve associar-se preferencialmente a um dos enantiômeros, e tanto pode estar ancorado à fase estacionária (fases estacionárias quirais) como pode ser um aditivo da fase móvel.³³⁻³⁵

O mecanismo de separação está relacionado com a formação de um complexo diastereoisomérico entre o seletor quiral e cada um dos enantiômeros e a diferença de energia entre os complexos formados resulta em diferentes tempos de retenção.³³ Assim, o enantiômero que forma o complexo menos estável elui primeiro e é importante que a diferença de energia entre os complexos seja significativa para que a discriminação quiral ocorra.³³⁻³⁵

O uso de aditivos na fase móvel apresenta como vantagens a utilização de colunas convencionais e a possibilidade de utilização de diversos aditivos em uma mesma coluna.³³ As desvantagens deste procedimento são: o custo elevado de usar aditivos quirais na fase móvel, uma vez que é consumido um grande volume de solvente em cada análise; em cromatografia preparativa os aditivos devem ser removidos dos enantiômeros após a separação; e os modos de detecção ficam limitados à escolha dos aditivos.³³

O uso de colunas com fases estacionárias quirais apresenta como vantagens: não ser necessária a derivação preliminar da mistura enantiomérica, há uma grande variedade de colunas quirais disponíveis comercialmente, as análises cromatográficas são rápidas e os enantiômeros puros podem ser recuperados com relativa facilidade.^{33,34} Embora essas fases estacionárias apresentem um elevado custo e o mecanismo de separação quiral ainda não seja completamente elucidado para todas as fases, este é o método de separação de enantiômeros que tem conseguido maior destaque e aplicabilidade.^{33,34,36}

O desenvolvimento de fases estacionárias quirais (CSP) vem aumentando com o decorrer dos anos, devido a praticidade e versatilidade destas

fases, podendo ser utilizadas tanto em escala analítica quanto preparativa.³⁷ Estas fases são preparadas a partir de pequenas moléculas ou polímeros quirais adsorvidos ou quimicamente ligados a um suporte, geralmente sílica.³⁸

A separação de enantiômeros através de fases estacionárias quirais está baseada nas diferentes energias livres de Gibbs dos complexos diastereoisoméricos formados entre o seletor quiral e cada enantiômero.^{34,36,39}

Os seletores quirais são divididos em dois tipos; o primeiro envolve moléculas quirais pequenas, geralmente ligadas à suportes de sílica gel ou polímeros orgânicos e o segundo inclui os derivados de polissacarídeos, proteínas e polímeros sintéticos, como as poliacrilamidas e os polimetacrilatos.³⁶ Berthod *et al.*³⁹ dividiu os seletores quirais em naturais e sintéticos, como mostra a Tabela 1.2.

TABELA 1.2 – Seletores quirais.³⁹

Seletor	Principais interações
Seletores sintéticos	
Troca de ligante	Coulômbica ou íon-dipolo
TipoPirkle	π - π
MIPs	Forma de interação seletiva com a impressão
Éteres de coroa quirais	Íon-dipolo
Polímeros	Ligações de hidrogênio
Seletores naturais	
Proteínas	Variáveis
Polissacarídeos	Ligações de hidrogênio, dipolar ou estérica
Ciclodextrinas	Ligações de hidrogênio
Glicopeptídeos macrocíclicos	Variáveis
Alcalóides da <i>Cinchona</i>	Coulômbica

MIPs: *Molecularly Imprinted Polymers* (do inglês)

Algumas fases estacionárias quirais são comercializadas³⁶, mais de 100 diferentes tipos, e as mais utilizadas estão apresentadas na Tabela 1.3.

TABELA 1.3 – Exemplos de fases estacionárias quirais disponíveis comercialmente.⁴⁰

SELETOR QUIRAL	NOME COMERCIAL	FABRICANTE
SELETOR DE BAIXA MASSA MOLAR		
D-dinitrobenzoilfenilglicina	CHIRAL 2	MACHEREY-NAGEL
L- dinitrobenzoilfenilglicina	CHIRAL 3	MACHEREY-NAGEL
(3R, 4R)-4-(3,5-dinitrobenzamido)1,2,3,4-tetraidrofenantreno	(S,S)-Whelk-01	REGIS TECHNOLOGIES
(3R, 4R)-4-(3,5-dinitrobenzamido)1,2,3,4-tetraidrofenantreno	(R,R)-Whelk-01	REGIS TECHNOLOGIES
TROCA DE LIGANTE		
N,N dioctil-L-alanina	CHIRALPAK MA (+)	DIACEL
L-hidroxiprolina-cobre	CHIRAL 1	MACHEREY-NAGEL
ANTIBIÓTICOS MACROCÍCLICOS		
Vancomicina	CHIROBIOTIC V	ADVANCED
Teicoplanina	CHIROBIOTIC T	SEPARATION
Ristocetina	CHIROBIOTIC R	TECHNOLOGIES
ÉTER DE COROA		
(S)-18-coroa-6-éter	CROWNPAK CR (+)	DIACEL
(R)-18-coroa-6-éter	CROWNPAK CR (-)	DIACEL
CICLODEXTRINAS		
β - ciclodextrinas	NUCLEODEX β -OH	MACHEREY-NAGEL
β - ciclodextrinas permetilada	NUCLEODEX β -PM	MACHEREY-NAGEL
β - ciclodextrinas fenilcarbamato	ULTRON Es-PhCD	SHINWA CHEM.IND.
PROTEÍNAS		
Soroalbumina bovino	RESOLVOSIL BSA-7	MACHEREY-NAGEL
	ULTRON ES-BSA	SHINWA CHEM.IND.
	CHIRAL BSA	SHANDON
Soroalbumina humano	CHIRAL HSA	SHANDON
	CHIRAL-HSA	CHROMTECH AB
Ovomucóide	ULTRON Es-OVM	SHINWA CHEM.IND.
Avidina	BIOPTIC AV-1	GL SCIENCES
Celobioidrolase I	CHIRAL-CBH	CHROMTECH AB
Pepsina	ULTRON Es-PEPSIN	SHINWA CHEM.IND.

O modelo de reconhecimento quiral proposto é baseado na teoria dos três pontos, onde são necessários no mínimo três pontos de interação entre o

enantiômero e o seletor quirais (Figura 1.3).³⁹ Estas interações devem ser simultâneas e com três diferentes substituintes do centro estereogênico. Dependendo do número de interações existentes entre o seletor quirais e o enantiômero, há a formação de dois complexos diastereoisoméricos intermediários com energia livre de Gibbs distinta e esta diferença de energia que determina a ordem de eluição de cada enantiômero, no qual o que forma o complexo menos estável é o primeiro a eluir.³⁹

Os seletores quirais do tipo MIP (Molecularly Imprinted Polymers) são preparados através da impressão de um dos enantiômeros da mistura, como um monômero funcional, levando a uma maior afinidade entre a fase estacionária e o enantiômero usado como modelo. Assim, estes seletores quirais tornam-se muito específicos.³⁹ Alguns enantiômeros já utilizados como modelos foram: (-)-efedrina, (+)-clorfeniramina, 2-L-, 3-L- and 4-L-fenilalanilaminopiridinas, ácido N-benziloxicarbonil-L-glutâmico, N-(carbobenziloxi)-L-triptofano, Fmoc-L-triptofano, cinconina, cinconidina, quinidina, quinina, e (S)-nilvadipina.³⁷

O uso de proteínas e glicoproteínas como seletores quirais é válido, devido ao seu papel biológico de discriminação quirais dos fármacos e nutrientes do organismo. Assim, elas permitem discriminação de vários compostos carregados e neutros.^{39,41,42} As proteínas presentes em fases estacionárias quirais são a albumina sérica bovina e humana, ovotransferina e β -lactoglobulina, enzimas como a tripsina, α -quimotripsina, celobiohidrolase I, lisozima, pepsina e amiloglucosidase também são utilizadas, assim como as glicoproteínas α_1 -glicoproteína ácida, ovomucóide, ovoglicoproteína, avidina e riboflavina.⁴²

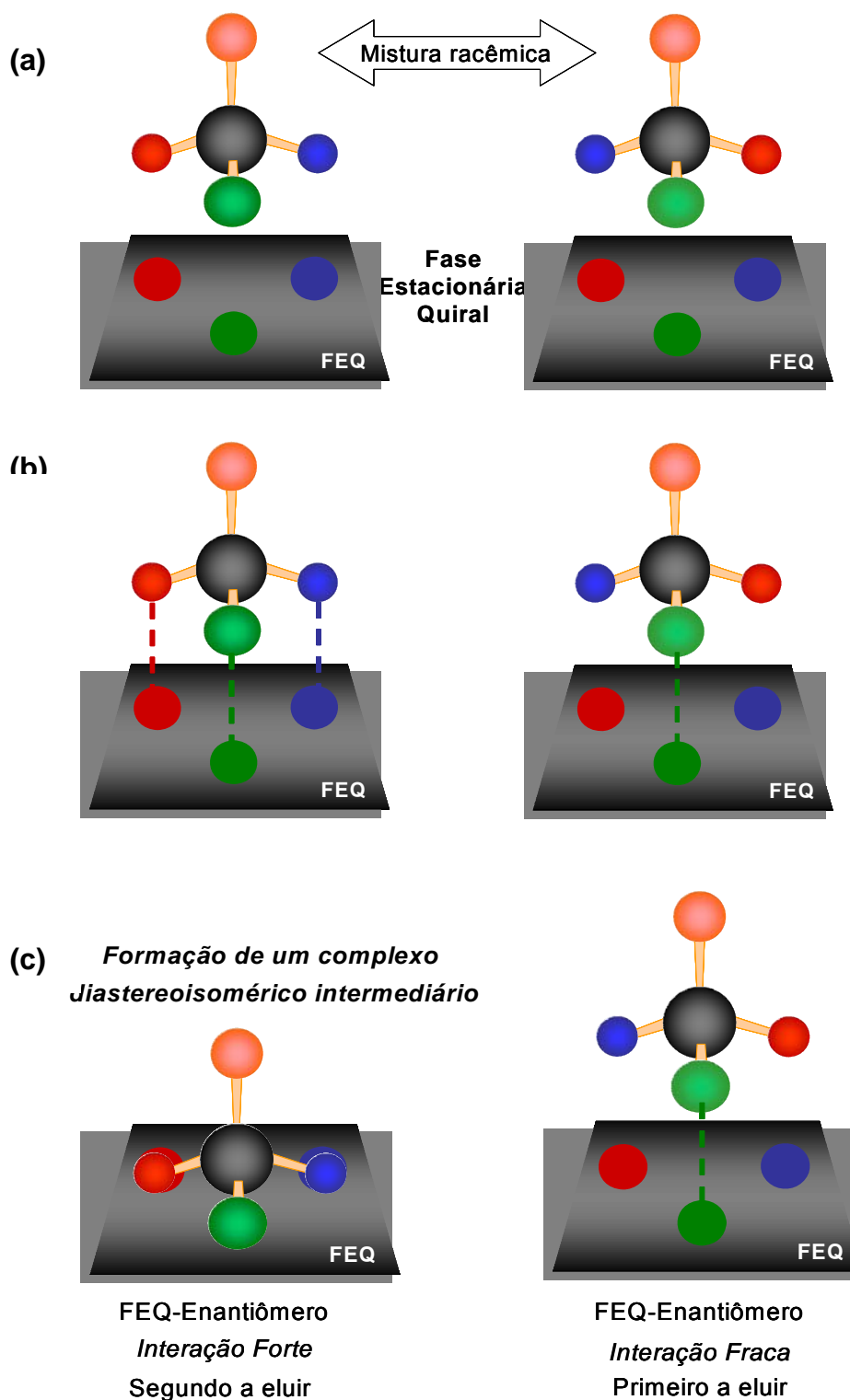


FIGURA 1.3 – Princípio da resolução quiral. (a) Fase estacionária quiral e mistura racêmica (b) Interação baseada na regra de três pontos (c) Formação do complexo diastereoisomérico intermediário e determinação da ordem de eluição.⁴³

Armstrong *et al.*⁴⁴ utilizaram antibióticos macrocíclicos como seletores quirais, obtendo boa discriminação quiral para uma variedade de compostos, incluindo D e L-aminoácidos, nos dois modos de eluição. Os antibióticos macrocíclicos se assemelham às proteínas em relação à enantiosseletividade, com a vantagem da ausência de problemas com estabilidade e baixa capacidade.

Trabalhos recentes, como os de Haginaka *et al.*^{41,42} e Ilisz *et al.*³¹ revelam as diversas fases estacionárias quirais de proteínas e glicoproteínas desenvolvidas para a enantioseparação de diferentes compostos.

As ciclodextrinas, também utilizadas como fases estacionárias quirais, podem ser obtidas contendo seis (α), sete (β) ou oito (γ) unidades de glicose e o mecanismo de discriminação quiral está baseado na inclusão do soluto na cavidade quiral.³⁹ Derivados de ciclodextrina como ésteres, éteres e carbamatos ligados em sílica estão sendo empregados na resolução de vários compostos e na determinação de excessos enantioméricos de produtos obtidos em síntese assimétrica.³⁷

Trabalhos desenvolvidos por Okamoto *et al.*⁴⁵ demonstraram que uma grande variedade de derivados de polissacarídeos, particularmente de amilose e celulose, podem ser aderidos à sílica gel, fornecendo fases estacionárias quirais com grande capacidade de resolução para compostos ácidos, básicos e neutros. A celulose é um polímero linear formado de anéis de D-glicose conectados por ligações β -1,4 e a amilose é formada pelas mesmas unidades de açúcar, conectadas por ligações α -1,4 o que lhe confere uma estrutura helicoidal.

As primeiras fases estacionárias quirais obtidas a partir de polissacarídeos foram desenvolvidas por Hesse e Hagel em 1973.⁴⁶ Uma delas é a triacetato de celulose (Figura 1.4), obtida através da acetilação da celulose microcristalina. Esta fase apresentou discriminação quiral para vários compostos, provavelmente por preservar a estrutura cristalina da celulose e

permitir a inclusão nas cavidades quirais; entretanto, quando o triacetato de celulose era dissolvido em um solvente e re-precipitado, ele perdia a discriminação quiral.

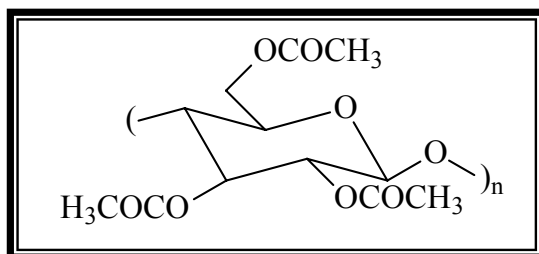


FIGURA 1.4 - Estrutura química da fase quiral triacetato de celulose.

Em 1984, Okamoto *et al.*⁴⁷ realizaram a solubilização do triacetato de celulose e o adsorveram em sílica gel macroporosa (1000-4000 Å). Esta nova fase estacionária mostrou-se mais eficiente e mais resistente, comparada à fase não adsorvida. E assim, os autores descrevem o preparo de fases estacionárias quirais com os tris-benzoatos, tris-fenilcarbamatos e tris-arilcarbamatos de polissacarídeos adsorvidos em sílica gel macroporosa.^{45,48} As fases foram preparadas através da modificação dos grupos hidroxilas livres do polissacarídeo, resultando em derivados como ésteres orgânicos, nitratos, carbamatos e éteres. Os resultados obtidos mostraram que os carbamatos e ésteres são os derivados que apresentam maior poder de discriminação quiral.^{45,48} Estas fases foram comercializadas inicialmente pela Diacel[®] e após quebra da patente são comercializadas por diferentes fabricantes.

A capacidade de discriminação quiral destas fases está relacionada com as diferenças estruturais dos polímeros de celulose e amilose que afetam a geometria e o tamanho das cavidades quirais e, principalmente, com os seus diferentes grupos substituintes, que são responsáveis por mudanças na habilidade da fase quiral em formar ligações de hidrogênio, interação dipolo-dipolo e transferência de carga na formação do complexo.⁴⁹

As colunas derivadas de amilose, especialmente as fenilcarbamatos, freqüentemente apresentam uma maior capacidade enantiosseletiva, sendo que a unidade estrutural do carbamato é considerada o sítio de adsorção mais importante.⁵⁰ Exemplificando, compostos quirais com grupos polares, capazes de formar ligações de hidrogênio, podem interagir com a carbonila e a amina dos grupos carbamatos da fase estacionária. Para compostos quirais apolares, a separação é promovida principalmente por interações π - π entre o grupo fenilcarbamato da fase quiral e um grupo aromático capaz de contribuir para o reconhecimento quiral.³⁴ A Figura 1.5 ilustra as possíveis interações entre o soluto e o carbamato.

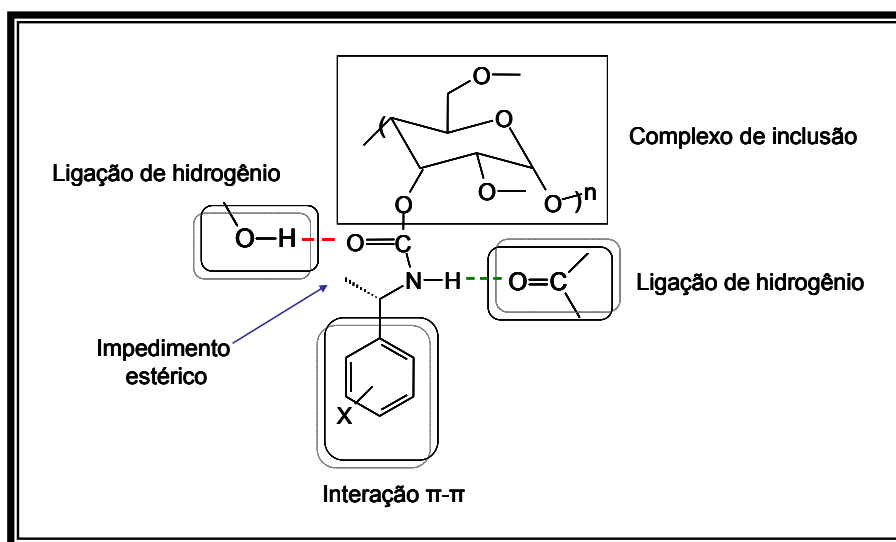


FIGURA 1.5 - Possíveis interações do carbamato com compostos quirais. Como exemplo, temos a fase estacionária quiral de polissacarídeo tris-[1-(S)-feniletilcarbamato] de amilose.⁴³

Nos derivados tris-benzoatos, os grupos carbonila dos éteres podem interagir com enantiômeros através de ligações de hidrogênio e interações dipolo-dipolo.^{34,51} O grupo fenila do tris-benzoato de celulose pode ser substituído e a habilidade de reconhecimento quiral é influenciada pelo grupo substituinte do anel aromático; com grupos doadores de elétrons, como a metila,

a habilidade de reconhecimento quiral é maior quando comparada com a substituintes aceptores de elétrons, como o cloro.⁵¹

Apesar da grande versatilidade para a resolução de vários compostos, as fases de polissacarídeos apresentam limitação com relação aos solventes que podem ser utilizados, devido a parcial solubilidade dos carbamatos em solventes como tetraidrofurano (THF), dioxano, tolueno, acetato de etila e solventes clorados.⁴⁹ Contudo, trabalhos recentes mostram que a imobilização química do seletor quiral, em diferentes suportes cromatográficos, possibilita o uso de uma variedade de solventes.^{36,52,53}

Embora os fabricantes de colunas baseadas em derivados de polissacarídeos recomendem colunas específicas para cada modo de eluição, CASS *et al.*⁵⁴ realizaram um estudo que demonstrou a possibilidade de uma mesma coluna de polissacarídeo, tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose, ser utilizada no modo normal, reverso e polar orgânico, sem comprometimento da sua performance ou degradação da fase estacionária. Este fato veio a aumentar ainda mais a aplicabilidade destas colunas para separações quirais.

Vários compostos têm sido enantiorresolvidos em colunas de polissacarídeos nos diversos modos de eluição, devido a sua estabilidade, eficiência e alta capacidade de discriminação quiral.⁵⁴⁻⁵⁷ Alterações nas enantiosseparações e enantiorresoluções são conseguidas mediante variações na composição e no tipo das fases móveis utilizadas.⁵⁵⁻⁵⁷ Sendo assim, as fases estacionárias quirais de polissacarídeos foram selecionadas para este trabalho.

1.4 - Fármacos selecionados

A Lei dos Genéricos (nº 9.787/99) entrou em vigor no Brasil no ano de 1999 e os primeiros medicamentos, lançados pela indústria farmacêutica EMS-Sigma Pharma, chegaram às farmácias em fevereiro de 2000. A implantação do programa brasileiro de medicamentos genéricos causou uma

mudança no mercado nacional e, desde então, o mercado geral de medicamentos de referência caiu e os genéricos vendem cada vez mais.⁵⁸⁻⁶⁰

Segundo dados do jornal “O Estado de São Paulo”, no ano de 2006 as vendas da indústria farmacêutica em todo o país cresceram apenas 1,00%, considerando o número de unidades, o mercado caiu 2,30%, enquanto os genéricos cresceram 29,1% em 2005, sendo que as principais empresas (EMS-Sigma Pharma, Medley e Ache) registraram um crescimento nas vendas superior a 30,0%.

Após cinco anos do lançamento de medicamentos genéricos no Brasil, algumas substâncias já lideravam o mercado, como por exemplo, o antiulceroso representado pelo genérico omeprazol; o qual apresentou um ganho de participação no mercado de 47,0 para 64,0%, passando de 1.484 milhões de unidades em 2001 para 2.536 milhões de unidades em 2004, o que representa uma evolução de 71,0%.⁶¹ Segundo dados do Infarmed as vendas do genérico do fármaco omeprazol no período de janeiro a outubro de 2008, em Portugal, representam 91%.

Outros medicamentos antiulcerosos como o esomeprazol e o lansoprazol ocupam a lista dos Blockbusters (aqueles com vendas anuais superiores a US\$ 1 bilhão) mundialmente consumidos. No Brasil, os antiulcerosos omeprazol, lansoprazol e pantoprazol são comercializados por 57 diferentes laboratórios e são amplamente utilizados no tratamento de distúrbios ácidos no trato gastrointestinal, tais como ulcerações duodenais, gástricas e do esôfago. O omeprazol, por exemplo, no ano de 2008 teve uma venda de aproximadamente 18.000 unidades nas farmácias populares, de acordo com a secretaria do estado de MT.⁶²

Dentre estes três fármacos, o único comercializado na forma enantiomericamente pura é o (-)-omeprazol, com o nome comercial de Nexium[®]. Portanto, devido ao elevado consumo destes fármacos tanto no Brasil

como no mundo, eles foram selecionados para o desenvolvimento deste trabalho.

1.4.1 - Omeprazol, lansoprazol e pantoprazol

Estes benzimidazóis substituídos (Figura 1.6), pertencentes à classe dos anti-secretores, suprimem a secreção ácido-gástrica pela inibição específica do sistema enzimático H^+/K^+ Adenosina Tri-fosfatase (H^+/K^+ -ATP-ase) na superfície excretora da célula gástrica parietal.⁶³

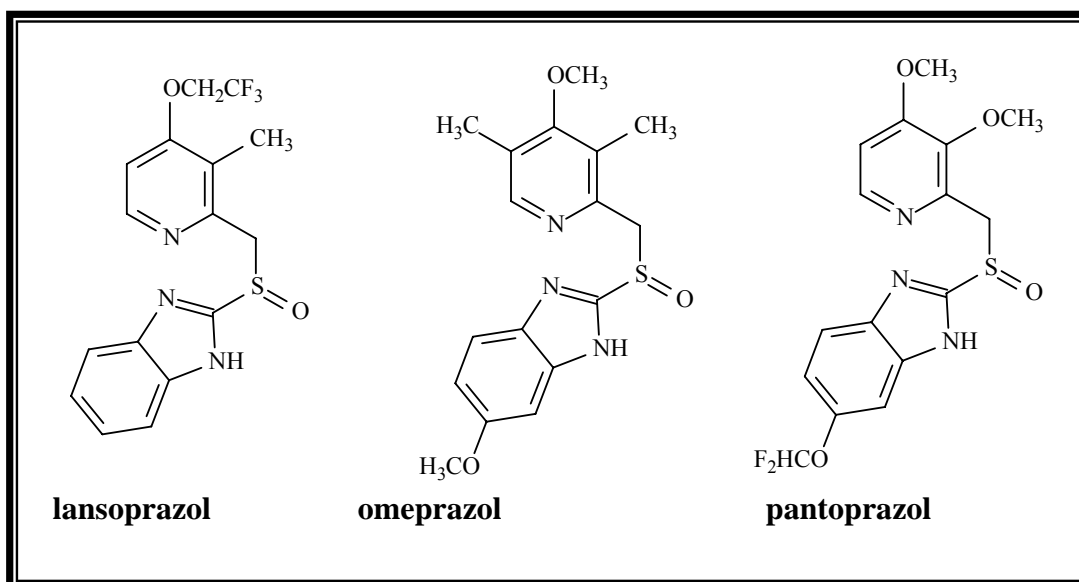


FIGURA 1.6 - Representação estrutural de inibidores da bomba H^+/K^+ -ATPase.

Esses compostos possuem propriedades farmacológicas similares e todos são pró-fármacos que necessitam ser ativados em um ambiente ácido. Portanto, as formulações farmacêuticas contendo estes princípios ativos favorecem a absorção entérica destes fármacos, que atingem as células parietais através da corrente sanguínea e acumulam-se nos canalículos secretórios ácidos dessas células.^{64,65} Nestes compartimentos, estes compostos são protonados, formando os fármacos propriamente ditos (ácido sufênico ou sulfenamida, Figura 1.7) com propriedades tiofílicas.⁶⁴⁻⁶⁶ Em seguida, eles reagem covalentemente com os grupos sulfidrila de resíduos de cisteína específicos

(cys⁸¹³) da enzima H⁺/K⁺-ATPase, exclusivamente encontrada na região luminal da membrana plasmática da célula parietal, inibindo-a de modo irreversível e inibindo então a secreção ácida, que só recomeça após a inserção de novas enzimas na membrana luminal.⁶⁴⁻⁶⁶

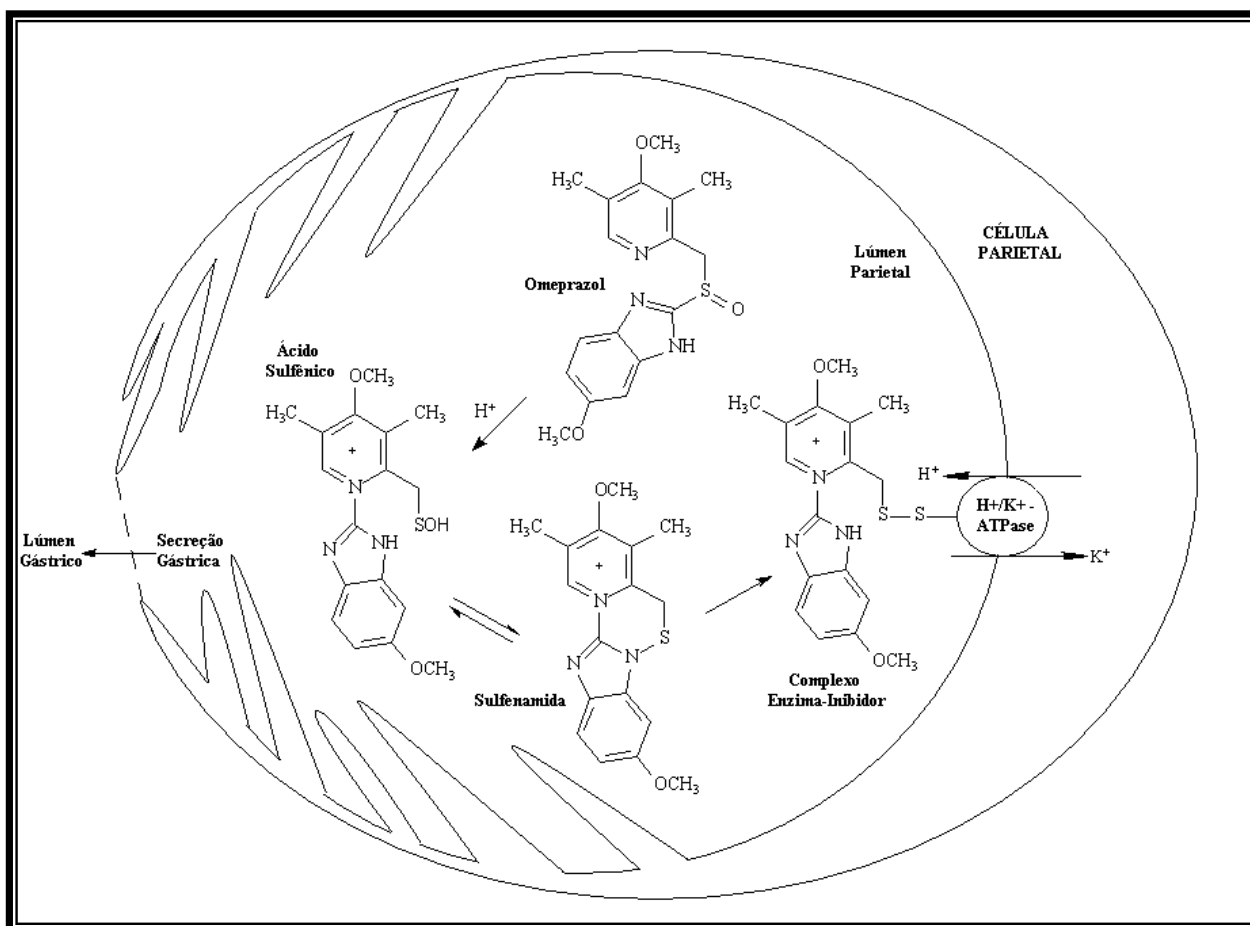


FIGURA 1.7 - Esquema do mecanismo de ação básico de inibição da secreção gástrica de HCl pelo omeprazol.⁶⁷

As principais rotas de metabolização desses compostos incluem a oxidação e redução do grupo sulfóxido (catalisada principalmente pela enzima CYP3A4), 4-*O*-desmetilação e hidroxilação aromática (catalisada pela enzima CYP2C19).⁶³

Estes fármacos são metabolizados no fígado e podem seguir dois caminhos distintos, de acordo com a enzima responsável pela metabolização,

como pode ser visto na Figura 1.8 que exemplifica o metabolismo ou a rota metabólica do omeprazol.^{63,68-70}

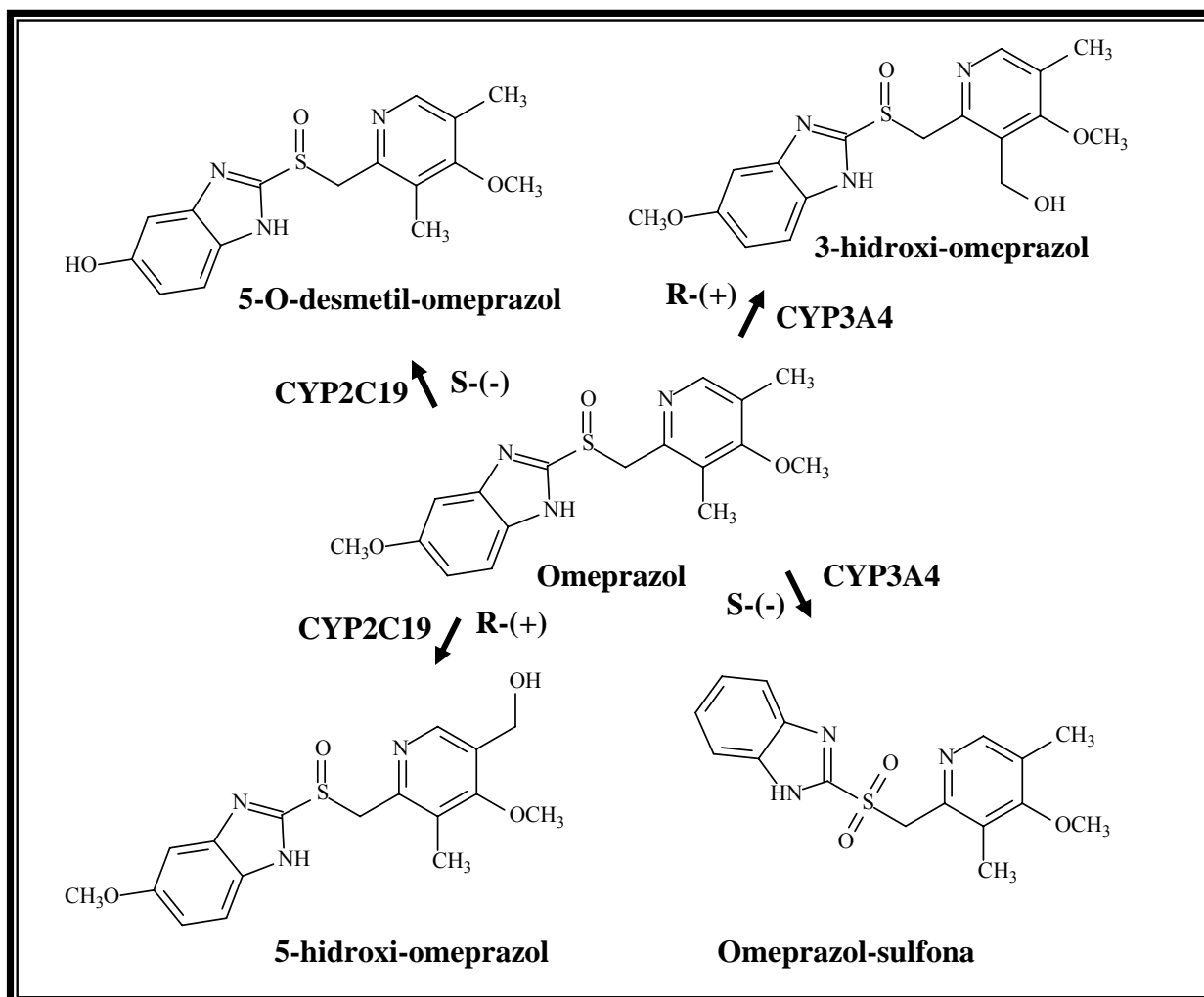


FIGURA 1.8 - Metabolismo do omeprazol.⁷⁰

O caminho envolvendo a enzima CYP2C19 é o preferencial na metabolização estereosseletiva do (R)-(+)-omeprazol, levando à formação do 5-hidróxi-omeprazol sem alterar o centro estereogênico.^{70,71} Enquanto o (S)-(-)-omeprazol é metabolizado pela enzima CYP3A4 levando ao composto omeprazol-sulfona, não quiral.^{63,70,71}

A enzima CYP2C19 é polimorficamente distribuída, aproximadamente 3,0% dos indivíduos da população branca são ditos metabolizadores pobres, ou seja, possuem uma ausência genética da enzima

CYP2C19. Já na população oriental, de 15,0 a 20,0% dos indivíduos são fenotipados como metabolizadores pobres, o que leva ao caminho da sulfoxidação do omeprazol.^{63,70}

Devido a esta diferença na metabolização do omeprazol e ao polimorfismo na distribuição da enzima CYP2C19, a empresa farmacêutica AstraZenica passou a comercializar o enantiômero puro S-(-)-omeprazol (Nexium[®]), que é metabolizado preferencialmente pela enzima CYP3A4. Assim, todo tipo de consumidor tem uma resposta eficaz do medicamento.

O desenvolvimento de métodos analíticos rápidos, precisos e exatos para a avaliação da estereosseletividade metabólica de fármacos em desenvolvimento, bem como para a determinação da fenotipagem de uma dada população quanto ao polimorfismo genético metabólico é imprescindível no âmbito farmacêutico, principalmente em populações miscigenadas, como no Brasil.

A quiralidade nos fármacos omeprazol, lansoprazol e pantoprazol está diretamente relacionada ao átomo de enxofre na forma de sulfóxido, no qual a presença de um par de elétrons livres confere à molécula geometria tetraédrica.

Vários trabalhos podem ser encontrados relacionados aos inibidores da bomba de prótons, entre eles estudos de enantioseparação, validação de métodos para quantificação dos enantiômeros em fluidos biológicos e, em formulações farmacêuticas.^{55,71-73}

Os enantiômeros e metabólitos do lansoprazol foram determinados em amostras de microsomas de fígado humano, por cromatografia líquida, com tratamento de amostra baseado em extração líquido-líquido.⁷⁴ Um outro trabalho envolve os metabólitos e enantiômeros do lansoprazol e do rabeprazol, determinados em plasma humano por CLAE utilizando a extração em fase sólida como método de pré-tratamento da amostra.^{72,75}

Cass *et al.*⁵⁶ estudaram a enantioseparação do lansoprazol, omeprazol e pantoprazol, em quatro diferentes colunas quirais de

polissacarídeos (amilose e celulose) valendo-se da eluição multimodal. Mudanças no modo de eluição, na composição da fase móvel e no tipo de seletor quiral alteraram significativamente a enantiosseletividade e/ou a enantiorresolução destes compostos.

Em um outro trabalho, Belaz *et. al.*⁷⁶ utilizaram as fases estacionárias quirais de polissacarídeos para a separação em escala multimiligrama dos fármacos inibidores da bomba protônica. Os resultados revelam uma excelente discriminação quiral para todos os compostos, levando a bons valores de pureza enantiomérica (> 90%) após a separação.

Montanari *et al.*⁷⁷ investigaram a separação enantiomérica de uma série de 23 sulfóxidos assimétricos, incluindo o omeprazol, lansoprazol e pantoprazol em três colunas quirais de polissacarídeos, no modo reverso de eluição: tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (CSP-1), tris (3,5-dimetóxfenilcarbamato) de amilose (CSP-2) e tris [(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose (CSP-3). As fases CSP-1 e CSP-2 mostraram-se eficientes nas separações quirais dos fármacos e o mecanismo de retenção na fase CSP-2 foi avaliado devido à sua melhor enantiosseletividade e enantiorresolução para os compostos.

Foram desenvolvidos métodos para a análise de pantoprazol,⁵⁵ omeprazol⁷¹ e lansoprazol⁷³ em plasma humano, com injeção direta de amostra. Para isto, foi utilizado um sistema de CLAE multidimensional, no qual uma coluna RAM foi acoplada a uma coluna quiral de polissacarídeo. Os métodos apresentaram exatidão, precisão e recuperação aceitáveis de acordo com as normas da legislação adotada.^{55,71}

Toribio *et al.*⁷⁸, realizaram um estudo comparativo da separação enantiomérica do omeprazol, lansoprazol, rabeprazol e pantoprazol por CLAE e cromatografia por fluido supercrítico utilizando uma coluna quiral de polissacarídeo (tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose).

1.5 – Pré-Tratamento de amostras ambientais

O desenvolvimento de métodos analíticos utilizando CLAE para monitoramento de contaminantes emergentes, tais como os fármacos, em águas residuais vêm aumentando continuamente.³ No entanto, amostras de matrizes complexas, como águas residuais e plasma, não devem ser diretamente injetadas nas fases cromatográficas, uma vez que as macromoléculas presentes nestes tipos de matrizes podem ser adsorvidas no suporte provocando um rápido entupimento da coluna e perda da eficiência cromatográfica.⁷⁹ Para evitar a deterioração das colunas antes da análise cromatográfica é necessário realizar um pré-tratamento que permita a remoção destas macromoléculas e pré-concentração do analito, proporcionando um aumento na seletividade e sensibilidade do método.^{79,80}

A técnica mais comumente utilizada para extração e pré-concentração de substâncias presentes em águas residuais é a extração em fase sólida.^{3,19,25}

A água residual, objeto de estudo deste trabalho, possui um elevado teor de matéria orgânica (substâncias húmicas, SH) que são formadas pela transformação de biomoléculas durante o processo de decomposição de resíduos vegetais e animais presentes no ambiente. Devido à sua natureza heterogênea e complexa, elas se apresentam como misturas heterogêneas de moléculas polidispersas com elevada massa molecular e também pouco se sabe em relação à estrutura química dessas moléculas.⁸¹ A Figura 1.9 apresenta estruturas propostas para os ácidos húmicos e ácidos fúlvicos, SH presentes em águas naturais. Como se pode observar na estrutura proposta, ambos possuem um elevado teor de grupos funcionais contendo oxigênio na forma de carboxilas, hidroxilas fenólicas e carbonilas e também podem interagir com metais e compostos orgânicos presentes no ambiente.^{81,82}

A etapa de pré-tratamento de amostras complexas é, sem dúvida, a etapa mais crítica e trabalhosa durante o desenvolvimento de métodos

cromatográficos de análise.^{79,83} E, devido ao grande número de amostras usualmente manuseadas nas análises, o procedimento de preparo das mesmas deve ser rápido e conveniente, com perdas mínimas dos analitos e também baixo custo de análise.⁷⁹ Assim sendo, métodos que possibilitem a injeção direta de amostras têm sido explorados. Entre estes, o uso de colunas de meios de acesso restrito têm se destacado. O atrativo para o uso de injeção direta de amostras é que elimina erros humanos de manipulação, minimiza perda dos analitos, evita o manuseio de amostras perigosas ou infecciosas e aumenta o número de análises por tempo.⁷⁹

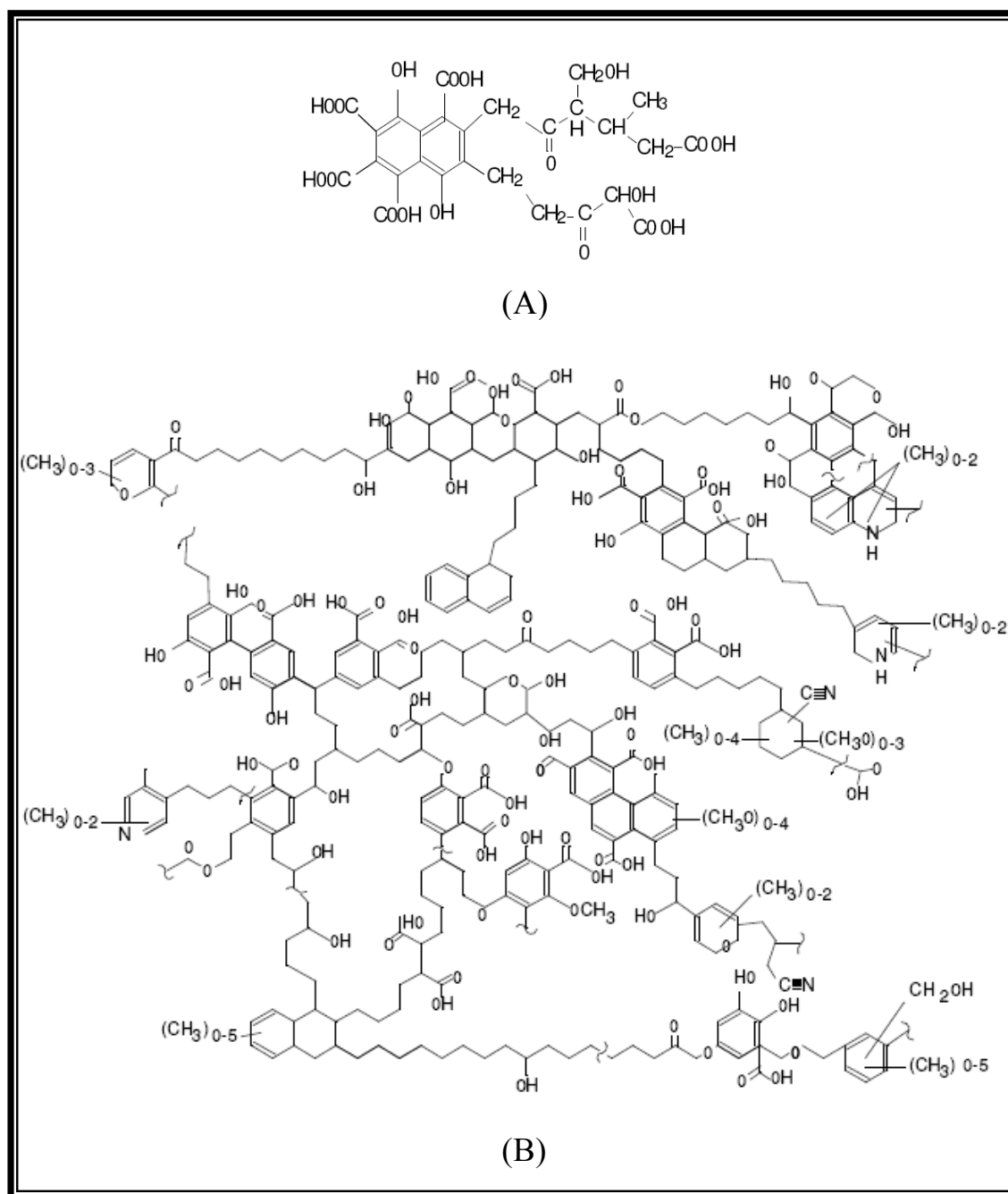


FIGURA 1.9 – Estruturas propostas para os ácidos fúlvicos (A) e húmicos (B) presentes em águas naturais.⁸¹

1.5.1 – Métodos por injeção direta

As amostras são injetadas diretamente no sistema cromatográfico, visando simplificar, minimizar tempo e manuseio de amostras.⁸³

Dentre as técnicas atualmente empregadas nas análises por injeção direta de amostra pode-se citar as que utilizam suportes cromatográficos diferenciados, as grandes partículas (LPS – Large Particles Supports) e os meios de acesso restrito (RAM – Restricted Access Media). Ambos têm em comum a propriedade de excluir as macromoléculas, enquanto os analitos são retidos nos poros das sílicas por interações hidrofóbicas ou eletrostáticas.⁸⁴

1.5.1.1 – Fases LPS (*Large Particles Supports*)

Esta técnica de extração foi patenteada em 1997 por Quinn e Takarewski com o nome de cromatografia de vazão turbulenta. Estes suportes de extração são empacotados com partículas de diâmetro 30-50 μm , o que permite alta vazão da fase móvel, sem aumento de pressão do sistema cromatográfico. Nestas condições, há uma rápida eluição das macromoléculas e outros compostos hidrofílicos, enquanto o analito é retido nos sítios hidrofóbicos do suporte.^{84,85}

Os suportes utilizados nas fases estacionárias de CLAE são os mesmos em LPS, sendo que as principais diferenças são o tamanho das partículas e o diâmetro das colunas.^{84,85}

1.5.1.2 – Fases RAM (*Restricted Access Media*)

A injeção direta de amostras ambientais é permitida nessas fases, uma vez que elas excluem macromoléculas e retém micromoléculas. O mecanismo de exclusão de macromoléculas destas fases é baseado na existência de regiões hidrofóbicas que retêm e separam o analito, e regiões hidrofílicas que excluem as macromoléculas no volume morto da coluna. Sendo assim, as fases RAM possuem uma barreira de difusão física e outra química, unindo o

princípio de cromatografia de exclusão e de fase reversa, para produzir uma cromatografia de superfície discriminante.^{79,83}

A Figura 1.10 ilustra o mecanismo de exclusão das fases RAM, onde as macromoléculas são excluídas por uma barreira física, relacionada com o diâmetro do poro e/ou por uma barreira de difusão química, criada por uma rede de proteínas ou polímeros na superfície externa da partícula.⁸³

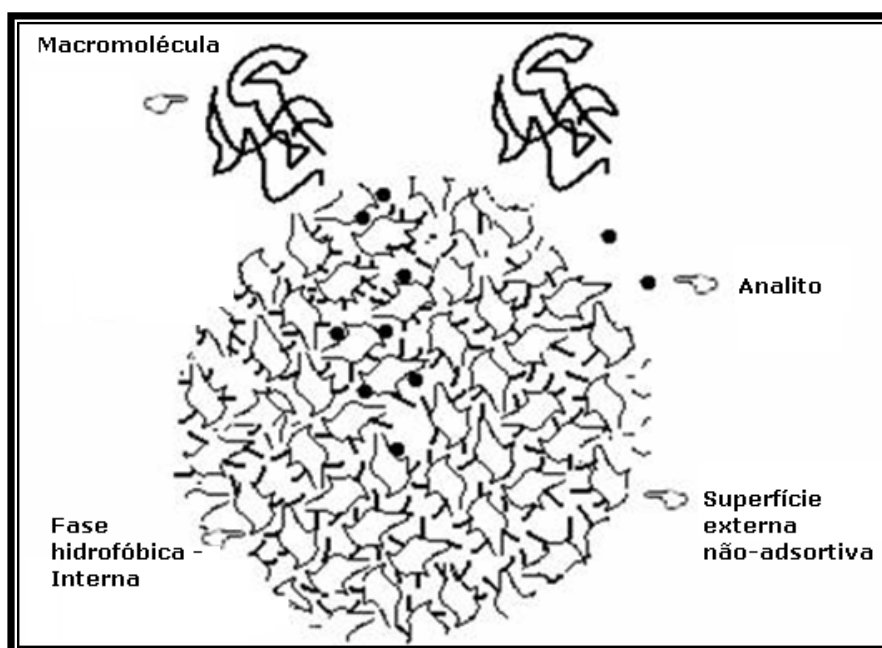


FIGURA 1.10 – Esquema do mecanismo de exclusão de macromoléculas proposto.⁸³

As fases RAM são classificadas em dois grupos, de acordo com sua topoquímica: fases de superfície bimodal e fases de superfície unimodal.⁸³ As fases de superfície unimodal são caracterizadas por apresentarem a superfície da sílica com cobertura homogênea, ou seja, tanto a superfície externa quanto os poros da sílica possuem grupos hidrofílicos ou hidrofóbicos (são exemplos, as SHP- Shielded Hydrophobic Phase e as MFP- Mixed-Function Material). Já nas fases de superfície bimodal a parte externa possui grupos hidrofílicos e a interna grupos hidrofóbicos. Aqui estão agrupadas as fases ISPR (Internal Surface

Reversed Phase), ADS (Alquil-Diol-Sílica), SPS (Semi Permeable Surface) e as fases reversas imobilizadas com proteína.⁸³

Entre os diversos tipos de suportes cromatográficos para fases RAM, as fases hidrofóbicas proteína - imobilizadas, disponíveis comercialmente ou de fácil preparo no laboratório, são as mais utilizadas.^{55,71,79,83,86-91}

- Fases recobertas com proteínas

A primeira fase proteína-imobilizada preparada foi relatada em 1984 por YOSHIDA *et al.*⁹², onde os sítios de adsorção externos de uma sílica reversa (C₁₈) foi saturado com o α 1-ácido glicoproteico (AGP) humana desnaturada. Esta coluna é comercializada com o nome de BioTrap.

Nesta mesma classe encontram-se as fases desenvolvidas por MENEZES *et al.*⁹³⁻⁹⁵, onde suportes de sílica (C₈ e C₁₈) são recobertos com albumina sérica bovina (BSA) ou humana (HSA).

Recentemente, FELIX, G & CAMPESE, D.⁹⁶ desenvolveram uma nova coluna RAM-BSA quiral para análise dos fármacos temazepan, lormestazepan, oxazepan e lorazepan em plasma humano; a superfície interna da fase é composta do seletor quiral de β -ciclodextrina e a superfície externa com BSA.

As colunas RAM são versáteis quanto à sua utilização, podendo ser utilizadas no modo simples ou no modo multidimensional de análise.⁷⁹ No modo simples, as amostras são diretamente injetadas no sistema cromatográfico, os interferentes e macromoléculas são excluídos e os analitos permanecem retidos com posterior extração por eluição gradiente.⁷⁹ O modo multidimensional envolve o acoplamento de duas ou mais colunas com modos de separação diferentes. Deste modo, as colunas RAM funcionam como uma pré-coluna (onde ocorre a exclusão das macromoléculas) e os analitos seletivamente retidos são transferidos, através de uma válvula de desvio, para uma segunda coluna, onde ocorre a separação cromatográfica dos analitos.⁷⁹

No modo simples de análise a quantificação do analito é dificultada pelas intensas absorções dos componentes presentes nas matrizes, flutuações na linha de base (ocasionada pela troca do solvente de exclusão para o de extração) e a presença de interferentes que podem co-eluir com os analitos de interesse. Sendo assim, para minimizar esses problemas, o modo multidimensional é o mais usado.

Algumas revisões mostram a grande aplicação do uso das colunas de fases de acesso restrito para a análise e quantificação de fármacos, por injeção direta, em diferentes matrizes biológicas, tais como plasma, soro, lágrima, cultura de células, urina, bile, tecidos, secreção pulmonar, saliva e leite.⁸³⁻⁸⁵ Entretanto, na análise de fármacos em águas o emprego destas fases ainda é muito restrito. No trabalho de Hogendoorn *et al.*⁹⁷ é realizado um estudo para verificar a performance das colunas RAM (SPS, ISRP, HISEP e ADS) na exclusão de ácidos húmicos para a análise de herbicidas em amostras de águas. Chico *et al.*⁸⁰ também realizaram um estudo envolvendo colunas RAM para o tratamento de amostras de leite e água na análise de tetraciclinas por cromatografia líquida.

1.6 – Espectrometria de massas

A espectrometria de massas aliada à cromatografia líquida de alta eficiência tem sido amplamente empregada na quantificação de contaminantes emergentes, tais como fármacos, em ambiente aquático.^{4,98-101} Uma vez que, estes compostos podem estar presentes em águas residuais, efluentes de estações de tratamento de esgoto, águas de rios, solos e água potável em concentrações na faixa de ng.L^{-1} a $\mu\text{g.L}^{-1}$ faz-se necessário o desenvolvimento de métodos mais sensíveis para detecção.⁹⁸ Deste modo, o acoplamento da cromatografia líquida de alta eficiência com a espectrometria de massas torna-se vantajoso pois alia a alta seletividade e eficiência de separação, provenientes da

cromatografia, com as vantagens da espectrometria de massas, informação estrutural, massa molar e aumento adicional de seletividade.¹⁰²

A espectrometria de massas baseia-se na geração de íons, que são posteriormente detectados. Os métodos usados para a geração destes íons (fontes de ionização) e o modo de analisá-los (analisadores) garantem a eficiência de cada método.¹⁰²

Em geral, as análises de contaminantes emergentes em matrizes ambientais envolvem analisadores de massas do tipo quadrupolo ou triplo quadrupolo, isto devido à maior sensibilidade atingida, com limites de quantificação e detecção baixos.^{4,98-101} No entanto, embora esses analisadores atinjam uma elevada sensibilidade, a seletividade é comprometida, sendo necessário, na maioria das vezes, duas injeções da mesma amostra para certificar-se que o íon monitorado corresponde ao analito.^{20-22,103} Além disso, eles são de elevado custo quando comparado com analisadores do tipo íon-trap, por exemplo.²²

Trabalhos como o de Feitosa-Fenizzola *et al.*²⁰, Yang *et al.*²¹ e Batt *et al.*²² utilizaram LC/MS-MS, com analisador do tipo íon-trap e fonte de ionização por eletrospray, associado à extração em fase sólida para desenvolver e validar métodos para quantificação simultânea de diferentes antibióticos em águas residuais de diferentes localidades. As vantagens no uso do analisador IT em estudos envolvendo a quantificação e identificação de fármacos, em matrizes aquosas ambientais, está na seletividade uma vez que o IT permite o aprisionamento, e acumulação, de íons no “trap” possibilitando a aquisição de dados no modo *Multiple Reaction Monitoring* (MRM), para a quantificação, e MSn para a identificação e confirmação estrutural de compostos. Além disso, uma maior sensibilidade pode ser atingida durante o pré-tratamento de amostra, um exemplo é o uso de extração em fase sólida²⁰ ou colunas RAM⁸⁰ para *clean-up* de amostra e pré-concentração do analito.

2 – OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

1 – O preparo de colunas de acesso restrito (RAM), de albumina sérica bovina, imobilizadas em dois diferentes suportes: C₈ e C₁₈.

2 – A avaliação da eficiência das colunas RAM-BSA preparadas para a exclusão das macromoléculas das águas residuais despejadas no Rio Monjolinho de São Carlos, Brasil e de estuário do Rio Douro, Porto-Portugal.

3 – O desenvolvimento de métodos para a quantificação dos enantiômeros dos fármacos omeprazol, lansoprazol e pantoprazol em água residual e de estuário, através do emprego de CLAE multidimensional, para o monitoramento de resíduos destes PPIs (*Próton Pump Inhibitors*).

3 – JUSTIFICATIVAS

Nas últimas duas décadas, os estudos envolvendo a contaminação ambiental estiveram centrados, principalmente, na determinação de contaminantes “clássicos”, tais como: organoclorados, hidrocarbonetos, metais. Entretanto, uma nova classe de contaminantes denominada “emergente”, formada por surfactantes, produtos farmacêuticos e de higiene pessoal e aditivos empregados na gasolina (MTBE), vem despertando grande interesse principalmente nos estudos envolvendo o seu monitoramento e potenciais efeitos que possam comprometer a biota.¹

No Brasil, a presença de fármacos tais como, reguladores lipídicos, antiinflamatórios, estrogênios naturais e contraceptivos sintéticos foram relatados em esgoto, efluentes de ETE, e em águas de rios no estado do Rio de Janeiro.¹⁸ Em recente levantamento, a Agência Nacional de Águas (ANA, 2005)¹⁷, apontou que apenas 14% dos municípios brasileiros possuem condições de esgoto sanitário adequado com coleta e tratamento. Sendo assim, o lançamento de esgotos domésticos *in natura* nos corpos hídricos é o principal fator que compromete a qualidade das águas utilizadas tanto para o abastecimento, como para irrigação e recreação. Nesse sentido, o esgoto não tratado que é despejado nos rios constantemente torna-se um problema de poluição das águas superficiais. Assim métodos analíticos que permitam o monitoramento de fármacos em matrizes aquáticas fazem-se necessários e, portanto, as matrizes selecionadas para o desenvolvimento deste trabalho foram água de esgoto e de estuário.

A cromatografia líquida de alta eficiência ou gasosa, com detecção por espectrometria de massas ou espectroscopia na região do ultravioleta-visível, são as técnicas analíticas mais utilizadas na análise de contaminantes, como fármacos e seus metabólitos, em matrizes aquáticas ambientais.^{18,104,105} Como

pré-tratamento e pré-concentração de amostra, a extração em fase sólida tem destaque nos métodos validados e encontrados na literatura.

A eficiência da exclusão de macromoléculas com o uso de colunas RAM-BSA de fase reversa já está consolidada cientificamente para matrizes como ovo, plasma (humano e bovino) e leite.^{83,86-89,106} Assim, no presente trabalho a análise de água residual, com pré-tratamento de amostra *on-line* utilizando colunas RAM-BSA de fase reversa é inovadora, uma vez que se utiliza a matriz nativa em pequena quantidade e as amostras são analisadas sem pré-concentração.

A cromatografia multidimensional é uma técnica que permite a análise de amostras com alto grau de complexidade. Assim, o acoplamento multidimensional *on-line* surge como alternativa na quantificação de micromoléculas em matrizes aquosas ambientais.

Os fármacos selecionados para o desenvolvimento do trabalho foram todos quirais, devido à importância do desenvolvimento de métodos enantiosseletivos para o estudo de degradação biótica e também acompanhar os efeitos adversos que eles podem causar na biota.

Portanto, o desenvolvimento e validação de métodos enantiosseletivos em matriz aquosas nativas com injeção direta de amostra através do uso de colunas RAM-BSA mostram a viabilidade de aplicação dessa técnica para estudos de outros fármacos quirais.

3 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 – Generalidades

As análises cromatográficas foram realizadas em dois sistemas:

Sistema 1: Cromatógrafo líquido com duas bombas SHIMADZU LC 10 AT VP, onde uma delas está acoplada a uma válvula seletora de solvente SHIMADZU FCV-10AL para gradiente de baixa pressão; um detector de ultravioleta com comprimento de onda variável SHIMADZU SPD-10A; um auto-injetor SHIMADZU SIL 10 AD VP e uma válvula de três caminhos VALCO NITRONIC 7000 para ser utilizada no seqüenciamento de colunas. O equipamento está acoplado a uma interface SHIMADZU SCL 10 AVP e os cromatogramas são registrados através do software CLASS-VP.

Sistema 2: Cromatógrafo líquido com duas bombas SHIMADZU LC 20 AD; um detector de ultravioleta com comprimento de onda variável SHIMADZU SPD-20 A e um espectrômetro de massas BRUKER esquire 6000, íon trap; um auto-injetor SHIMADZU SIL 20 A e uma válvula de três caminhos VALCO NITRONIC 7000 para ser utilizada no sequenciamento de colunas. O equipamento está acoplado a uma interface SHIMADZU CBM 20 A e os cromatogramas são registrados através do software CLASS-VP.

Sistema 3: Cromatógrafo líquido com duas bombas SHIMADZU LC 10 AD VP, sendo uma delas acoplada a uma válvula seletora de solvente SHIMADZU FCV-10AL para gradiente de baixa pressão; um detector de ultravioleta com comprimento de onda variável SHIMADZU SPD-10 AV e um dicroísmo circular (CD) JASCO 2095; um auto-injetor SHIMADZU SIL 10 AD VP e uma válvula de três caminhos VALCO NITRONIC 7000 para ser utilizada no sequenciamento de colunas. O equipamento está acoplado a uma interface SHIMADZU SCL 10 AVP e os cromatogramas são registrados através do software LC Solutions.

Empacotadora Shandon para o empacotamento das colunas cromatográficas.

As análises elementares foram realizadas no DQ-UFSCar, utilizando-se um equipamento FISIONS EA 1108.

Os espectros de infravermelho foram realizados em um espectrofotômetro BOMEN-MICHELSON FT-IR, modelo Power Male 1 – Ultrasync.

A peneira utilizada para a uniformização e homogeneização das fases estacionárias quirais sintetizadas foi ENDECOTT SBS 410/1986 (995308) com orifícios de 38 μ m.

A água utilizada na composição das fases móveis e preparação de soluções foi obtida em um sistema MILLI-Q (MILLIPORE).

Os solventes orgânicos, grau HPLC (MALLINCKRODT, J. T. BAKER, TEDIA), foram filtrados a vácuo em um sistema MILLIPORE, utilizando membranas de nylon PHENOMENEX de 0,45 μ m e posteriormente degaseificados em ultra-som COLE-PALMER 8852.

Os eluentes usados foram sempre medidos na relação volume/volume.

A homogeneização de todas as amostras foi efetuada em um vórtex PHOENX AP56.

Para a pesagem dos reagentes foi utilizada uma balança analítica AND, modelo HR200, com precisão $\pm 0,0001$ g.

As medidas de pH foram realizadas utilizando um pHmetro, QUALXTRON, modelo 8010, com precisão de $\pm 0,01$ unidades de pH, conectado a um eletrodo de vidro combinado Ag/AgCl. A calibração do pHmetro foi realizada com soluções tampão pH 4,00 e 7,00 (CHEMIS).

As micropipetas utilizadas no preparo das amostras foram GILSON.

Os reagentes e demais produtos químicos utilizados foram obtidos de diversas fontes: Sigma-Aldrich, Merk, Acros, Synth e Macherey-Nagel.

Durante todo o desenvolvimento e validação dos métodos analíticos foram utilizados padrões dos fármacos doados pelas seguintes indústrias farmacêuticas:

- Omeprazol – Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), lote 1030;
- Lansoprazol – Boehringer Ingelheim, lote H505;
- Pantoprazol – Eurofarma, ordem de produção 12100028.

3.2 - Derivação do suporte 3-aminopropilsílica

A derivação da sílica foi realizada a partir da sílica Nucleosil (500Å, 7µm) (19,84 g) previamente seca em estufa a vácuo a 60 °C por 24 horas. Posteriormente a amostra de sílica foi mantida sob atmosfera de cloreto de lítio em dessecador por mais 24 horas, e transferida para um balão, onde tolueno seco (240mL) foi adicionado. A mistura foi mantida sob atmosfera de nitrogênio e adicionou-se 3-aminopropiltrietóxisilano (24,0mL; 102mmol). A mistura reacional permaneceu em agitação e aquecimento a uma temperatura de 120 °C, durante 3 horas.

O produto obtido foi filtrado a vácuo em funil de placa sinterizada, lavado com tolueno (300mL) e posteriormente com uma mistura de MeOH:H₂O (50:50) (250mL). Em seguida, o produto foi seco em dessecador com pentóxido de fósforo por 24 horas e submetido à análise elementar.

Análise elementar:

Sílica Nucleosil: %C=0,13; %H=0,0; %N=0,18

Sílica APS-Nucleosil: %C=1,39; %H=0,56; %N=0,61

3.3 - Síntese do tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose

A síntese do tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose foi realizada a partir da adição de piridina anidra (60,0mL) ao polissacarídeo, amilose (1,57g; 9,70mmol), previamente seco em estufa a vácuo a 60°C por 48 horas. A mistura reacional foi aquecida a 98°C sob agitação. Após 24 horas, a mistura foi resfriada à temperatura ambiente e adicionou-se 3,5 equivalentes do isocianato 3,5-dimetilfenilisocianato (5,00mL; 33,9mmol), permanecendo a reação sob aquecimento e agitação por mais 72 horas à 98°C.

Após o resfriamento da reação à temperatura ambiente, o produto foi precipitado, sob agitação em metanol (300mL). A mistura foi mantida em agitação durante 1 hora e, então, o produto branco foi filtrado a vácuo em funil de placa sinterizada e lavado com metanol, repetidas vezes, até que não se observasse mais resíduo de piridina.

O carbamato foi seco em dessecador com vácuo na presença de pentóxido de fósforo, por 48 horas, e caracterizado por análise elementar e infravermelho.

Análise elementar:

Valores Teóricos: %C=65,6; %H=6,18; %N=6,96

Valores Experimentais: %C=57,5; %H=5,82; %N=6,07

Infravermelho (KBr, $\nu_{\text{máx}}$, cm^{-1}): 1726; 3304; 1222

3.4 - Síntese do tris (3,5-dimetóxfenilcarbamato) de amilose

Piridina anidra (60,0mL) foi adicionada ao polissacarídeo, amilose (0,900g; 5,51mmol), previamente seco em estufa a vácuo a 60°C por 48 horas. A mistura reacional foi aquecida a 98°C sob agitação. Após 24 horas, a mistura foi

resfriada à temperatura ambiente e adicionou-se 3,5 equivalentes do isocianato 3,5-dimetóxfenilisocianato (4,00g; 19,3mmol); como este reagente é um pó foram tomados alguns cuidados: transferiu-se as 4,00 g para um balão de fundo redondo e este foi colocado na bomba a vácuo por 1 hora, em seguida adicionou-se uma pequena quantidade de piridina destilada para solubilizar o isocianato e assim este foi adicionado na reação. A reação permaneceu sob aquecimento (98°C) e agitação por mais 72 horas.

Após o resfriamento da reação à temperatura ambiente, o produto foi precipitado sob agitação em metanol (300mL). A mistura foi mantida em agitação durante 1 hora e, então, o produto branco foi filtrado a vácuo em funil de placa sinterizada e lavado com metanol, repetidas vezes, até que não se observasse mais resíduo de piridina.

O carbamato foi seco em dessecador com vácuo na presença de pentóxido de fósforo, por 48 horas, e caracterizado por análise elementar e infravermelho.

Análise elementar:

Valores Teóricos: %C=56,6; %H=5,29; %N=6,00

Valores Experimentais: %C=54,6; %H=5,77; %N=5,01

Infravermelho (KBr, $\nu_{\text{máx}}$, cm^{-1}): 1746; 3321; 1204

3.5 - Recobrimento do suporte APS-Nucleosil com o tris (arilcarbamato) de amilose sintetizado

Inicialmente 1,96g de carbamato foram colocados para solubilizar em um bécker com 72,0mL de THF anidro, sob agitação. Após 24 horas, para ajudar na solubilização, adicionou-se 12,0mL de N,N-dimetilacetamida. Em seguida, pesou-se 7,83g da sílica derivada em um balão para recobrimento e o mesmo foi deixado em um dessecador sob vácuo juntamente com pentóxido de fósforo.

Posteriormente, a sílica foi retirada do dessecador (com o auxílio de um tubo secante) e então foi adicionado 130mL de THF anidro. Deixou-se a mistura em refluxo, sob agitação, por 30 minutos. Após o sistema atingir a temperatura ambiente adicionou-se metade do carbamato solubilizado na mistura e o balão foi colocado no rotaevaporador, sendo que este se encontrava em banho de gelo e sob vácuo, de modo que a evaporação do solvente ocorresse lentamente. Quando se observou pouco solvente no balão foi adicionado o restante do carbamato e este voltou para o rotaevaporador, em banho de gelo e sob vácuo.

Em seguida o balão foi colocado em sistema a vácuo por 1 hora, e posteriormente no dessecador com pentóxido de fósforo por 48 horas.

Com isso, a fase quiral foi pesada e peneirada.

3.6 - Empacotamento das colunas analíticas

A massa de 2,50g de cada fase quiral, tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) e tris-(3,5-dimetóxiifenilcarbamato) ambas de amilose e em APS-Nucleosil (7 μ m, 500Å), foram suspensas em 50,0mL da mistura hexano: isopropanol (50:50) separadamente, homogeneizadas no ultra-som por 3 minutos e empacotadas cada uma em uma coluna de aço inoxidável (15,0cm x 0,46cm d.i.) sob pressão de 7000 psi utilizando-se a mistura hexano: isopropanol (50:50) como solvente. As colunas foram condicionadas durante 12 horas em hexano: etanol (85:15) a uma vazão de 1,00mL.min⁻¹.

3.7 – Preparo das colunas RAM-BSA

3.7.1 – Sílicas Utilizadas

As sílicas utilizadas no empacotamento das colunas foram: octilsílica LUNA (100 Å, 10 µm) e octadecilsílica LUNA (100 Å, 10 µm).

3.7.2 – Empacotamento das Colunas

A sílica de fase hidrofóbica C₈ ou C₁₈ (1,3g) foi suspensa em 50mL de metanol, homogeneizada no ultra-som durante 3 minutos e empacotada em uma coluna de aço inoxidável (5,0cm x 0,46cm d.i.). As colunas foram condicionadas em metanol durante aproximadamente 4 horas a uma vazão de 1,0mL.min⁻¹.

3.7.3 – Imobilização das Fases Hidrofóbicas com BSA

Após o empacotamento das fases hidrofóbicas e condicionamento das colunas, estas foram eluídas, a uma vazão de 1,0mL.min⁻¹, com solução tampão KH₂PO₄ (0,05mol.L⁻¹; pH 6,0) durante 20 minutos; em seguida, solução de albumina sérica bovina 1,0mg.mL⁻¹ preparada em solução tampão KH₂PO₄ (0,05mol.L⁻¹; pH 6,0), durante 30 minutos e água por 20 minutos. E, posteriormente, eluiu-se três frações de 7,00mL de glutaraldeído a 25% (v/v). Após um repouso de 12 horas, uma solução de boroidreto de sódio 1,00g.mL⁻¹ foi eluída pela coluna até obtenção de um eluente com valor de pH 10. Após mais 2 horas em repouso, a fase estacionária foi lavada com água durante 30 minutos e armazenada em geladeira a 4°C.

3.8 – Caracterização das áreas de estudo e pontos de coleta

A Bacia Hidrográfica do Tietê-Jacaré, Brasil, compreende uma das 22 Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos existentes no Estado de São Paulo, sendo dividida em 9 sub-bacias, onde na sub-bacia do Alto Jacaré-Guaçu está inserido o rio Monjolinho, objeto deste estudo; de acordo com o Comitê de Bacia Hidrográfica Tietê-Jacaré (CBH-TJ), a sub-bacia do Alto Jacaré-Guaçu abrange uma área de 1.112,91km², compreendendo seis municípios, com maiores percentagens em áreas associadas aos municípios de São Carlos (37,34%) e Brotas (23,18%).¹⁰⁷

O rio Monjolinho tem uma extensão de, aproximadamente, 43,25Km, nasce no planalto de São Carlos, a leste do município, percorrendo o sentido leste-oeste e desaguando no Jacaré-Guaçu. Apresenta como característica marcante o desenvolvimento urbano da cidade de São Carlos e os impactos provenientes de suas atividades.¹⁰⁷

O rio Monjolinho recebe águas residuárias da região norte de São Carlos e despejos industriais, que de acordo com o CBH-TJ incluem cerca de 1100 indústrias na Bacia Hidrográfica Tietê-Jacaré representadas por: metalurgia, papel, tintas, alimentos, curtumes, têxtil, entre outras. Após regar o trecho urbano, o rio percorre áreas agro-pastoris, com predomínio de culturas de cana-de-açúcar, recebendo contribuições dos córregos Água Quente e Água Fria, córrego da Serra, Cancã, Palmital e finalmente, desemboca no rio Jacaré-Guaçu.^{108,109}

Em relação aos efluentes domésticos de São Carlos, há um sistema coletor de 100% do volume gerado, o qual é lançado *in natura* no rio Monjolinho, pois a cidade ainda não possui estação de tratamento de esgoto operante.

Vários trabalhos vêm sendo realizados nos rios Monjolinho e Jacaré-Guaçu com o intuito de avaliar o impacto da atividade antropogênica e climática na qualidade das águas e das comunidades biológicas. Deste modo, as coletas de água foram realizadas nos pontos indicados no mapa (Figura 3.1), em quatro estações de coleta escolhidas com base em trabalhos anteriormente realizados na bacia do rio Monjolinho.^{107,109-111} Quanto às características das estações de coleta, pode-se citar:

- Estação 1(A) – Latitude: 22°00'33"S e Longitude: 47°50'07"W; Estação 1(B) – 22°00'10.5"S e Longitude: 47°54'00.5"W: Situa-se no trecho de cabeceira do rio Monjolinho, em uma área de mananciais a, aproximadamente, 3 km de sua nascente principal, localizada em uma propriedade rural denominada Fazenda Santa Terezinha.
- Estação 2: Localiza-se na entrada da área urbana do município de São Carlos, próximo à rodovia Washington Luiz.
- Estação 3: Localiza-se a alguns metros à jusante da confluência com o córrego do Tijuco Preto, inserida em área urbanizada.
- Estação 4: Situa-se no trecho médio do Monjolinho, logo após a área urbana. Nesse local, havia uma barragem construída pela Companhia de Força e Luz (CPFL), a qual, no início de 1999, foi parcialmente derrubada a fim de aumentar o escoamento.

Como parte de um projeto em colaboração com o Instituto Superior de Ciências e Saúde do Norte (ISCS-N) as águas do Rio Douro-Porto, Pt, também foram inseridas como objeto de estudo deste trabalho. As amostras foram coletadas em 06/2008 e 01/2009 pela doutoranda Tânia V. Madureira da Universidade do Porto, Pt que desenvolve parte do seu doutorado no Grupo de Síntese Orgânica e CLAE do DQ-UFSCar.

O Rio Douro possui 900km (é o segundo maior rio da Península Ibérica), com a nascente na província de Sória (Espanha), e atravessa o norte de Portugal com o estuário em Porto. Este rio passa por diferentes regiões,

incluindo áreas não habitadas, pólos industriais e áreas rurais. Ele possui 51 grandes barragens que afetam sua taxa de drenagem para o Oceano Atlântico.¹⁰⁵ Uma barragem, a *Crestuma-Lever*, foi construída dentro do estuário natural do Rio, que afeta os últimos 21,6km do curso do rio formando uma bacia onde o acúmulo de poluentes é inevitável. Então, são despejados no rio resíduos de fontes industriais, esgoto não tratado e efluentes de ETE localizadas nas margens desde estuário altamente industrializado.¹⁰⁵

O estuário do Rio Douro possui, cerca de 22km e está localizado na costa leste de Portugal. Sua profundidade aproximada é de 8 metros, com variações de acordo com a maré na faixa de 2 a 3 metros. Para este estudo, foram coletadas amostras em 6 estações de coleta, indicadas no mapa da Figura 3.2.¹⁰⁵

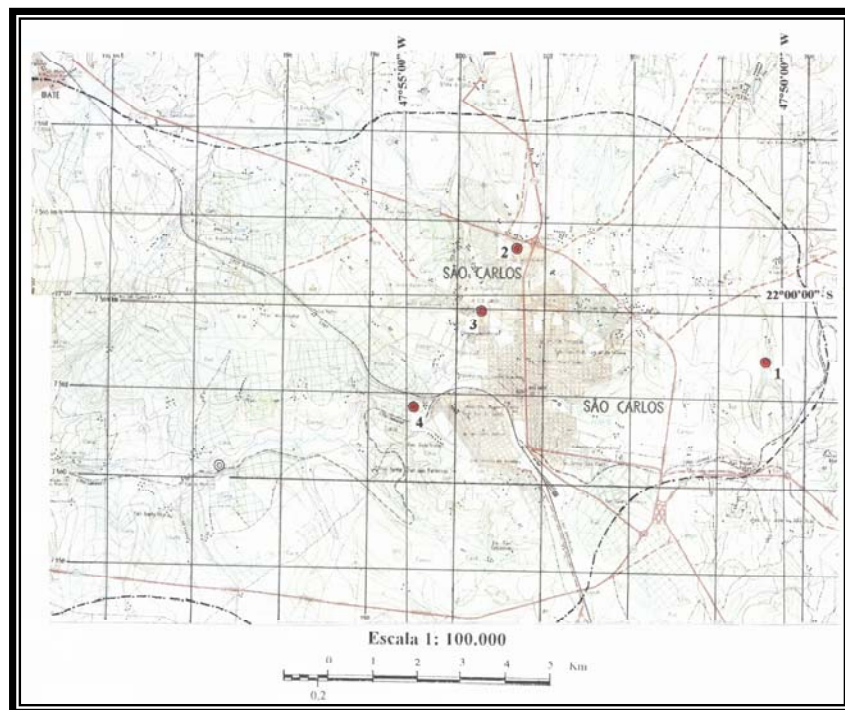


FIGURA 3.1 - Mapa da área de estudo (modificado do CBH-TJ). Pontos de coleta: 1 A e B – Nascente; 2 – UFSCar; 3 – Universidade de São Paulo; 4 – Antiga usina da Companhia Paulista de Força e Luz.

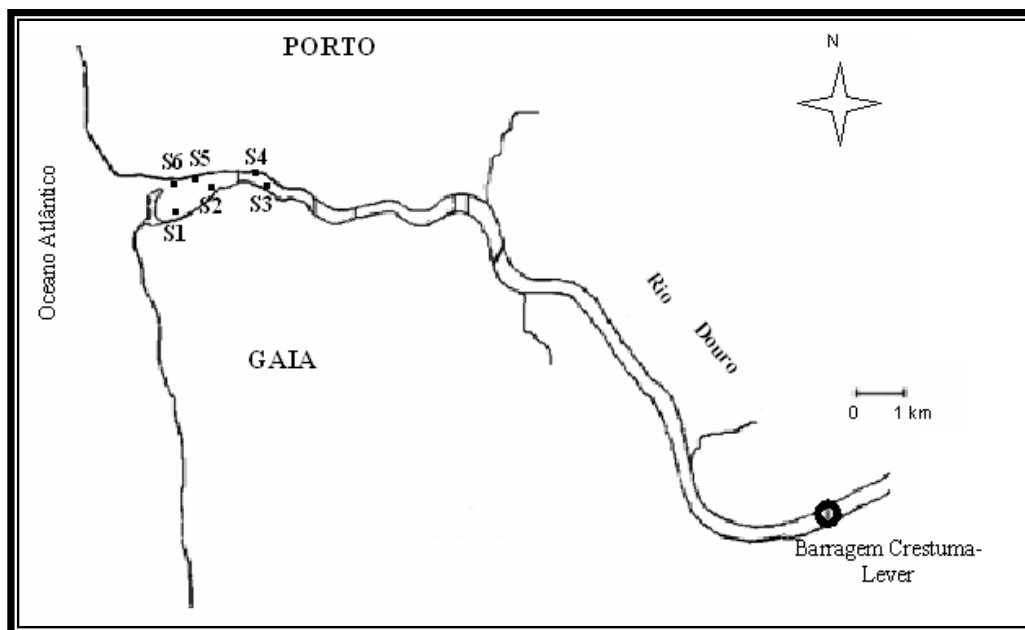


FIGURA 3.2 - Mapa das estações de coleta ao longo do curso do Rio Douro, Porto- Portugal.

As estações de coleta S6, S5 e S4, situadas nas regiões indicadas na Figura 3.2, estão localizadas às margens da cidade do Porto, enquanto as estações S1, S2 e S3, estão no lado oposto, às margens da cidade de Gaia que é altamente industrializada.¹⁰⁵

As amostras de água residual foram coletadas na saída do emissário de esgoto, antes do despejo no Rio Monjolinho enquanto que no Rio Douro foram coletadas em suas margens. As amostras de água residual foram armazenadas em frascos âmbar e mantidas sob refrigeração até serem filtradas em filtros de microfibras GF/D (Whatman®) e armazenadas à 4°C. As amostras do Rio Douro foram transportadas até São Carlos em frascos âmbar, via aérea, e em caixa térmica para posteriormente serem filtradas. Após filtração foram adicionadas três gotas de metanol (grau HPLC) em cada amostra de um litro de água residual ou estuário.

3.9 – Avaliação da eficiência de exclusão das substâncias húmicas pelas colunas RAM-BSA

Baseado no trabalho de Wu et al.¹¹², as colunas RAM-BSA C₈ e C₁₈ foram avaliadas quanto ao percentual de exclusão de macromoléculas. Soluções de concentração 1,00mg.mL⁻¹ dos padrões certificados de ácidos húmicos e fúlvicos aquáticos (doados pela Embrapa Instrumentação Agropecuária – São Carlos), provenientes da IHSS (International Humic Substance Society), foram eluídas em uma coluna de permeação em gel (Tsk-gel[®] G3000PWXL) e a percentagem de exclusão foi calculada comparando-se as áreas obtidas entre os padrões e as amostras (ponto 3 e S1, mapas das Figuras 3.1 e 3.2) na coluna de permeação em gel e no acoplamento RAM-BSA /Tsk-gel[®].

3.10 – Desenvolvimento dos métodos analíticos

3.10.1 – Preparo das soluções padrão do omeprazol, lansoprazol e pantoprazol

Foram desenvolvidos e validados três métodos cromatográficos, todos multidimensionais: o método 1 envolve a quantificação enantiomérica do fármaco omeprazol com detecção por UV-vis e os métodos 2 e 3 a quantificação simultânea dos enantiômeros do lansoprazol e do pantoprazol utilizando um detector de UV-vis e um espectrômetro de massas, respectivamente.

Foram preparadas, individualmente, três soluções estoque da mistura racêmica de cada fármaco na concentração de 200µg.mL⁻¹ através da dissolução de 2,00mg do composto para um volume final de 10,0mL de metanol, em balão volumétrico.

A partir destas três soluções, foram obtidas, por diluição em metanol, a solução estoque (1) de omeprazol (OME) na concentração $20\mu\text{g.mL}^{-1}$ e as soluções estoque (2) e (3) com os fármacos lansoprazol (LAN) e pantoprazol (PAN) combinados, na concentração de $5,0\mu\text{g.mL}^{-1}$ (LAN) e $10\mu\text{g.mL}^{-1}$ (PAN) para a solução (2) e $6\mu\text{g.mL}^{-1}$ (LAN) e $4\mu\text{g.mL}^{-1}$ (PAN) para a solução (3).

As soluções de trabalho para a curva de calibração e para os controles de qualidade foram obtidas por diluição, em metanol, das soluções estoque (1), (2) e (3) nas seguintes concentrações:

Soluções de trabalho para a curva de calibração: 200; 300; 400; 800; 1600; 3200; 6400 e $12800\mu\text{g.L}^{-1}$ a partir da solução estoque (1). Concentrações de 50,0; 100; 150; 200; 400; 800; 1600; $3200\mu\text{g.L}^{-1}$ para o LAN e 100; 200; 300; 400; 800; 1600; 3200; $6400\mu\text{g.L}^{-1}$ para o PAN, a partir da solução estoque (2). E, concentrações iguais a 12,0; 24,0; 48,0; 64,0; 96,0; 192; 384 e $768\mu\text{g.L}^{-1}$ para o LAN e 8,00; 16,0; 32,0; 64,0; 128; 256; $512\mu\text{g.L}^{-1}$ para o PAN, a partir da solução estoque (3).

Soluções de trabalho para o controle de qualidade: 360; 6000 e $10000\mu\text{g.L}^{-1}$ para o OME, 1,44; 40,0; $70,0\mu\text{g.L}^{-1}$ e 18,0; 150; $250\mu\text{g.L}^{-1}$ para o LAN e de 0,960; 14,0; $20,0\mu\text{g.L}^{-1}$ e 36,0; 300; $500\mu\text{g.L}^{-1}$ para o PAN.

Os valores de concentração dos controles de qualidade do método foram calculados da seguinte forma:

- 1- O controle de qualidade de concentração mais baixa em torno de 110-120%, em relação ao ponto de menor concentração da curva de calibração.
- 2- O controle de qualidade de concentração média em torno de 40-60%, em relação a ponto de maior concentração da curva de calibração.
- 3- O controle de qualidade de concentração alta, em torno de 75-95%, em relação a ponto de mais alta concentração da curva de calibração.

3.10.2 – Preparo das soluções de calibração e controle de qualidade

Para os métodos 1 e 2 foram pipetadas alíquotas de 100 μ L da solução de trabalho apropriada em tubos de ensaio e o solvente foi evaporado sob ar comprimido. Os analitos foram reconstituídos em água (1,00mL), dos pontos 1 (A) (omeprazol) e 1(B) lansoprazol e pantoprazol (indicado no mapa da Figura 3.1), e homogeneizados em vórtex por 10 segundos.

Alíquotas de 700 μ L foram transferidas para os *vials* do auto-injetor, tendo sido injetado um volume de 500 μ L no sistema multidimensional de CLAE.

No método 3, alíquotas de 200 μ L da solução de trabalho apropriada foram pipetadas em tubos de ensaio e o solvente evaporado sob ar comprimido. Os analitos foram reconstituídos em água do ponto 1(B) (2,00mL) e homogeneizados em vórtex por 20 segundos. Em seguida, foram transferidas alíquotas de 1500 μ L para os *vials* do auto-injetor e injetado um volume de 1000 μ L.

Na seqüência injetaram-se amostras dos pontos 1(A) para o método 1 e 1(B) para os métodos 2 e 3, livres da presença dos compostos avaliados, o que caracterizava o branco.

3.10.3 – Obtenção das curvas analíticas

As soluções de calibração foram preparadas em triplicata nas seguintes concentrações da mistura racêmica de cada fármaco: 30,0; 40,0; 80,0; 160; 320; 640 e 1280 μ g.L⁻¹ para o omeprazol (método 1), de 5,00; 10,0; 15,0; 20,0; 40,0; 80,0; 160; 320 μ g.L⁻¹ e 1,20; 2,40; 4,80; 6,40; 9,60; 19,2; 38,4; 76,8 μ g.L⁻¹ para o lansoprazol (métodos 2 e 3, respectivamente) e de 10,0; 20,0;

30,0; 40,0; 80,0; 160; 320; 640 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 0,800; 1,60; 3,20; 6,40; 12,8; 25,6; 51,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para o pantoprazol (métodos 2 e 3, respectivamente).

As curvas de calibração foram obtidas através da regressão linear, considerando a área da banda cromatográfica referente a cada concentração dos compostos. Foi considerado um mínimo de cinco diferentes concentrações em cada curva de calibração. A linearidade foi obtida através do valor do coeficiente de correlação.

Foram otimizadas as condições cromatográficas utilizadas em cada método, como discutido nos itens 4.3, 4.4 e 4.5 da sessão Resultados e Discussão. As condições adotadas foram:

- **Método 1 - desenvolvido para o fármaco omeprazol (LC-LC/UV-vis)**

- Bomba 1: vazão de 1,00 mL.min⁻¹**

- 0,00-3,00 min:** água como fase móvel para a exclusão das macromoléculas pela coluna RAM-BSA C₈ (5,0cm x 0,46cm d.i.);

- 3,01–7,60 min:** fase móvel composta de ACN:H₂O (35:65), para a extração dos compostos da coluna RAM-BSA C₈ (5,0cm x 0,46cm d.i.);

- 6,70–7,60 min:** os compostos são transferidos da coluna RAM-BSA C₈ (5,0cm x 0,46cm d.i.) para a coluna analítica [tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose em APS-Nucleosil (500Å, 7 μm) (15,0cm x 0,46cm d.i.)] (**CSP-1**), utilizando como fase móvel ACN:H₂O (35:65);

- 7,61-13,0 min:** Limpeza da coluna extratora, utilizando como fase móvel ACN: H₂O (80:20);

- 13,01-35,0 min:** Condicionamento da coluna extratora em água.

- Bomba 2: vazão de 1,00 mL.min⁻¹**

- 0,00-6,70 min:** condicionamento da coluna analítica, CSP-1, fase móvel ACN:H₂O (35:65);

- 6,70-7,60 min:** a fase móvel é descartada;

- 7,61-35,0 min:** Utilizando como fase móvel ACN:H₂O (35:65) é realizada a análise do omeprazol, com detecção por UV-vis.

- **Métodos desenvolvidos para os fármacos lansoprazol e pantoprazol simultaneamente, LC-LC/UV-vis (método 2) e LC-LC/MS (método 3)**

Bomba 1: vazão de 1,00 mL.min⁻¹

0,00-3,00 min: água como fase móvel para a exclusão das macromoléculas pela coluna RAM-BSA C₈ (5,0cm x 0,46cm d.i.);

3,01-10,0 min: fase móvel composta de ACN:H₂O (35:65), para a extração dos compostos da coluna RAM-C₈-BSA (5,0cm x 0,46cm d.i.);

7,20-9,60 min: os compostos são transferidos da coluna RAM-C₈-BSA (5,0cm x 0,46cm d.i.) para a coluna analítica [tris-(3,5-dimetóxfenilcarbamato) de amilose em APS-Nucleosil (500Å, 7µm) (15,0cm x 0,46cm d.i.)] (CSP-2), utilizando como fase móvel ACN:H₂O (35:65);

9,61-15,0 min: Limpeza da coluna extratora, utilizando como fase móvel ACN: H₂O (80:20);

15,01-40,0 min: Condicionamento da coluna extratora em água.

Bomba 2: vazão de 1,00 mL.min⁻¹

0,00-7,20 min: condicionamento da coluna analítica, CSP-2, fase móvel ACN:H₂O (35:65);

7,20-9,60 min: a fase móvel é descartada;

9,61-40,0 min: Utilizando como fase móvel ACN:H₂O (35:65) é realizada a análise dos fármacos lansoprazol e pantoprazol simultaneamente com detecção por UV-vis (método 2) e espectrometria de massas (método 3).

3.11 – Parâmetros analíticos adotados para validação de fármacos em matrizes aquáticas

A maioria dos trabalhos reportados na literatura para a quantificação de contaminantes em matrizes ambientais seguem as normas preconizadas pelo ICH (International Conference on Harmonization) quanto aos critérios de aceitação para as figuras de mérito do método. Entretanto, como não

existe um guia de validação específico para a análise de compostos em matrizes ambientais, foi adotado o protocolo proposto pela ANVISA ¹¹³ para a validação de métodos bioanalíticos.

Para a validação do método 1 foi usada água coletada no ponto 1(A) e para os métodos 2 e 3 água coletada no ponto 1(B). As figuras de mérito avaliadas foram: seletividade, recuperação, precisão e exatidão, limites de quantificação e de detecção e estabilidade.

3.11.1 – Seletividade

A seletividade do método foi avaliada através de amostras de água da nascente isenta dos compostos omeprazol, lansoprazol e pantoprazol. Em cada sequência de análise procedeu-se a injeção em triplicata das amostras de água sem adição dos analitos.

3.11.2 – Recuperação

A eficiência de extração dos analitos da matriz ambiental foi avaliada utilizando-se as soluções de controle de qualidade, em replicatas (n=5).

O percentual de eficiência da extração das colunas RAM foi calculado por comparação dos resultados obtidos para as soluções controle, preparadas em água residual, com os obtidos com as soluções controle preparadas em água Milli-Q.

3.11.3 – Precisão e exatidão

A precisão intradia e interdia e a exatidão foram avaliadas em três dias não consecutivos, utilizando-se as amostras controle de qualidade do método, as quais foram preparadas em replicata (n=5) em água residual. A

precisão do método foi expressa pelo coeficiente de variação (CV%) das replicatas. A exatidão foi calculada através da razão da média das concentrações encontradas e o valor médio das concentrações nominais, e expressa em porcentagem.

3.11.4 – Limite de quantificação (LQ) e detecção (LD)

O LQ foi estabelecido como a menor concentração, cuja precisão, expressa pelo coeficiente de variação (CV%), não excedeu o valor de 20 % (n=5) e a exatidão (%) apresentou desvios não superiores a 20% do valor nominal da concentração.

O LD foi estabelecido como a menor concentração que apresentou um sinal três vezes maior que o ruído do detector.

3.11.5 – Estabilidade

A estabilidade das amostras foi verificada através da determinação das concentrações das amostras analisadas por interpolação com a curva de calibração. A precisão e exatidão obtidas nestas análises determinaram a estabilidade das amostras, onde foram consideradas estáveis as amostras que apresentavam variabilidade de até 15%, conforme critério de aceitação do método.

A estabilidade das amostras controle de qualidade do método, preparadas em triplicata, foi verificada através da comparação dos resultados obtidos de amostras recém-preparadas (t = 0 horas) com aqueles obtidos, após 24, 48 e 72 horas no auto-injetor. O período de 72 horas foi baseado no tempo excedente de duração das análises para a obtenção da curva analítica.

Para o omeprazol foi realizado um outro teste para verificar a estabilidade de longa duração, onde foram analisadas amostras controle de

qualidade do método, preparadas em triplicata, e armazenadas a 4°C por um período de 7, 10, 13, 16, 19 e 21 dias e estas comparadas aos resultados obtidos com amostras recém preparadas.

3.12 – Análises das amostras

Para os métodos 1 e 2, com detecção por espectroscopia na região do UV-vis, primeiramente foi verificada a linearidade do método a partir da construção de uma curva de calibração com valores de concentração iguais à curva usada para validação do método. Em seguida, as amostras dos pontos de coleta ilustrados no mapa da Figura 3.1 foram injetadas, intercaladas com os controles de qualidade, para verificar se o método permanecia preciso e exato. Para o método 3, com detecção por espectrometria de massas, a linearidade foi verificada antes e após a injeção dos controles de qualidade e das amostras, através da construção de duas curvas de calibração. Foram injetadas amostras dos pontos de coleta ilustrados nos mapas das Figuras 3.1 e 3.2, intercaladas com as amostras controle de qualidade.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Colunas RAM-BSA

As colunas de fase de acesso restrito, especialmente as recobertas com albumina sérica bovina, mostraram excelentes resultados para trabalhos realizados em nosso grupo de pesquisa, na análise de fármacos em plasma humano e bovino, em ovos e também leite.^{55,86,87,89-91,106} Além disso, poucos trabalhos foram publicados utilizando as colunas RAM para tratamento de amostras ambientais^{80,114,115} e nenhuma publicação trabalhando-se com colunas RAM-BSA.

Portanto, para este trabalho foram selecionadas as colunas RAM-BSA, que além de apresentarem bons resultados, como mencionado anteriormente, também são de fácil preparo e baixo custo. Além disso, suas propriedades físico-químicas permitem elas serem utilizadas em várias condições cromatográficas no modo reverso de eluição, o que é uma vantagem se tratando de matrizes aquáticas.

As fases RAM-BSA selecionadas para este trabalho foram a C₈ e C₁₈ (Figura 4.1) por serem as mais empregadas nos trabalhos do grupo com os PPIs, sendo assim, a retenção dos compostos na fase C₈ já estava bem estabelecida enquanto na fase C₁₈ ainda deve ser investigada.^{55,71,76,79}

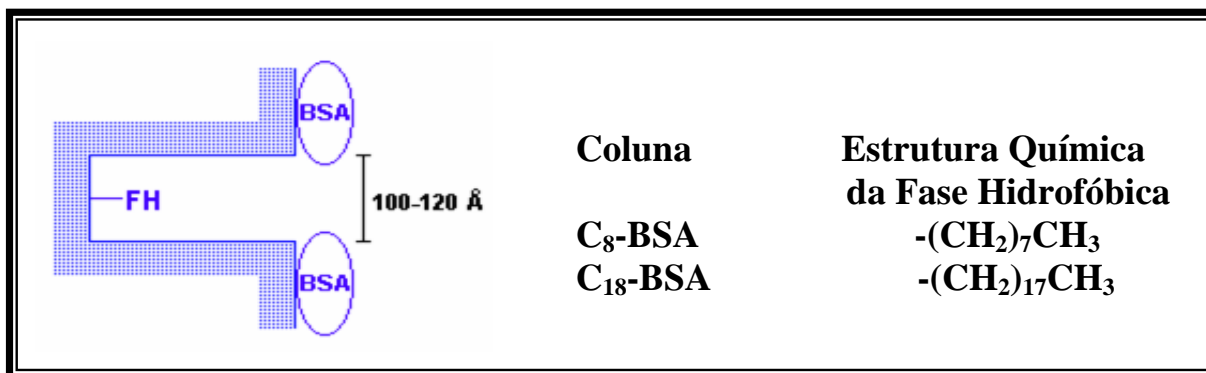
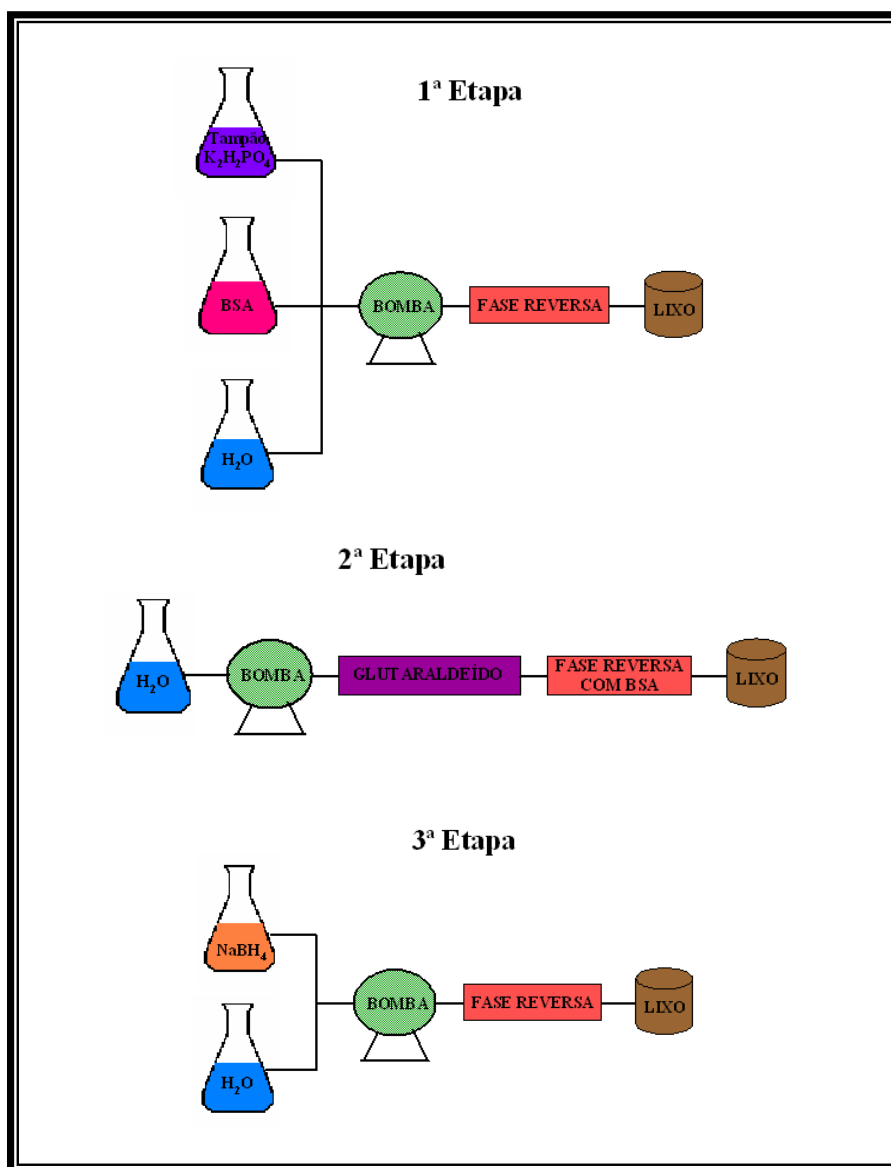


FIGURA 4.1 – Fases hidrofóbicas recobertas com albumina sérica bovina.

4.1.1 – Preparo das colunas RAM-BSA

As fases estacionárias hidrofóbicas, C₈ e C₁₈ Luna 10µm, foram empacotadas em colunas de aço inoxidável (5,00cm x 0,46cm d.i.), separadamente, e a imobilização da BSA foi realizada *in situ*, em três etapas, através da cromatografia frontal com uma solução de BSA, de acordo com o protocolo descrito por Menezes & Felix.⁹³ (Figura 4.2).

FIGURA 4.2 – Etapas do preparo das colunas RAM-BSA. ¹¹⁶

Na primeira etapa, a coluna foi condicionada em tampão KH_2PO_4 ($0,05\text{mol.L}^{-1}$; pH 6,0) e, em seguida, foi eluída a solução de BSA. Após a imobilização da BSA na fase hidrofóbica foi eluída a solução de glutaraldeído pela coluna para que este reaja com os grupos amins livres da albumina, formando iminas que conseqüentemente formam ligações intercruzadas entre a BSA e o glutaraldeído formando Bases de Schiff e estabilizando assim a proteína, o que evita a sua perda durante as análises (Figura 4.3).

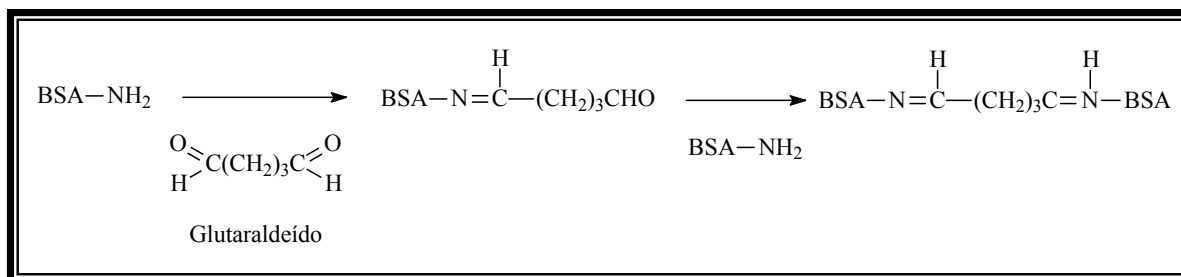


FIGURA 4.3 – Seqüência de reações para estabilização da BSA imobilizada – formação das Bases de Schiff. ¹¹⁶

Para evitar a possível hidrólise da dupla ligação das Bases de Schiff formadas e evitar reações posteriores dos grupos aldeídos residuais, estas duplas ligações foram reduzidas com uma solução de boroidreto de sódio, Figura 4.4.

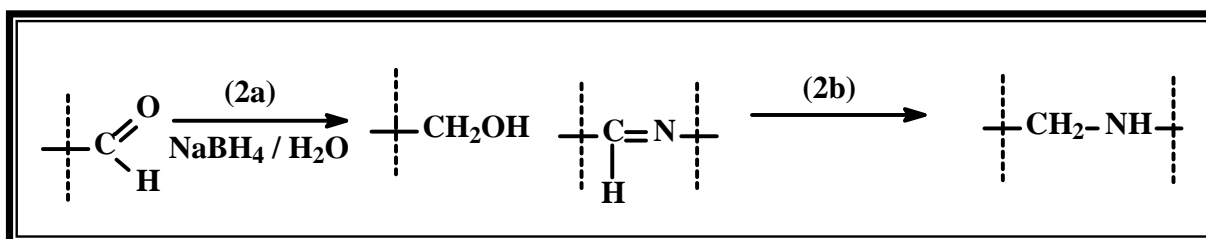


FIGURA 4.4 – Seqüência de reações para estabilização da BSA imobilizada – (2a) redução das Bases de Schiff e (2b) dos aldeídos residuais. ¹¹⁶

4.1.2 – Exclusão das substâncias húmicas pelas colunas

RAM-BSA

A exclusão das substâncias húmicas pelas colunas RAM-BSA preparadas, foi avaliada baseando-se no trabalho de Wu *et al.* ¹¹² Primeiramente, trabalhou-se com uma coluna de permeação em gel, Tsk-gel[®] G3000PW_{XL} (6,00µm; 30,0cm x 7,8mm d.i.) com uma faixa de linearidade de exclusão de peso molecular de 100 a 10000 ordens de grandeza. Utilizando um sistema de CLAE foi injetada uma amostra de padrão de ácidos húmicos (AH) e fúlvicos (AF) aquáticos para verificar o tempo de retenção dos mesmos na coluna Tsk-gel[®] e também seus perfis cromatográficos (Figura 4.5).

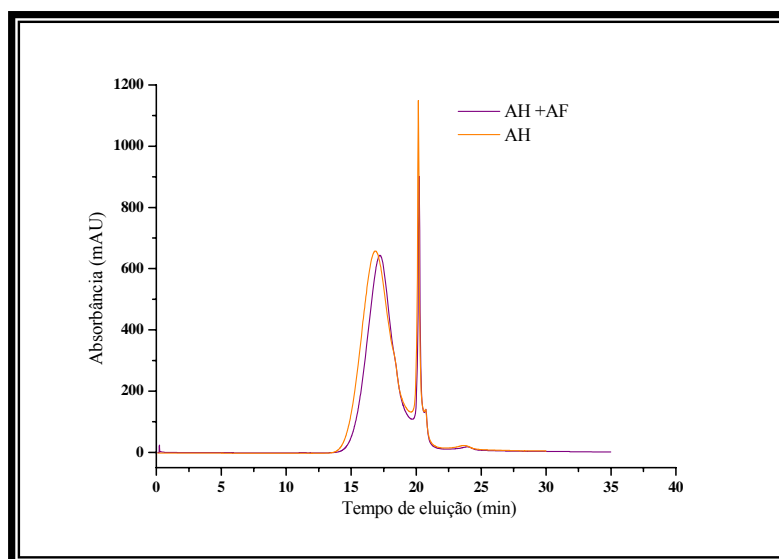


FIGURA 4.5 – Sobreposição dos cromatogramas dos padrões de ácidos húmicos (AH) e fúlvicos (AF) aquáticos na coluna Tsk-gel[®] G3000PWXL. Condições cromatográficas: tampão fosfato (pH 6,8; 0,1mol.L⁻¹); Vazão:0,5mL.min⁻¹; Volume de injeção: 500 μL; $\lambda_{\text{máx}} = 250\text{nm}$.

Em seguida, com o objetivo de verificar o perfil cromatográfico das amostras coletadas de água do ponto 3 (mapa da Figura 3.1) e de estuário do Rio Douro (Ponto S1, mapa da Figura 3.2) estas também foram injetadas na coluna Tsk-gel[®] nas mesmas condições cromatográficas utilizadas anteriormente. Analisando-se os cromatogramas das Figuras 4.5 e 4.6 observa-se a presença de ácidos húmicos e fúlvicos aquáticos nas amostras coletadas, isto se comparando o perfil e o tempo de retenção dos padrões e das amostras coletadas na mesma coluna e nas mesmas condições.

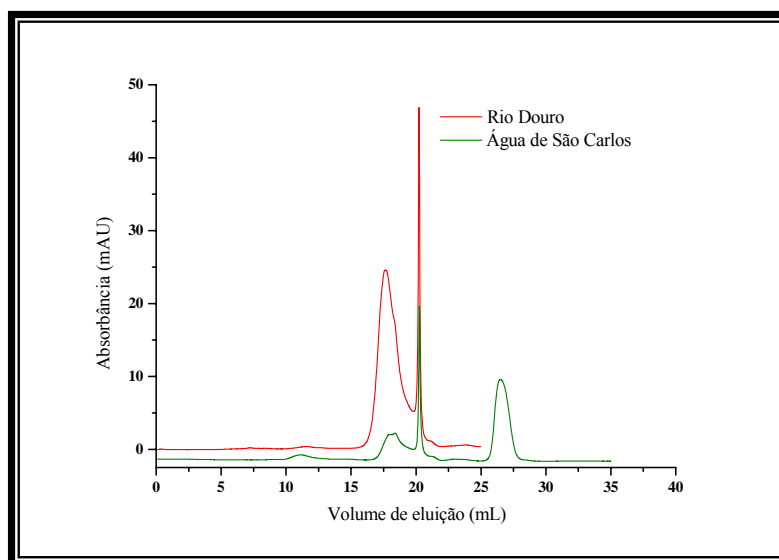


FIGURA 4.6 – Sobreposição dos cromatogramas das amostras de água residual de São Carlos, ponto 3, e água de estuário do Rio Douro, ponto S1, na coluna Tsk-gel[®] G3000PWXL. Condições cromatográficas: tampão fosfato (pH 6,8; 0,1mol.L⁻¹ NaCl); Vazão:0,5mL.min⁻¹; Volume de injeção: 500μL; $\lambda_{\text{máx}}$ = 250nm.

Verificados os perfis cromatográficos, e considerando-os como 100% de exclusão (Figura 4.6), o próximo passo foi avaliar a exclusão das colunas RAM-BSA C₈ e C₁₈ preparadas. Para isso, utilizando um sistema de CLAE, ilustrado na Figura 4.7, a coluna Tsk-gel[®] foi acoplada em série à coluna RAM-BSA C₈ ou C₁₈ (os cromatogramas obtidos estão na Figura 4.8); assim, as substâncias húmicas excluídas pela coluna RAM-BSA podem ser analisadas na coluna Tsk-gel[®]. Comparando-se os valores das áreas obtidas com a análise apenas na coluna de permeação em gel com os valores das áreas obtidas no acoplamento RAM/Tsk-gel[®] foi calculado o percentual de exclusão das macromoléculas pelas colunas RAM-BSA avaliadas. Os resultados encontram-se no gráfico da Figura 4.9.

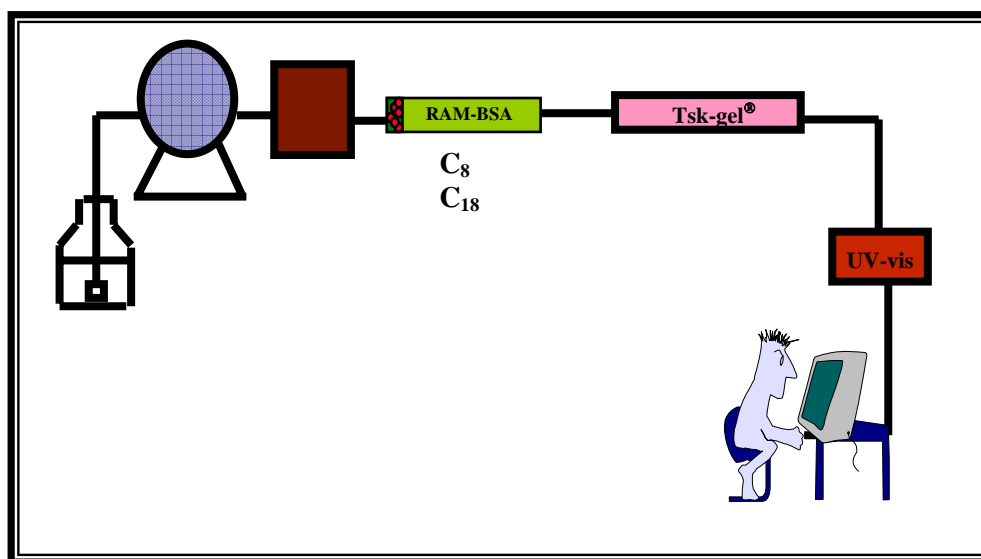


FIGURA 4.7 – Esquema ilustrando o acoplamento em série RAM/ Tsk-gel®.

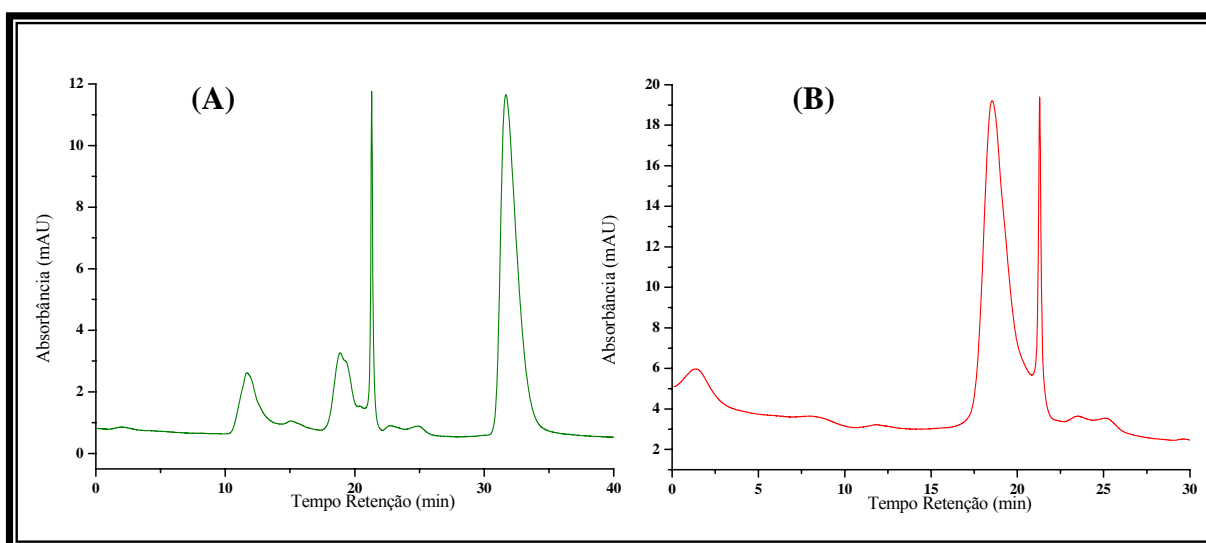


FIGURA 4.8 – Cromatogramas obtidos no acoplamento da coluna Tsk-gel® G3000PWXL à coluna RAM-BSA C₁₈: (A) amostra de água residual do ponto 3 de São Carlos e (B) amostra do ponto S1 do estuário do Rio Douro. Condições cromatográficas: tampão fosfato (pH 6,8; 0,1mol.L⁻¹); Vazão:0,5mL.min⁻¹; Volume de injeção: 500μL; λ_{máx}= 250 nm.

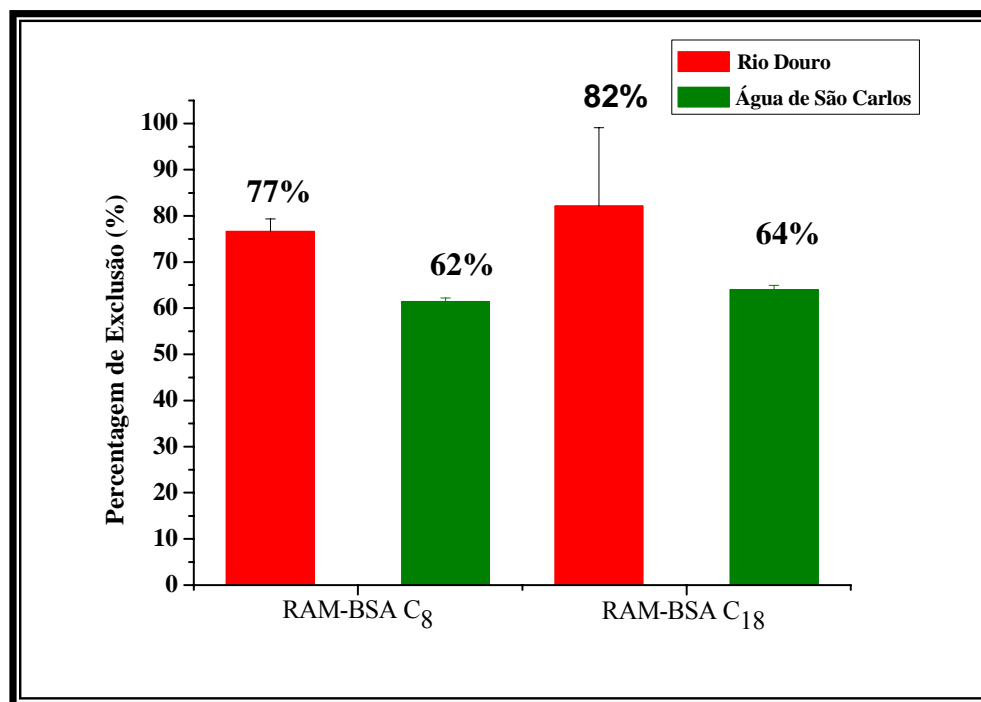


FIGURA 4.9 – Gráfico do percentual de exclusão das colunas RAM-BSA C₁₈ e C₈ para as amostras de água residual de São Carlos e do estuário do Rio Douro.

Elevadas percentagens de exclusão foram obtidas em ambas as colunas de fase de acesso restrito (76,6% - RAM BSA C₈ e 82,1% - RAM BSA C₁₈). Além disso, para as amostras de água do Monjolinho não foram observadas diferenças significativas nos valores de exclusão (61,4% - RAM BSA C₁₈ e 64,0% - RAM BSA C₈). A explicação para esta diferença pode estar relacionada com a composição da água de estuário e da água do Monjolinho. As análises de TOC (*Total Organic Carbon*), Tabela 4.1, mostram concentrações variando entre 90,7 e 346 mg/L nos quatro pontos de coleta no Rio Monjolinho (mapa da Figura 3.1) e entre 27,5 e 39,1 mg/L nos pontos de coleta do estuário do Rio Douro (mapa da Figura 3.2). Para as análises de exclusão foram utilizadas as amostras com valores de TOC iguais a 90,7 e 27,5 mg.mL⁻¹ para as águas do Monjolinho e estuário do Rio Douro, respectivamente.

Com os resultados obtidos pode-se verificar uma grande diferença entre as águas avaliadas, estuário e residual, indicando uma maior concentração de substâncias húmicas na água do Rio Douro, como pode ser verificado

comparando-se as áreas dos cromatogramas da Figura 4.8.

As análises de TOC de todas as amostras coletadas mostram uma maior concentração de matéria orgânica nas águas residuais, com valores de TOC cerca de 10 vezes maior em relação à água do estuário do Rio Douro. Apesar do elevado teor de matéria orgânica nas amostras de águas residuais, apenas uma pequena quantidade pode ser atribuída a substâncias húmicas, como ilustrado na Figura 4.8, sendo em sua grande maioria composta por moléculas pequenas. Portanto, o percentual de exclusão para a água de estuário foi mais elevado, já que nesta água a concentração de SH é maior. Isto não indica que a coluna RAM-BSA não seja eficiente na exclusão de SH de águas residuais, apenas que uma pequena quantidade de macromoléculas encontra-se presentes nestas amostras.

TABELA 4.1: Valores de TOC e pH das amostras coletadas.

Amostras	Estuário		Amostras	Residual	
	TOC (mg.mL ⁻¹)	pH		TOC (mg.mL ⁻¹)	pH
S1	29,5	7,32	P1	90,7	7,33
S2	27,5	7,57	P2	327	7,42
S3	29,9	7,63	P3	283	7,54
S4	30,7	7,75	P4	346	7,60
S5	32,3	7,83	-	-	-
S6	39,1	7,96	-	-	-

Como mencionado anteriormente, os PPIs já foram estudados em nosso grupo de pesquisa em trabalhos utilizando colunas RAM-BSA, portanto, já era de conhecimento que a fase C₈ apresentava uma boa retenção para o omeprazol, pantoprazol e lansoprazol enquanto a C₁₈ ainda não havia sido estudada. Sendo assim, a fase RAM-BSA C₈ foi selecionada para o desenvolvimento do trabalho, já que também não apresentava grandes diferenças

quanto ao percentual de exclusão de substâncias húmicas, para a água residual, quando comparada à RAM-BSA C₁₈.

Para verificar o perfil e tempo de exclusão das macromoléculas na coluna selecionada foram injetados 500 e 1000 μ L (volume de injeção escolhido para os métodos) de amostras de água residual (n=6) utilizando água Milli-Q como fase móvel. O cromatograma da Figura 4.10 mostra o perfil e tempo de exclusão, 3 minutos, observado em ambos os volumes injetados.

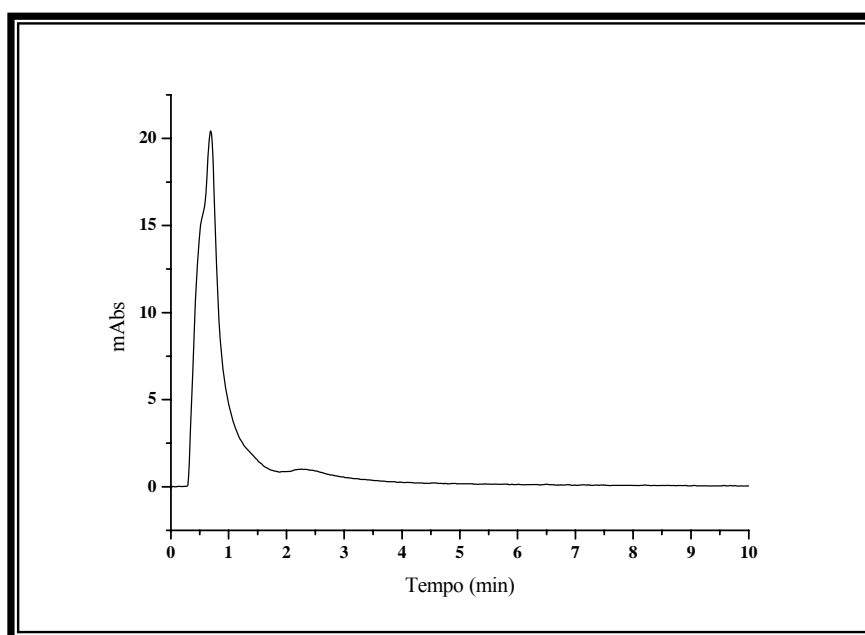


FIGURA 4.10 – Cromatograma referente à amostra de água residual do ponto 3 de São Carlos, do mapa da Figura 3.1. Condições cromatográficas – Coluna RAM BSA C₈ (5,0cm x 0,46cm d.i.); água Milli-Q, Vazão: 1,0mL.min⁻¹; Volume de injeção: 500 μ L; $\lambda_{\text{máx}}$ =280nm.

Com o intuito de verificar a faixa de massa molecular das macromoléculas excluídas nas amostras investigadas, injetou-se no sistema em série RAM/Tsk-gel[®] padrões de poliestirenos sulfonatos de sódio com diferentes pesos moleculares (8000, 18000, 46000 e 100000 Da).¹¹² Assim, comparando-se o tempo de retenção das substâncias húmicas (cromatograma da Figura 4.8), entre 15,0 e 20 minutos, e dos padrões, foi concluído que a faixa de peso

molecular das substâncias húmicas excluídas foi da ordem de 18000 Da, como pode-se verificar na sobreposição de cromatogramas da Figura 4.11.

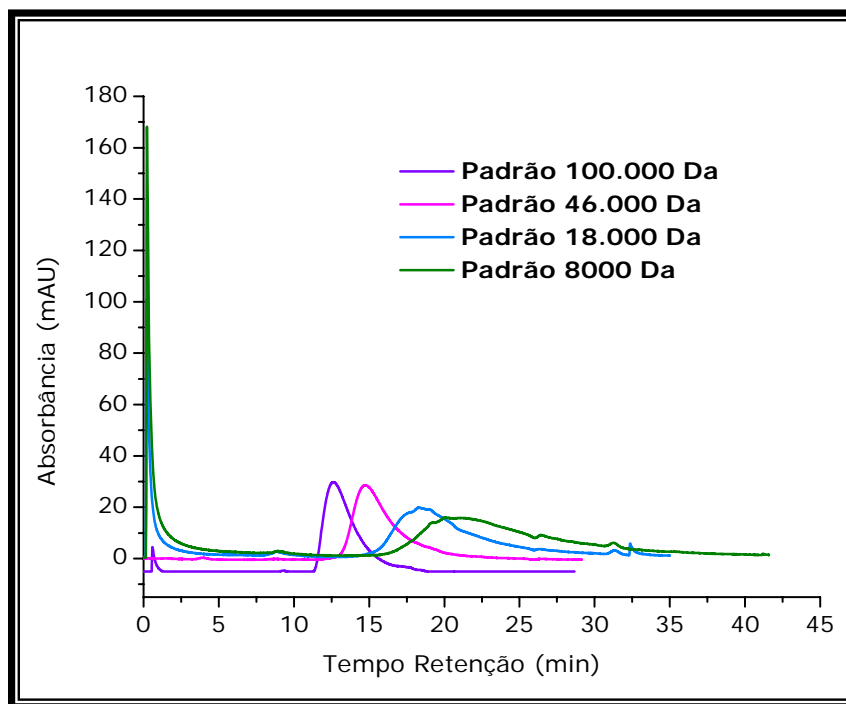


FIGURA 4.11 – Cromatogramas obtidos pelo acoplamento da coluna Tsk-gel® G3000PWXL a uma coluna RAM-BSA C₁₈ dos padrões de poliestirenos sulfonados de sódio de diferentes pesos moleculares. Condições cromatográficas: tampão fosfato (pH 6,8; 0,1mol.L⁻¹ NaCl); Vazão: 0,5mL.min⁻¹; Volume de injeção: 500μL; λ_{máx} = 250nm.

4.2 - Síntese, caracterização e avaliação das fases tris (arilcarbamatos) de amilose

O preparo das fases estacionárias quirais envolveu a síntese dos carbamatos, derivatização e recobrimento do suporte, o empacotamento, condicionamento e posterior avaliação das colunas preparadas. Todas as fases estacionárias foram preparadas em nosso grupo de pesquisa, de acordo com a literatura.¹¹⁷

A síntese das fases tris (arilcarbamatos) envolve a reação da amilose ou celulose com o isocianato de arila correspondente. Na reação ocorre

o ataque nucleofílico dos grupos hidroxila do polissacarídeo ao eletrófilo (carbonila do isocianato), levando às substituições destes grupos e à formação do carbamato (Figura 4.12).

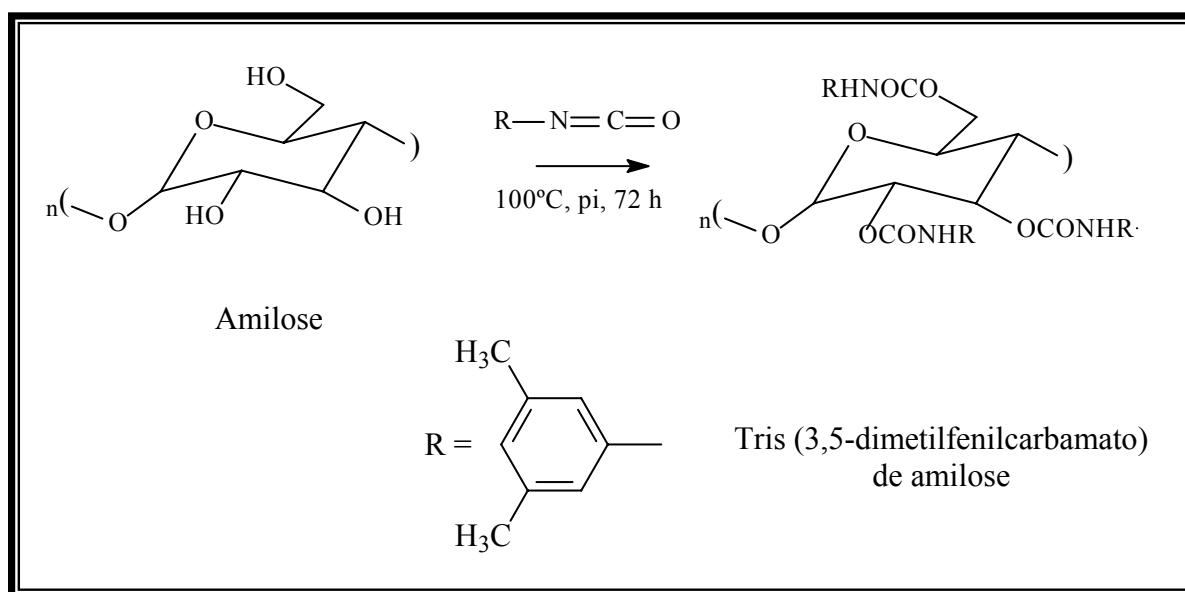


FIGURA 4.12 - Esquema da síntese do tris (arilcarbamato) de amilose, utilizando o tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose como exemplo.

Nesta reação utilizam-se condições anidras devido à alta reatividade do isocianato, o qual reage rapidamente com água levando à formação de ácido carbâmico, que perde dióxido de carbono formando uma amina primária, que por sua vez pode reagir com isocianato, resultando em um derivado de uréia (Figura 4.13). Além disso, é necessário o controle rigoroso da temperatura, pois quando superiores às indicadas podem provocar a caramelização do produto, tornando-o inadequado para o empacotamento.

A formação de grandes quantidades de derivados de uréia durante a reação de derivação provoca perda de fase estacionária na etapa de condicionamento, tornando a coluna muitas vezes inadequada para o uso. Outros inconvenientes são o aumento da pressão e a perda de performance na separação dos compostos.

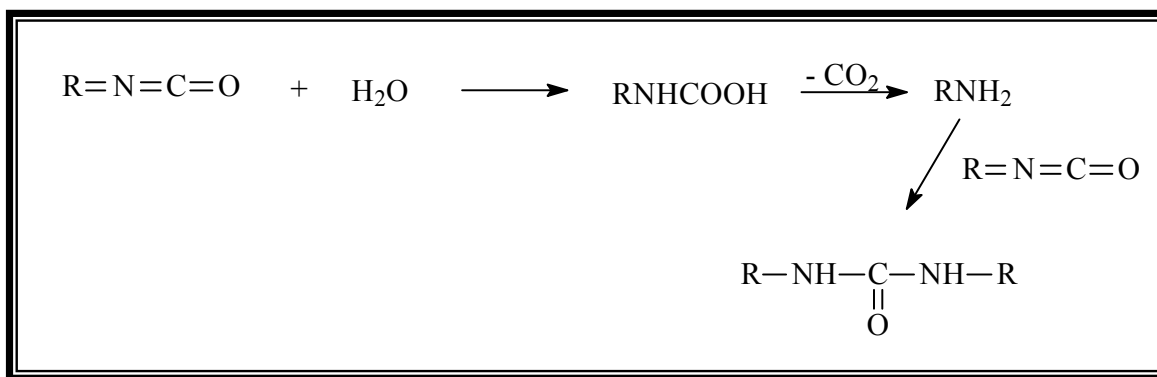


FIGURA 4.13 – Esquema da reação do isocianato com a água.⁴³

As fases sintetizadas, Figura 4.14, foram caracterizadas por espectroscopia no infravermelho (IV) e análise elementar.

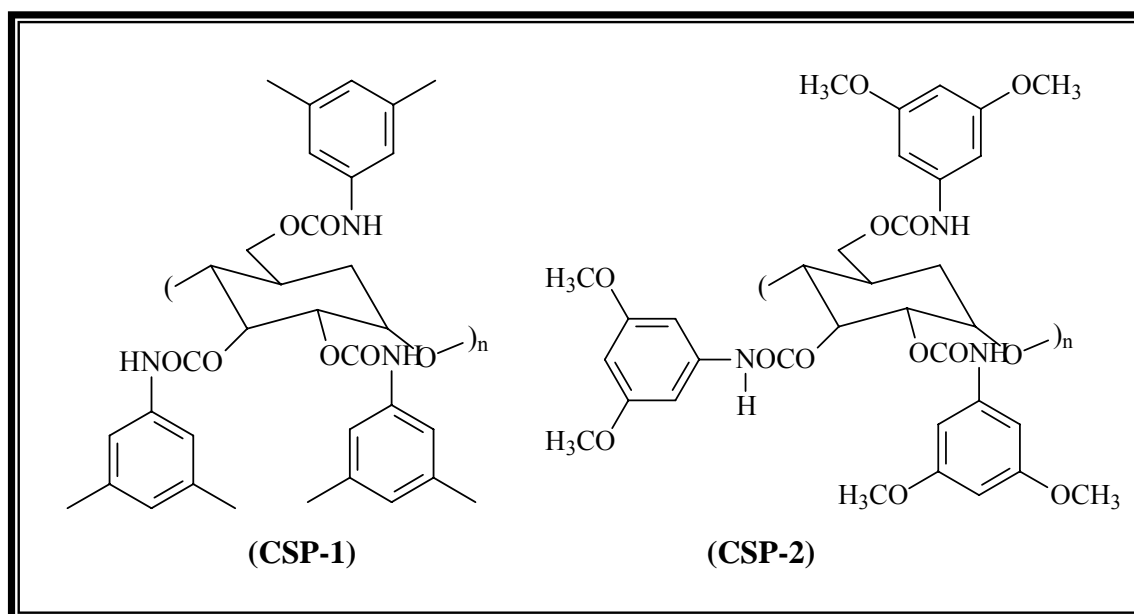


FIGURA 4.14 – Carbamatos preparados para cobertura na sílica. **CSP-1: tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose** e **CSP-2: tris (3,5-dimetóxfenilcarbamato) de amilose**

O espectro no IV da amilose não derivada (Figura 4.15) mostra uma intensa e característica absorção em 3534 cm^{-1} , que corresponde aos estiramentos dos grupos hidroxilas (-OH). Após a reação da amilose com o isocianato, pode-se observar que o espectro no IV (representado na Figura 4.16 para a CSP-1) mostra a derivação dos grupos hidroxila (-OH) através de uma intensa absorção em 1726 cm^{-1} , referente à deformação axial das ligações C=O

dos grupos carbamatos, em 3304cm^{-1} uma absorção correspondente à deformação axial do grupo $-\text{NH}$ e uma absorção em 1222cm^{-1} referente ao estiramento da ligação C-N.

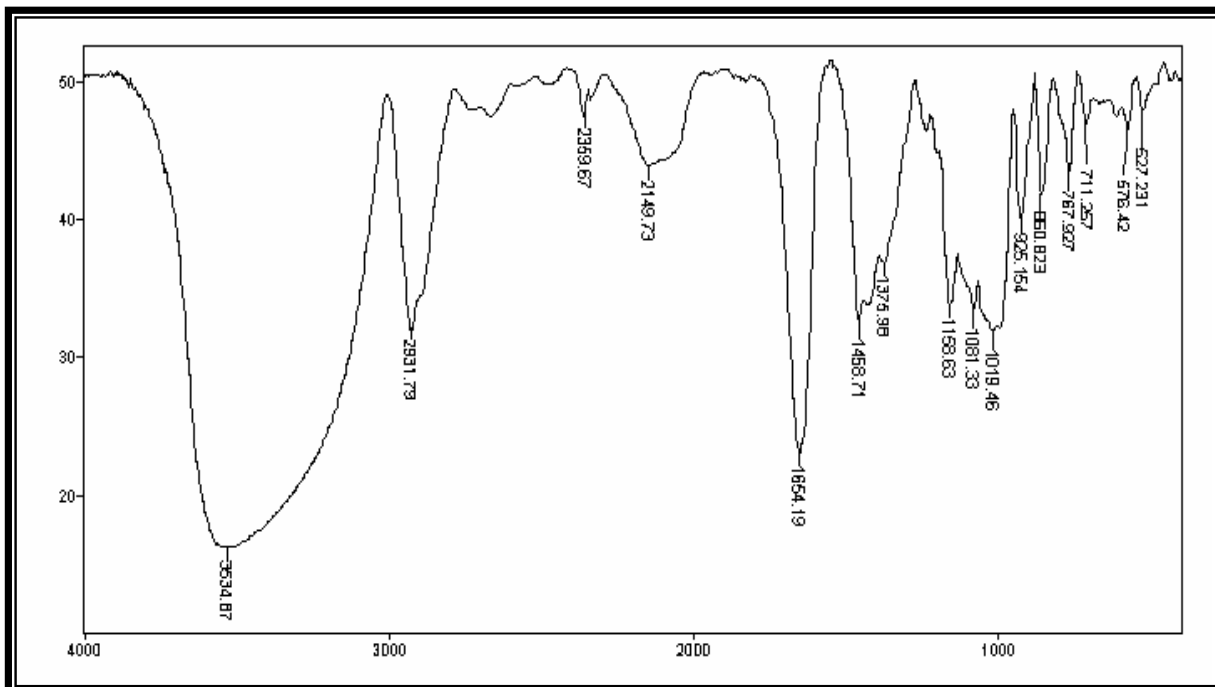


FIGURA 4.15 – Espectro no IV da amilose não derivada.

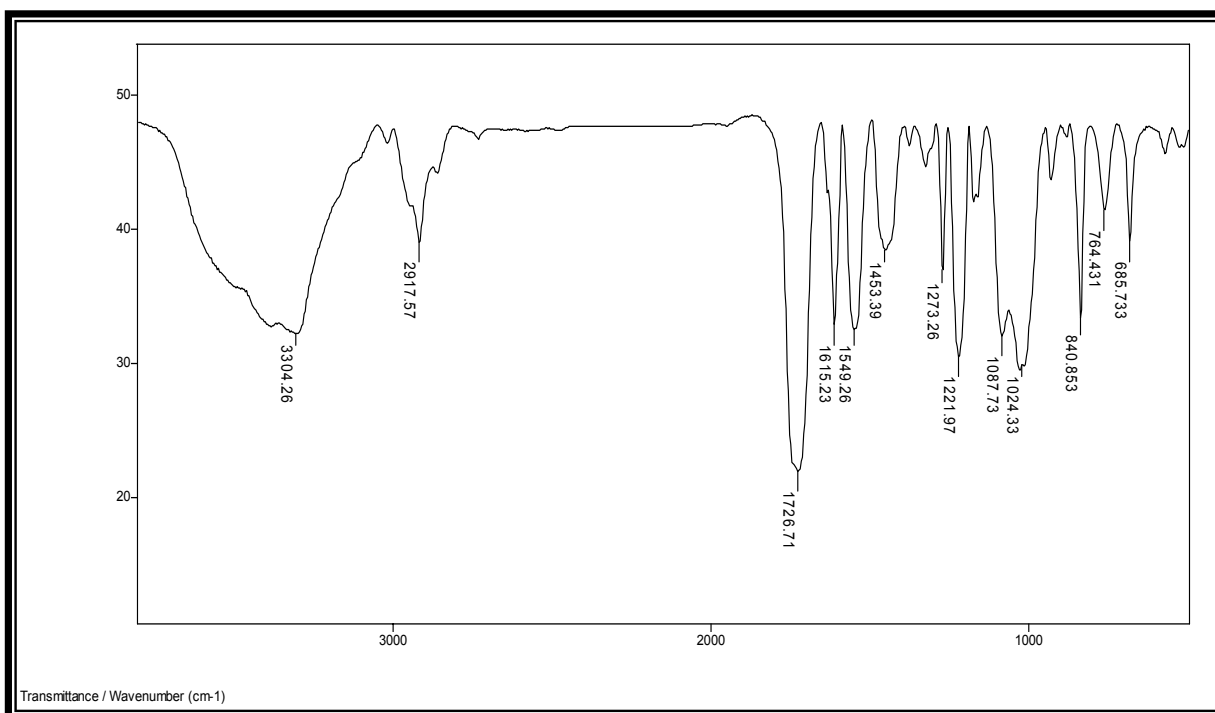


FIGURA 4.16 – Espectro no IV da CSP-1 sintetizada

Os resultados das análises de IV obtidos para a outra fase estacionária quiral sintetizada, CSP-2, estão apresentados na Tabela 4.1.

TABELA 4.2 - Principais bandas no infravermelho encontradas para as fases estacionárias quirais sintetizadas.

Substância	ν C=O (cm^{-1})	ν N-H (cm^{-1})	ν C-N (cm^{-1})
CSP-1	1726	3304	1222
CSP-2	1746	3321	1204

Para calcular o percentual de carbono derivado, foram realizadas análises elementares de cada fase estacionária sintetizada. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 4.2.

TABELA 4.3 – Resultados da análise elementar das CSPs sintetizadas.

Substância	Massa Molar ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	Valores Teóricos (%)	Valores Experimentais (%)	% C DERIVADO
CSP -1 ($\text{C}_{33}\text{H}_{37}\text{O}_8\text{N}_3$)	602,9	C = 65,66 N = 6,96 H = 6,18	C = 57,5 N = 6,07 H = 5,82	87,6%
CSP -2 ($\text{C}_{33}\text{H}_{37}\text{O}_{14}\text{N}_3$)	698,9	C = 56,65 N = 6,00 H = 5,29	C = 54,6 N = 5,01 H = 5,77	96,4%

A análise elementar não mostrou um bom percentual de derivação para a CSP-1, entretanto é possível obter-se uma boa enantiorresolução com este valor.

Foi realizada a síntese do carbamato e a derivação da sílica para posterior cobertura do carbamato ao suporte APS-Nucleosil, e empacotamento da fase estacionária.

A sílica utilizada como suporte nas colunas de polissacarídeos foi a sílica APS-Nucleosil (500Å, 7 μm), a qual não esta disponível comercialmente

na forma aminopropilada, tendo sido derivada no nosso grupo de pesquisa de acordo com o procedimento descrito na sessão 3.2. Em seguida foi recoberta a 20% g/g (20g do carbamato para cada 100g de fase) com os carbamatos sintetizados.

As duas colunas quirais apresentaram bandas cromatográficas simétricas e bons valores de enantioseparação [α = 1,84 (CSP-1); 1,62 (CSP-2)] e enantiorresolução [R_s = 6,55 (CSP-1); 3,52 (CSP-2)] para o padrão quiral (\pm)-óxido de trans-estilbeno, com isso foram avaliadas para a separação do omeprazol, lansoprazol e pantoprazol.

4.2.1 – Avaliação da enantiorresolução e enantioseparação dos fármacos omeprazol, lansoprazol e pantoprazol na CSP-1 e CSP-2 no modo reverso de eluição

O modo reverso de eluição foi selecionado para a otimização da separação dos enantiômeros nas colunas quirais, uma vez que o método em desenvolvimento envolve a cromatografia multidimensional com injeção direta de amostra, onde as colunas RAM-BSA realizam a extração dos fármacos e exclusão das macromoléculas das amostras (primeira dimensão) e a coluna quiral a separação enantiomérica (segunda dimensão).

É importante ressaltar que o uso de altos percentuais de solvente orgânico pode prejudicar a estrutura da coluna RAM, uma vez que sua superfície é recoberta com proteína (BSA). Tendo conhecimento de que as colunas RAM-BSA têm contato direto com a matriz, água residual ou de estuário, a exclusão das macromoléculas e transferência dos analitos para a coluna quiral é realizada com água e/ou uma pequena percentagem de solvente orgânico. Complementando, estes compostos já vêm sendo estudados em nosso grupo de pesquisa há alguns anos, portanto já era de conhecimento uma boa

resolução dos enantiômeros no modo reverso de eluição nas fases estacionárias quirais preparadas.⁷⁷

Partindo dos resultados obtidos por Montanari *et al.*⁷⁷ foram avaliadas diferentes proporções do modificador orgânico acetonitrila (ACN) na enantiorresolução dos fármacos tanto para a CSP-1 quanto para a CSP-2. Os melhores resultados estão apresentados na Figura 4.17.

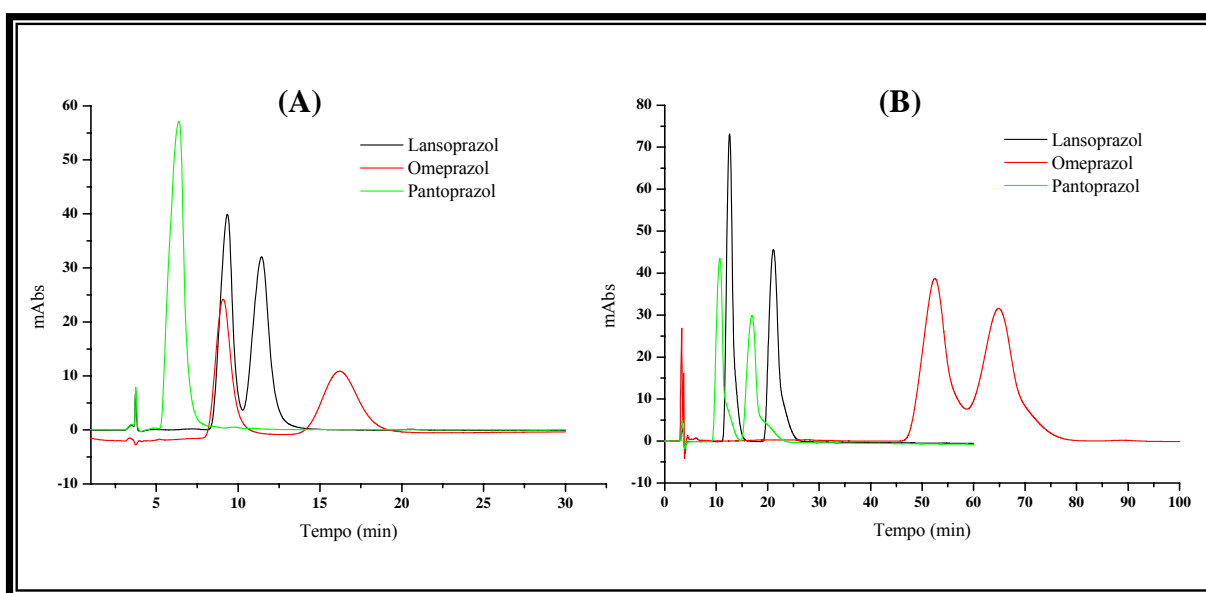


FIGURA 4.17 – Sobreposição dos cromatogramas referentes às amostras de cada fármaco na concentração de $20\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ na CSP-1 (A) e na CSP-2 (B). Condições cromatográficas: ACN:H₂O (35:65); Vazão: $1,0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; Volume de injeção: $50\mu\text{L}$; (A) $\lambda_{\text{máx}} = 302\text{nm}$, (B) $\lambda_{\text{máx}} = 285\text{nm}$.

Os cromatogramas da Figura 4.17 (A) ilustram a alta enantiorresolução do omeprazol ($\alpha=2,37$; $R_s=1,95$) na coluna CSP-1. Entretanto, a discriminação quiral obtida para o lansoprazol foi inferior ($\alpha=1,40$; $R_s=1,25$) enquanto o pantoprazol não foi enantiorresolvido.

Boas enantiorresoluções foram conseguidas para os fármacos lansoprazol e pantoprazol na coluna CSP-2, com valores de α iguais a 1,90 e 1,81 e R_s de 3,20 e 1,94, respectivamente. Enquanto que os enantiômeros do omeprazol eluíram com um tempo de análise muito longo, levando a um

alargamento das bandas cromatográficas e também uma baixa resolução enantiomérica ($\alpha=1,24$ e $R_s=1,12$).

Apesar das colunas CSP-1 e CSP-2 apresentarem boa enantiorresolução para os fármacos selecionados no trabalho, em ambas ocorre a co-eluição dos enantiômeros, o que torna difícil a enantioseparação e enantiorresolução dos fármacos em uma mesma coluna quiral. Portanto, a coluna CSP-1 foi escolhida para se trabalhar com o omeprazol e a coluna CSP-2 com o lansoprazol e pantoprazol.

Assim, devido ao elevado consumo do fármaco omeprazol tanto no Brasil como no mundo, este foi selecionado para o desenvolvimento e validação do primeiro método multidimensional enantiosseletivo com injeção direta de amostra.

4.3 - Desenvolvimento e validação do método enantiosseletivo LC-LC/UV-vis para o fármaco omeprazol

A cromatografia multidimensional consiste no acoplamento de duas ou mais colunas com mecanismos de separação diferentes. Para o desenvolvimento de métodos por CLAE multidimensional *on-line* faz-se necessário o ajuste de diversos parâmetros. Primeiramente deve ser selecionada corretamente a fase móvel para exclusão das macromoléculas, para que se obtenha as melhores condições de exclusão das mesmas e também de compostos interferentes; em seguida deve ser escolhida a fase móvel de extração do analito da coluna de fase de acesso restrito, com um adequado tempo de retenção; finalmente, as condições de fase móvel e vazão da coluna analítica quiral para uma melhor resolução dos enantiômeros de cada fármaco na análise multidimensional.

Durante o acoplamento das duas colunas, período de transferência dos analitos da coluna RAM para a coluna analítica, o tempo de acoplamento

deve ser o mínimo possível para evitar a transferência de compostos interferentes. Além disso, quando as duas colunas estão acopladas ocorre uma mistura das fases móveis, que pode afetar posteriormente a separação dos compostos na coluna analítica, isto dependendo do tempo do acoplamento e das fases móveis utilizadas.

Assim, primeiramente foram avaliadas a exclusão das substâncias húmicas e a eluição dos enantiômeros do omeprazol na coluna RAM-BSA C₈. A configuração do sistema cromatográfico utilizado está representada na Figura 4.18 (Posição 1) e as condições cromatográficas do método na Tabela 4.3.

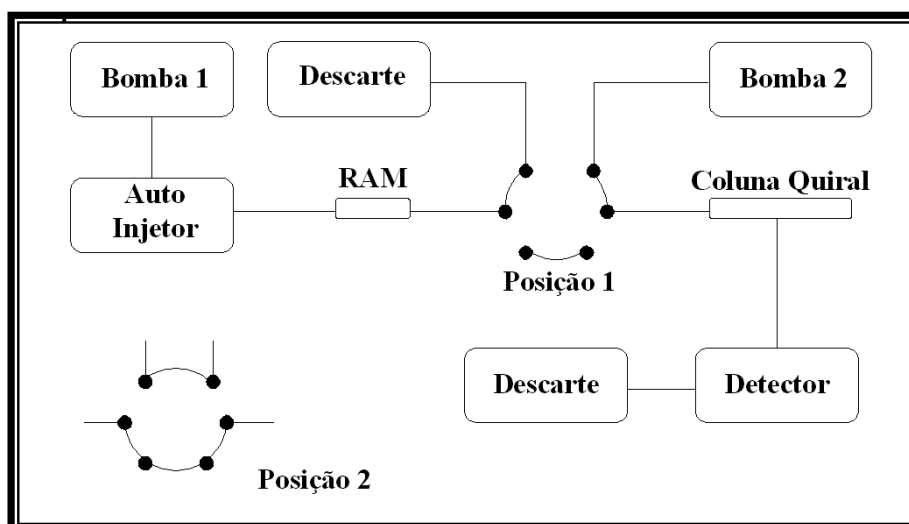


FIGURA 4.18 – Diagrama do sistema multidimensional utilizado para o desenvolvimento e validação do método. Posição 1: Coluna RAM e coluna quiral desacopladas; Posição 2: colunas RAM e quiral acopladas (transferência dos analitos).

TABELA 4.4 – Condições cromatográficas utilizadas para a exclusão das macromoléculas e eluição dos analitos na coluna RAM-BSA C₈.

Linha da Bomba	Tempo (min)	Evento/ Posição da válvula
A	0,00-3,00	Exclusão das macromoléculas pela coluna RAM-BSA / 1
B	3,01-7,60	Eluição dos analitos retidos na coluna RAM-BSA / 1
C	7,61-13,0	Limpeza da coluna RAM-BSA / 1
A	13,01-18,0	Condicionamento da coluna RAM-BSA / 1

Linha A: água Milli-Q; linha B: ACN:H₂O (35:65); linha C: ACN:H₂O (80:20); vazão de 1,0 mL.min⁻¹; $\lambda_{\text{máx}} = 302\text{nm}$.

O cromatograma da Figura 4.19 ilustra a eficiente retenção do analito na coluna RAM-BSA C₈, sendo esta superior ao tempo necessário para a exclusão das macromoléculas, o que possibilita o acoplamento com a coluna quiral CSP-1.

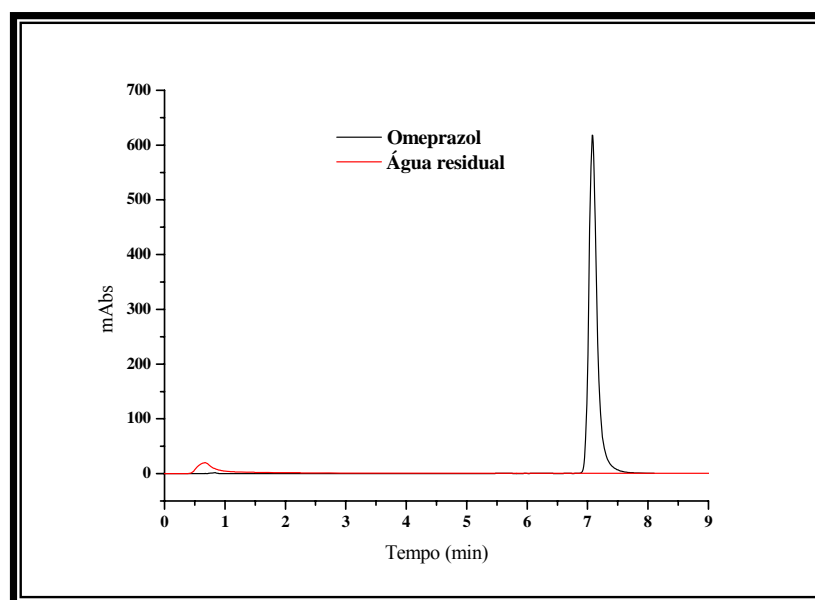


FIGURA 4.19 – (A) Cromatograma de água residual fortificada com omeprazol na concentração de $50\mu\text{g.mL}^{-1}$ na coluna RAM-BSA C₈ (5,0 x 0,46 cm d.i.). Condições cromatográficas de acordo com a Tabela 4.3.

Assim, utilizando o sistema cromatográfico configurado para o modo multidimensional (Figura 4.18), acoplou-se à coluna RAM-BSA C₈ a coluna quiral CSP-1. As condições cromatográficas utilizadas encontram-se na Tabela 4.4 e o cromatograma da separação analítica na Figura 4.20.

TABELA 4.5 – Condições cromatográficas utilizadas no método LC-LC/UV-vis desenvolvido para o omeprazol

Bomba / Linha	Tempo (min)	Evento/ Posição da válvula
Bomba 1 / A	0,00-3,00	Exclusão das macromoléculas pela coluna RAM-BSA / 1
Bomba 1 / B	3,01-7,60	Eluição dos analitos retidos na coluna RAM-BSA / 1
Bomba 1 / B	6,70-7,60	Transferência dos analitos da coluna RAM-BSA para a coluna CSP-1 / 2
Bomba 2	6,70-7,60	Fase móvel descartada / 2
Bomba 1 / C	7,61-13,0	Limpeza da coluna RAM-BSA / 1
Bomba 1 / A	13,01-35,0	Condicionamento da coluna RAM-BSA / 1
Bomba 2	0,00-6,70	Condicionamento da coluna CSP-1 / 1
Bomba 2	7,61-35,0	Separação dos enantiômeros na coluna CSP-1 / 1

Bomba 1: linha A - água Milli-Q; linha B - ACN:H₂O (35:65); linha C - ACN:H₂O (80:20); vazão de 1,0 mL.min⁻¹. Bomba 2: ACN:H₂O (35:65); vazão de 1,0 mL.min⁻¹; $\lambda_{\text{máx}} = 302\text{nm}$.

Analisando o cromatograma obtido para o acoplamento, Figura 4.20, observa-se uma boa enantiorresolução e enantiosseletividade. Portanto, esta foi a condição adotada para a validação do método.

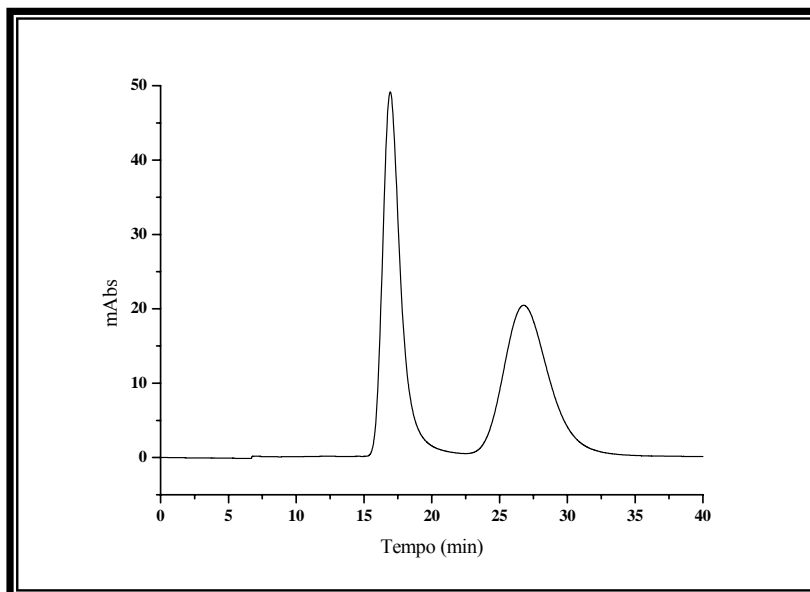


FIGURA 4.20 – Cromatograma da separação dos enantiômeros do fármaco omeprazol, na coluna CSP-1. Condições cromatográficas de acordo com a Tabela 4.4.

Determinadas as condições cromatográficas do método, foi investigada a ordem de eluição de cada enantiômero (Figura 4.21) utilizando-se para isto um detector de dicroísmo circular (DC) acoplado ao detector de UV-vis. O detector de DC possui uma elevada seletividade, sendo específico para a detecção de compostos quirais. Porém, como o mesmo é pouco sensível, é necessária uma alta concentração do analito para que este seja detectado sem que seu sinal se pareça com um ruído.^{118,119} A detecção se baseia na passagem da luz circular polarizada pela amostra e desvios de mesmo valor (em graus), mas direções opostas para cada enantiômero. Sendo assim é obtido um sinal positivo (referente ao enantiômero +) e um sinal negativo (referente ao enantiômero -).^{118,119}

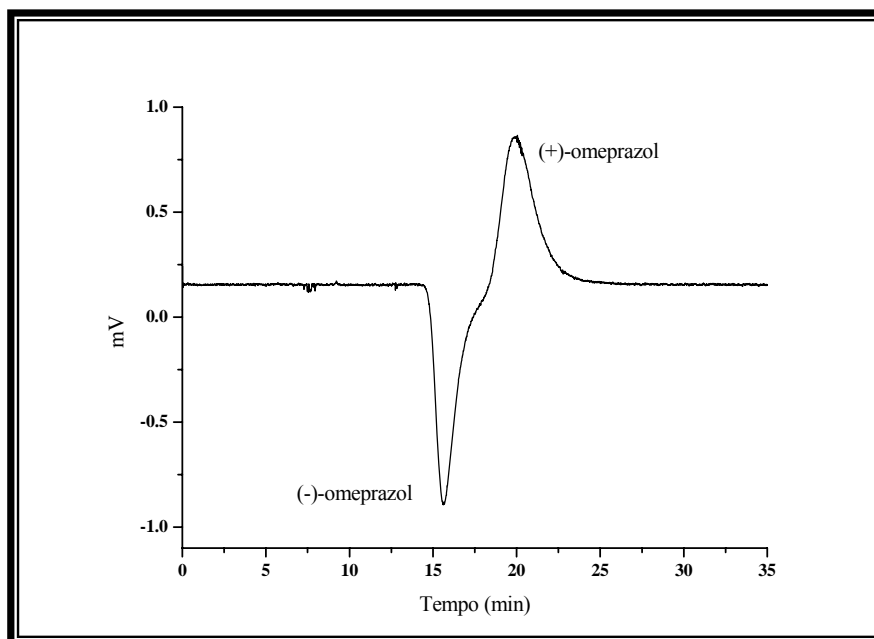


FIGURA 4.21 – Cromatograma da separação dos enantiômeros do omeprazol ($200\mu\text{g.mL}^{-1}$). Condições cromatográficas de acordo com a Tabela 4.4.

4.3.1 – Validação do método

Com as condições cromatográficas estabelecidas para a quantificação dos enantiômeros do omeprazol, em amostras de água residual da cidade de São Carlos, os métodos analíticos foram validados de acordo com o Guia de validação proposto pelo FDA¹²⁰ e pela ANVISA¹¹³ para métodos bioanalíticos, como já discutido anteriormente no item 3.11. As figuras de mérito analíticas avaliadas foram: seletividade, linearidade, recuperação (ou eficiência de extração), precisão e exatidão, limite de quantificação e detecção e estabilidade.

4.3.1.1 – Seletividade

A seletividade do método foi avaliada comparando-se análises de amostras de água do ponto 1(A), matriz, livre dos analitos ($n=3$), com amostras

da matriz fortificadas com o fármaco (n=3). Os cromatogramas encontram-se na Figura 4.22 onde se observa a ausência de interferentes co-eluído com as bandas cromatográficas de cada enantiômero.

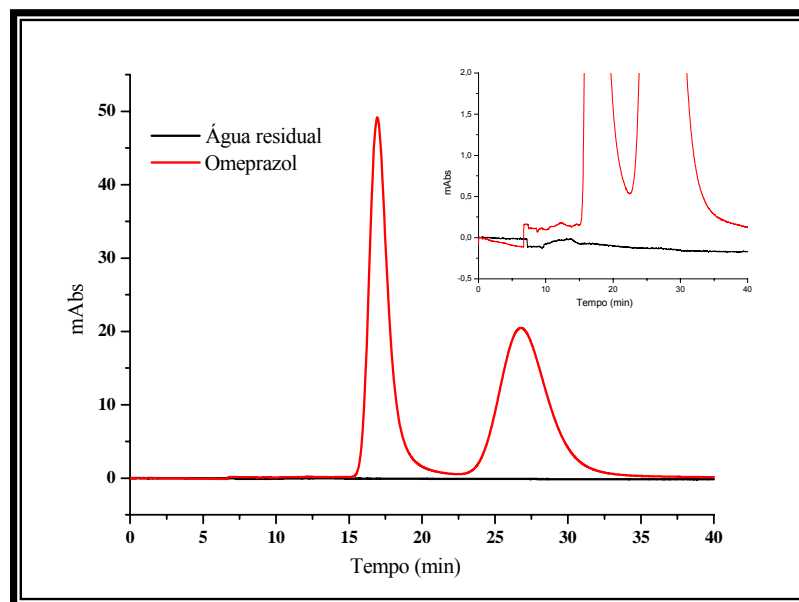


FIGURA 4.22 – Sobreposição do cromatograma da separação dos enantiômeros do omeprazol em água do ponto 1(A), fortificada, com o cromatograma da água do ponto 1(A) sem a presença do analito. Condições cromatográficas de acordo com a Tabela 4.4.

4.3.1.2 – Linearidade

Trabalhos recentemente publicados com pré-tratamento de amostra por extração em fase sólida e detecção por espectrometria de massas apresentam limites de quantificação para a mistura racêmica do omeprazol iguais a 0,002 e 0,025 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, isto partindo-se de 1 litro de amostra que foi reduzida a 20 μL após a concentração no cartucho de SPE, ou seja, a amostra foi concentrada cerca de 50000 vezes. Entretanto, mesmo com esses baixos limites o fármaco não foi detectado ao aplicar-se o método.^{104,121}

Na busca pelos menores limites de quantificação e detecção possíveis para um método por injeção direta e detecção por UV-vis, o volume máximo de injeção permitido pela alça dosadora do auto-injetor usado foi analisado (500 μ L).

As curvas de calibração para o (+)-omeprazol e (-)-omeprazol foram plotadas em função das áreas das bandas cromatográficas relativas às seguintes concentrações: 15,0; 20,0; 40,0; 80; 160; 320 e 640 μ g.L⁻¹. As amostras foram preparadas em água do ponto 1(A), em triplicata, e foram injetados 500 μ L. As curvas analíticas foram obtidas através de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e estão apresentadas na Figura 4.23.

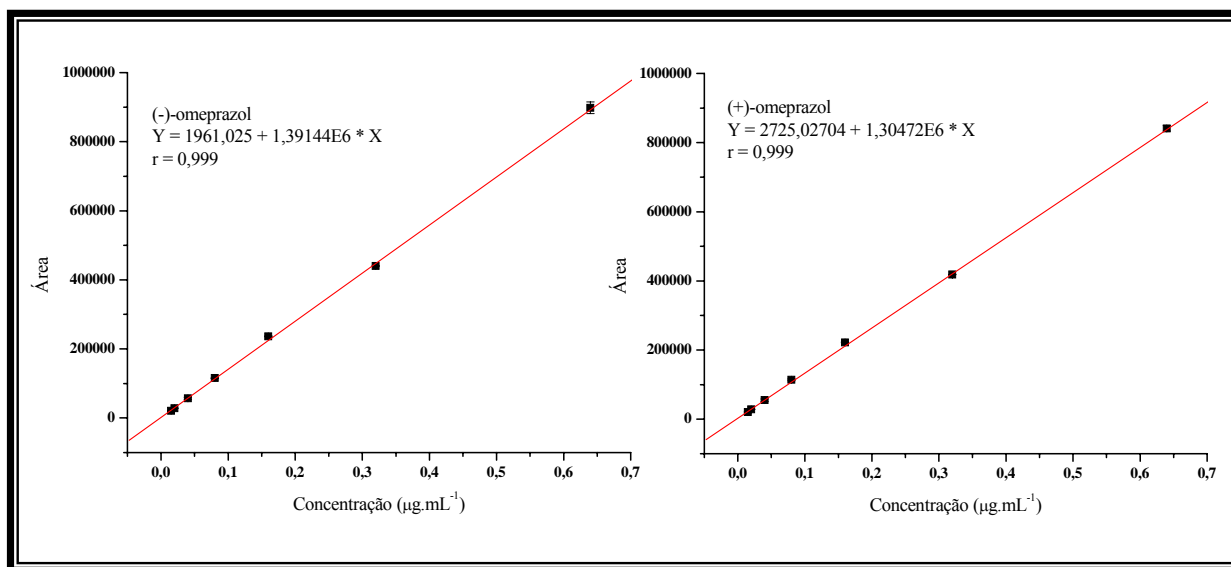


FIGURA 4.23 – Curvas analíticas para o (+)-omeprazol e (-)-omeprazol.

As curvas analíticas foram lineares na faixa de 15,0 – 640 μ g.L⁻¹ para cada enantiômero e os coeficientes de correlação linear (r) obtidos apresentaram valores acima de 0,99. A precisão expressa pelos coeficientes de variação (CV%) das triplicatas foram inferiores a 15%, e a exatidão apresentou um desvio menor que 15% do valor nominal de concentração em todas as concentrações da curva, exceto para o limite de quantificação (primeiro ponto da curva) onde o desvio encontrado foi de 15-20%. Todos os valores obtidos estão

dentro dos critérios estabelecidos para validação de métodos bioanalíticos no protocolo adotado.

4.3.1.3 – Precisão e exatidão

Para avaliar estas figuras de mérito foram utilizadas as amostras controles de qualidade preparadas em quintuplicata, em três diferentes concentrações (baixa, média e alta), em relação às concentrações da curva de calibração: $36,0\mu\text{g.L}^{-1}$ (baixa), $600\mu\text{g.L}^{-1}$ (média) e $1000\mu\text{g.L}^{-1}$ (alta) da mistura racêmica de omeprazol.

A precisão e a exatidão intradia e interdias do método foi avaliada, portanto, analisando-se as quintuplicatas dos três controles de qualidade em um mesmo dia e em dias não consecutivos. A precisão foi expressa pelo coeficiente de variação (CV%) e a exatidão foi calculada através da interpolação dos resultados na equação da reta obtida na curva de calibração e expressa como porcentagem de desvio entre as quantidades adicionadas e as quantificadas, nas três concentrações avaliadas (Tabela 4.5).

TABELA 4.6 – Precisão (CV%) e exatidão interdias e intradia do método desenvolvido.

Analito ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	1º dia (n= 5)		2º dia (n= 5)		3º dia (n= 5)		3 dias (média) (n= 15)	
	Exatidão	CV	Exatidão	CV	Exatidão	CV	Exatidão	CV
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
(+)-omeprazol								
18,0	100	6,45	103	2,80	104	13,8	102	7,68
300	110	1,34	111	1,30	100	10,5	107	4,38
500	99,2	1,64	95,7	3,42	112	1,82	102	2,29
(-)-omeprazol								
18,0	105	3,05	104	1,70	103	5,21	104	3,32
300	106	1,25	105	1,30	98,5	4,29	103	2,28
500	96,9	1,29	90,2	2,00	111	1,31	99,4	1,53

A precisão das replicatas dos enantiômeros apresentou coeficientes de variação entre 1,25 - 13,8%, e os valores de exatidão variaram entre 90,2 - 112%. Portanto, todos os valores estão de acordo com os critérios de aceitação do método, ou seja, variabilidades menores ou iguais a 15%.¹¹³

4.3.1.4 – Eficiência de extração

Os percentuais de eficiência de extração, ou recuperação, dos enantiômeros do omeprazol foram calculados através da razão entre o valor médio das áreas encontradas nas amostras preparadas em água do ponto 1(A) (n = 5) com os resultados das amostras preparadas em água Milli-Q (n = 5). Os resultados encontram-se na Tabela 4.6.

TABELA 4.7 – Eficiência de extração obtida para as amostras controle de qualidade do omeprazol.

Analito ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Recuperação (%)	Analito ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Recuperação (%)
(+) -omeprazol		(-) -omeprazol	
18,0	94,5	18,0	98,8
300	98,8	300	99,5
500	96,2	500	101

Os resultados mostram que a eficiência de extração do método foi precisa e exata, para ambos os enantiômeros nas diferentes concentrações. Logo, a coluna RAM foi eficiente na extração dos analitos da matriz e na transferência deles para a coluna quiral.

4.3.1.5 – Limites de quantificação e detecção

O limite de quantificação (LQ) de cada enantiômero foi determinado por meio de análises da matriz fortificada com concentrações decrescentes dos analitos até que os valores de precisão e exatidão das amostras extraídas ($n=3$) estivessem no intervalo de 15-20% de variabilidade.

O limite de detecção (LD) para cada enantiômero foi determinado pela relação sinal ruído, onde o sinal do analito deve ser três vezes maior que o sinal do ruído do detector.

Os valores de LQ e LD encontram-se na Tabela 4.7.

TABELA 4.8 – Valores de LQ e LD para cada enantiômero do fármaco omeprazol no método validado.

Analito	LQ ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	LD ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
(+) -omeprazol	15,0	5,00
(-) -omeprazol	15,0	5,00

4.3.1.6 – Estabilidade das amostras

Para avaliar a estabilidade de curta duração foram preparadas amostras de controle de qualidade ($n = 5$) em água do ponto 1(A) e estas analisadas imediatamente, tempo zero. As mesmas amostras foram deixadas no auto-injetor e analisadas após 24, 48 e 72 horas. Os resultados encontram-se na Tabela 4.8 e como se pode observar os enantiômeros apresentaram valores de precisão e exatidão dentro dos critérios de aceitação por até 48 horas, o que os torna estáveis na matriz neste período.

TABELA 4.9 – Resultados do estudo de estabilidade em auto-injetor para o omeprazol em água do ponto 1(A).

Analito ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Tempo zero		24 horas		48 horas		72 horas	
	Exatidão	CV	Exatidão	CV	Exatidão	CV	Exatidão	CV
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
(+)-omeprazol								
18,0	100	6,45	89,4	2,56	79,6	7,20	75,6	6,23
300	110	1,34	96,2	3,40	85,5	4,12	76,7	8,14
500	99,2	1,64	101,6	1,21	84,0	3,31	80,3	2,63
(-)-omeprazol								
18,0	105	3,05	95,0	6,37	86,6	8,18	73,9	10,6
300	106	1,25	93,0	3,10	83,2	3,16	73,0	7,69
500	96,9	1,29	98,4	0,85	82,5	3,12	77,4	2,89

Além da estabilidade em auto-injetor também foi realizado o estudo de estabilidade à 4°C. As amostras de controle de qualidade preparadas ($n=5$) foram avaliadas após 7, 10, 13, 16, 19 e 21 dias. Os resultados encontram-se na Tabela 4.9 e mostram que o fármaco foi estável na matriz por até 1 semana em geladeira, mostrando valores de desvio superiores a 15% a partir das amostras armazenadas por 10 dias.

TABELA 4.10 – Alguns resultados do estudo de estabilidade à 4°C para o omeprazol em água do ponto 1(A).

Analito ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	7 dias		10 dias		13 dias	
	Exatidão	CV	Exatidão	CV	Exatidão	CV
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
(+)-omeprazol						
18,0	98,7	4,37	30,6	16,48	34,5	29,3
300	97,0	3,10	70,6	3,39	58,7	1,15
500	98,4	1,71	72,0	3,10	55,5	6,75
(-)-omeprazol						
18,0	97,1	4,82	40,7	23,85	53,7	12,1
300	93,5	3,21	66,7	3,21	55,9	2,37
500	95,7	1,37	67,6	3,17	52,3	6,85

4.3.2 – Aplicação do método

Como descrito anteriormente o método foi aplicado em amostras coletadas nos pontos ilustrados nos mapas das Figuras 3.1 e 3.2. As curvas de calibração para cada enantiômero apresentaram valores do coeficiente de correlação linear, r , superiores a 0,99 e as precisões e exatidões variações de até 15% como estabelecido no guia de validação seguido. Assim sendo, o método permaneceu linear, preciso e exato dentro do limite de quantificação. A Figura 4.24 exemplifica a boa resolução obtida durante a aplicação do método com o cromatograma do CQM.

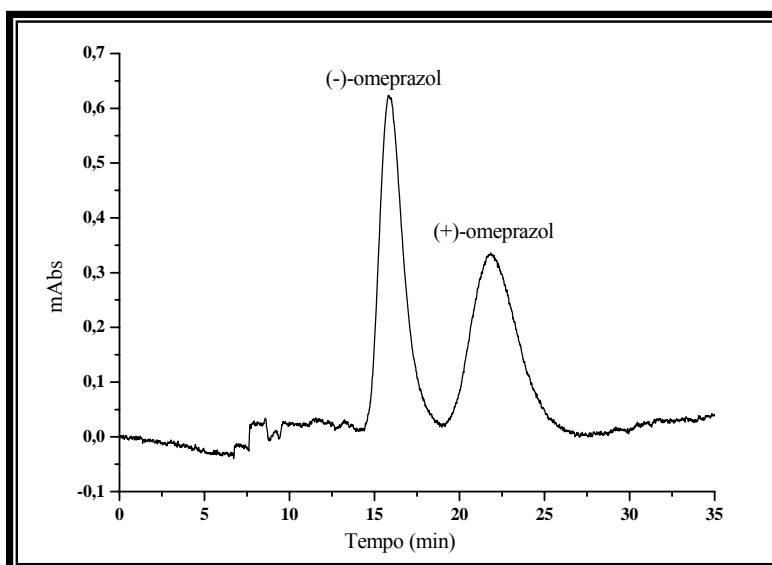


FIGURA 4.24 – Cromatograma referente à amostra de CQM. Condições cromatográficas de acordo com a Tabela 4.4.

Dentre todas as amostras injetadas, apenas na do ponto S6 do Rio Douro foi encontrado os enantiômeros do omeprazol (Figura 4.25). Entretanto, os valores das áreas encontravam-se abaixo do limite de quantificação do método.

Assim sendo, através de um método desenvolvido por injeção direta de 500 μ L de amostra, sem pré-concentração, com tratamento *on-line* e detecção por UV-vis, foi possível detectar os enantiômeros do omeprazol na amostra coletada, mesmo estando abaixo do limite de quantificação alcançado. Portanto, o método é válido para a quantificação dos enantiômeros do fármaco em matrizes ambientais aquosas, mostrando não ser necessário limites de quantificação tão baixos quanto os obtidos nos trabalhos reportados na literatura.

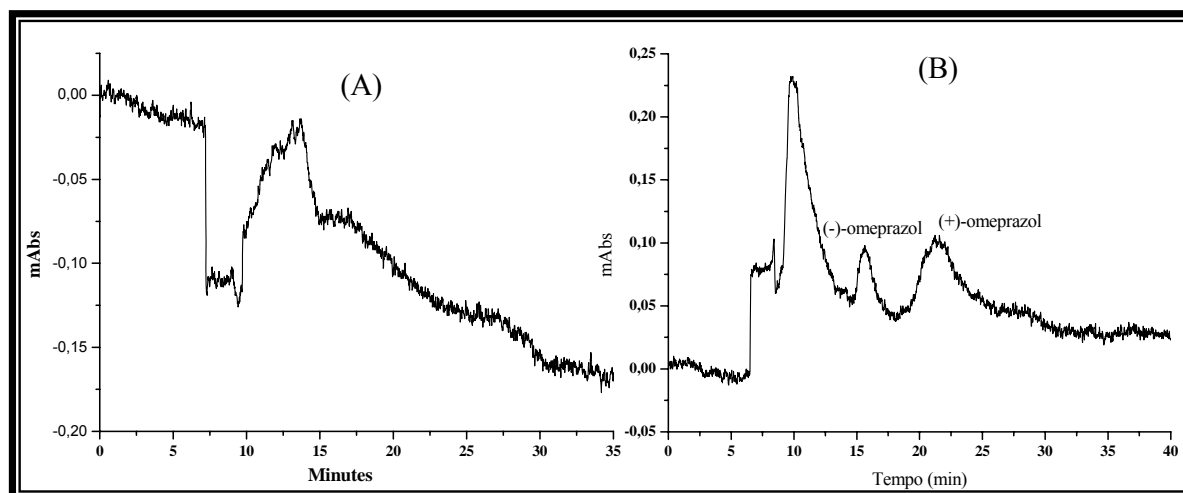


FIGURA 4.25 – Cromatogramas referentes (A) à amostra de água do ponto 1(A) – branco e, (B) à amostra de água do rio Douro coletada no ponto S6 (mapa da Figura 3.2). Condições cromatográficas de acordo com a Tabela 4.4.

Tendo demonstrado que o uso da injeção direta de amostras de água na coluna RAM-BSA acoplada a uma coluna quiral de polissacarídeo foi eficiente para a determinação dos enantiômeros do omeprazol, as condições para a quantificação simultânea dos enantiômeros do lansoprazol e pantoprazol foram investigadas.

4.4 - Desenvolvimento e validação do método enantiosseletivo LC-LC/UV-vis para os fármacos lansoprazol e pantoprazol

Como demonstrado na sessão 4.4.1, Figura 4.17 (B), a coluna tris-(3,5-dimetoxifenilcarbamato) de amilose em APS-Nucleosil (CSP-2) apresenta uma boa discriminação quiral para os fármacos lansoprazol e pantoprazol, separando os quatro enantiômeros simultaneamente.

Como a matriz de trabalho e o volume de injeção deste método são os mesmos do método validado para o omeprazol, as condições de extração das macromoléculas da matriz pela coluna RAM-BSA C₈ não se alteraram. Assim, a

extração dos enantiômeros, do lansoprazol e pantoprazol, da coluna RAM foi o único parâmetro a ser ajustado. Com o sistema cromatográfico configurado no modo desacoplado (Figura 4.18-Posição 1), foram determinadas as condições cromatográficas do método na coluna RAM, Tabela 4.10.

TABELA 4.11 – Condições cromatográficas utilizadas para a exclusão das macromoléculas e eluição dos fármacos lansoprazol e pantoprazol na coluna RAM-BSA C₈ selecionada para este estudo.

Linha da Bomba	Tempo (min)	Evento/ Posição da válvula
A	0,00-3,00	Exclusão das macromoléculas pela coluna RAM-BSA / 1
B	3,01-9,60	Eluição dos analitos retidos na coluna RAM-BSA / 1
C	9,61-15,0	Limpeza da coluna RAM-BSA / 1
A	15,01-20,0	Condicionamento da coluna RAM-BSA / 1

Linha A: água Milli-Q; linha B: ACN:H₂O (35:65); linha C: ACN:H₂O (80:20); vazão de 1,0 mL.min⁻¹; $\lambda_{\text{máx}}$ = 285nm.

O cromatograma da Figura 4.26 ilustra a eficiente retenção do analito na coluna RAM-BSA C₈, sendo esta superior ao tempo necessário para a exclusão das macromoléculas, o que possibilita o acoplamento com a coluna quiral CSP-2.

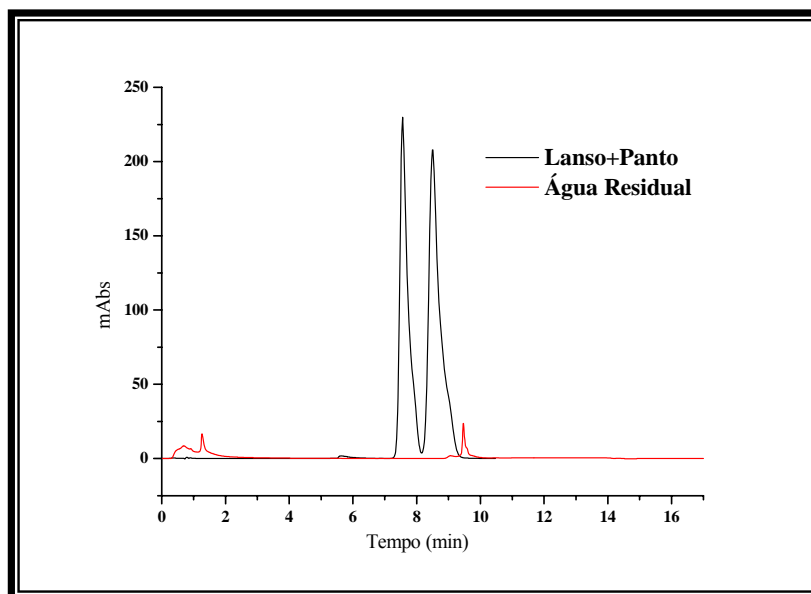


FIGURA 4.26 – Cromatograma de água do ponto 1(B) fortificada com lansoprazol e pantoprazol na concentração de $50\mu\text{g.mL}^{-1}$ cada, na coluna RAM-BSA C_8 (5,0 x 0,46 cm d.i.). Condições cromatográficas de acordo com a Tabela 4.10.

Assim, a coluna quiral CSP-2 foi acoplada à coluna RAM-BSA C_8 utilizando o sistema cromatográfico configurado para o modo multidimensional (Figura 4.18). As condições cromatográficas utilizadas encontram-se na Tabela 4.11 e o cromatograma da separação analítica na Figura 4.27.

TABELA 4.12 – Condições cromatográficas utilizadas no método LC-LC/UV-vis desenvolvido para a análise simultânea dos fármacos lansoprazol e pantoprazol

Bomba / Linha	Tempo (min)	Evento / Posição da válvula
Bomba 1 / A	0,00-3,00	Exclusão das macromoléculas pela coluna RAM-BSA / 1
Bomba 1 / B	3,01-9,60	Eluição dos analitos retidos na coluna RAM-BSA / 1
Bomba 1 / B	7,20-9,60	Transferência dos analitos da coluna RAM-BSA para a coluna CSP-2 / 2
Bomba 2	7,20-9,60	Fase móvel descartada / 2
Bomba 1 / C	9,61-15,0	Limpeza da coluna RAM-BSA / 1
Bomba 1 / A	15,01-20,0	Condicionamento da coluna RAM-BSA / 1
Bomba 2	0,00-7,20	Condicionamento da coluna CSP-2 / 1
Bomba 2	9,61-40,0	Separação dos enantiômeros na coluna CSP-2 / 1

Bomba 1: linha A - água Milli-Q; linha B - ACN:H₂O (35:65); linha C - ACN:H₂O (80:20); vazão de 1,0 mL.min⁻¹. Bomba 2: ACN:H₂O (35:65); vazão de 1,0 mL.min⁻¹; $\lambda_{\text{máx}} = 285\text{nm}$.

A Figura 4.27 mostra uma alta enantiorresolução e enantiosseletividade, na separação dos fármacos, portanto esta foi a condição adotada para o método e as figuras de mérito foram investigadas.

A ordem de eluição de cada enantiômero foi investigada usando um detector de dicroísmo circular acoplado ao detector de UV-vis, Figura 4.28.

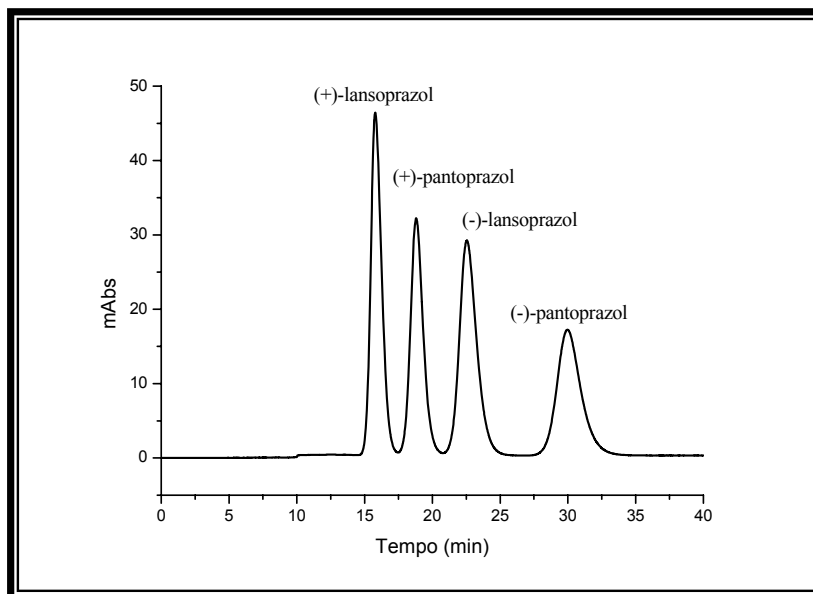


FIGURA 4.27 – Cromatograma da separação dos enantiômeros dos fármacos lansoprazol e pantoprazol, na coluna CSP-2. Condições cromatográficas de acordo com a Tabela 4.11.

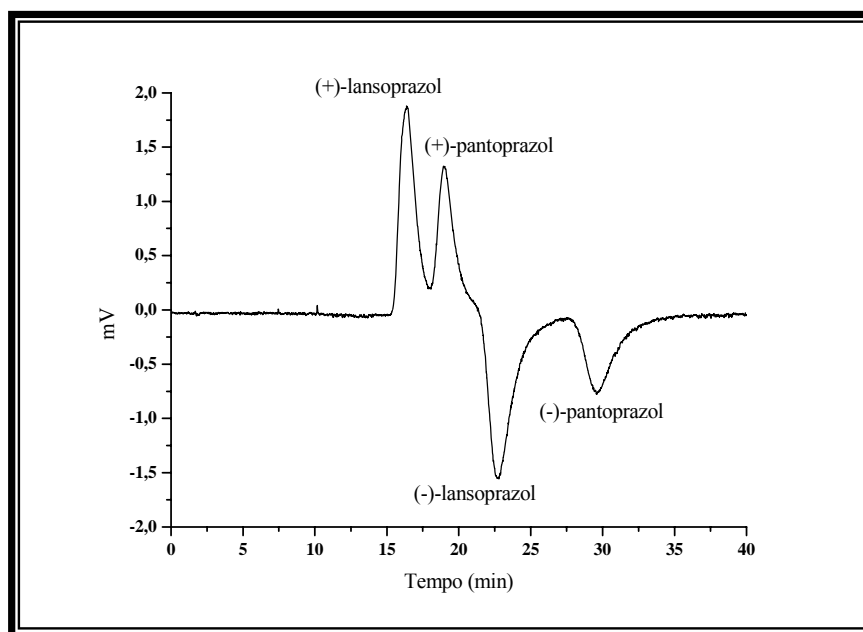


FIGURA 4.28 – Cromatograma da separação dos enantiômeros do lansoprazol e pantoprazol ($200\mu\text{g.mL}^{-1}$). Condições cromatográficas de acordo com a Tabela 4.11.

4.4.1 – Seletividade

Comparando-se as análises de amostra de água do ponto 1(B) (matriz) livre dos analitos (n=3), com amostras da matriz fortificadas com os fármacos (n=3), observou-se a ausência de interferentes co-eluído com as bandas cromatográficas de cada enantiômero, demonstrando assim, a seletividade do método. Os cromatogramas das análises encontram-se na Figura 4.28.

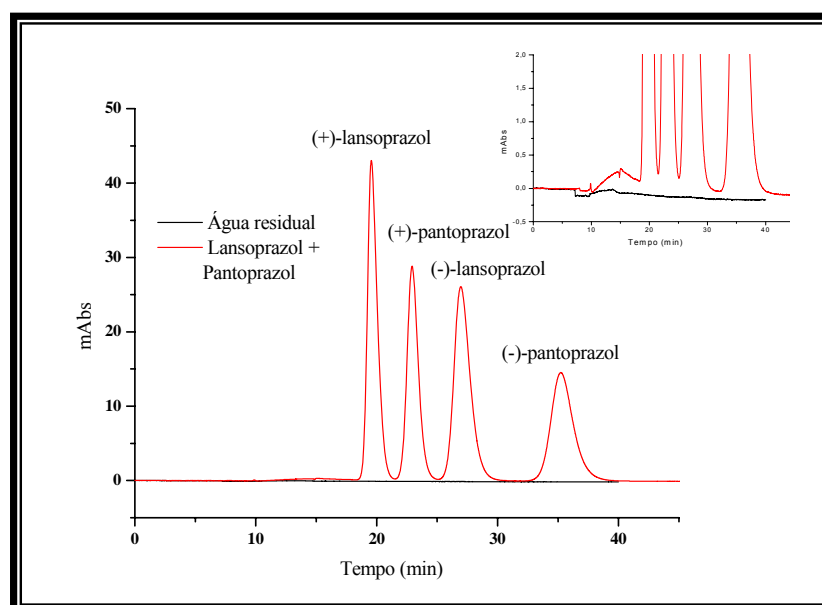


FIGURA 4.29 – Sobreposição do cromatograma da separação dos enantiômeros do lansoprazol e pantoprazol em água do ponto 1(B) fortificada, com o cromatograma da água do ponto 1(B) sem a presença dos analitos. Condições cromatográficas de acordo com a Tabela 4.11.

4.4.2 – Linearidade

Trabalhos envolvendo o desenvolvimento e validação de métodos para a quantificação de lansoprazol e pantoprazol em águas residuais, efluentes de estações de tratamento de esgoto ou águas naturais, não reportam valores detectados dos fármacos ao aplicar-se o método.^{4,122} Assim, buscou-se limites

menores possíveis, através da injeção direta de 500 μ L de água do ponto 1(B) e detecção por UV-vis dos enantiômeros dos fármacos.

As curvas de calibração para o (+)-lansoprazol e (-)-lansoprazol foram plotadas em função das áreas das bandas cromatográficas relativas às seguintes concentrações: 10,0; 15,0; 20,0; 40,0; 80,0; 160 e 320 μ g.L⁻¹. E para o (+)-pantoprazol e (-)-pantoprazol as concentrações foram: 20,0; 30,0; 40,0; 80,0; 160; 320 e 640 μ g.L⁻¹. As amostras foram preparadas em água do ponto 1(B), em triplicata, e foram injetados 500 μ L. As curvas analíticas foram obtidas através de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e estão apresentadas nas Figuras 4.30 e 4.31.

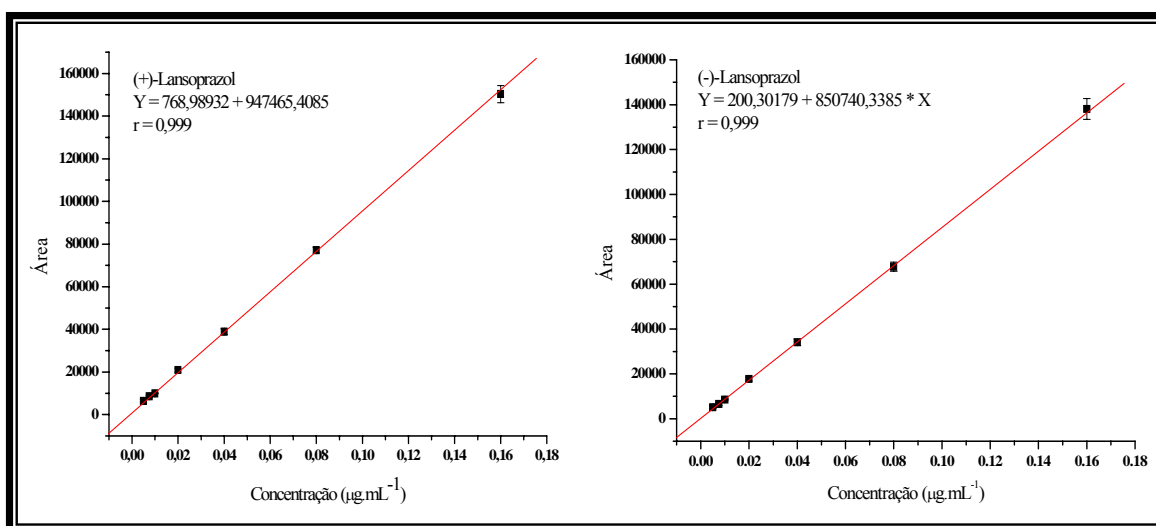


FIGURA 4.30 – Curvas analíticas para o (+)-lansoprazol e (-)-lansoprazol.

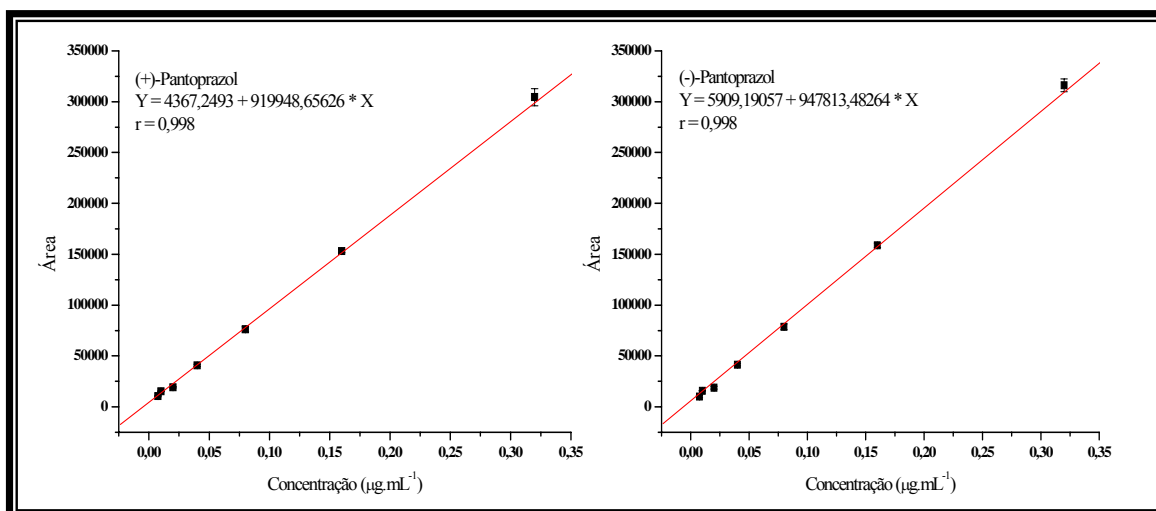


FIGURA 4.31 – Curvas analíticas para o (+)- pantoprazol e (-)- pantoprazol.

As curvas analíticas foram lineares na faixa de $5,00 - 160\mu\text{g.L}^{-1}$ para os enantiômeros do lansoprazol e de $7,50 - 320\mu\text{g.L}^{-1}$ para os enantiômeros do pantoprazol. Todos os valores obtidos encontram-se dentro dos critérios de aceitação do guia adotado para a validação do método ¹¹³, com valores de coeficientes de correlação linear (r) acima de 0,99 e precisão (CV%) e exatidão das triplicatas com desvios inferiores a 15%, exceto para o limite de quantificação, onde o desvio encontrado foi de 15-20%.

4.4.3 – Precisão e Exatidão

Para avaliar a precisão e exatidão do método foram utilizadas as amostras controles de qualidade preparadas em quintuplicata, nas seguintes concentrações da mistura racêmica do lansoprazol e pantoprazol, respectivamente: $9,00$ e $18,0\mu\text{g.L}^{-1}$ (CQB); $75,0$ e $150\mu\text{g.L}^{-1}$ (CQM); 125 e $250\mu\text{g.L}^{-1}$ (CQA).

A precisão e a exatidão intradia e interdias do método foi avaliada analisando as quintuplicatas dos três controles de qualidade em um mesmo dia e em dias não consecutivos (Tabela 4.12).

TABELA 4.13 – Precisão (CV%) e exatidão interdias e intradia do método desenvolvido.

Analito ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	1º dia (n= 5)		2º dia (n= 5)		3º dia (n= 5)		3 dias (média) (n= 15)	
	Exatidão	CV	Exatidão	CV	Exatidão	CV	Exatidão	CV
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
(+)-Lansoprazol								
9,00	92,8	8,97	96,4	3,78	99,0	3,97	96,0	5,57
75,0	104	2,89	101	3,44	108	2,70	104	3,01
125	105	2,45	104	2,50	109	4,24	106	3,06
(-)-Lansoprazol								
9,00	98,3	9,94	98,0	5,82	104	6,08	100	7,28
75,0	107	3,29	102	3,92	112	3,61	107	3,61
125	106	2,71	100	2,83	105	5,56	104	3,70
(+)-Pantoprazol								
18,0	89,6	3,81	87,7	3,81	93,1	4,95	90,1	4,19
150	99,8	1,26	95,3	1,79	108	3,70	101	2,25
250	102	1,26	98,5	1,80	107	2,68	102	1,91
(-)-Pantoprazol								
18,0	94,8	8,05	86,7	5,67	89,0	1,59	90,2	5,10
150	100	0,86	95,2	1,97	107	3,67	101	2,17
250	101	0,83	97,2	1,61	107	2,14	102	1,53

Considerando-se os valores encontrados para ambos os enantiômeros de cada fármaco, nas diferentes concentrações, a precisão das replicatas apresentou coeficientes de variação entre 0,83 – 9,94%, e os valores de exatidão variaram entre 86,7 – 112%. Portanto, todos os valores estão de acordo com os critérios de aceitação do método, ou seja, variabilidades menores ou iguais a 15%.¹¹³

4.4.4 – Eficiência de extração

Os percentuais de eficiência de extração, ou recuperação, dos enantiômeros do lansoprazol e pantoprazol foram calculados através da razão entre o valor médio das áreas encontradas nas amostras preparadas em água do ponto 1(B) (n = 5) com os resultados das amostras preparadas em água Milli-Q (n = 5). Os resultados encontram-se na Tabela 4.13.

TABELA 4.14 – Eficiência de extração obtida para as amostras controle de qualidade dos fármacos.

Analito ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Recuperação (%)	Analito ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Recuperação (%)
(+)-lansoprazol		(-)-lansoprazol	
9,00	110	9,00	113
75,0	103	75,0	107
125	99,1	125	102
(+)-pantoprazol		(-)-pantoprazol	
18,0	106	18,0	112
150	99,4	150	101
250	103	250	101

Os resultados mostram que a coluna RAM foi eficiente na extração dos analitos da água do ponto 1(B) e na transferência destes para a coluna quirál, com valores de precisão e exatidão com desvios de até 15%.¹¹³

4.4.5 – Limites de quantificação e detecção

O critério de aceitação para o limite de quantificação foi que a precisão e a exatidão de três amostras da matriz fortificada não ultrapassassem o valor de 20% de variabilidade, enquanto que o limite de detecção foi calculado visualmente, obtendo-se um sinal três vezes maior que o ruído do detector.

Os valores de limite de quantificação obtidos foram de $5,00\mu\text{g.L}^{-1}$ para ambos os enantiômeros do lansoprazol e de $7,50\mu\text{g.L}^{-1}$ para os enantiômeros do pantoprazol, e os valores de limite de detecção de $1,00\mu\text{g.L}^{-1}$ e $2,50\mu\text{g.L}^{-1}$ para cada enantiômero do lansoprazol e pantoprazol, respectivamente.

4.4.6 – Estabilidade das amostras

Para avaliar a estabilidade em auto-injetor, foram preparadas amostras de controle de qualidade ($n=5$) em água do ponto 1(B) e estas foram analisadas imediatamente (tempo zero) e após 24 e 48 horas. Os resultados encontram-se na Tabela 4.14 e como se pode observar os enantiômeros dos fármacos já não apresentavam valores aceitáveis (de acordo com o guia de validação adotado ¹¹³) de precisão e exatidão nas amostras de 24 horas, o que mostra a instabilidade dos compostos na matriz se comparado ao omeprazol, fármaco da mesma classe que permaneceu estável por até 48 horas.

TABELA 4.15 – Resultados do estudo de estabilidade em auto-injetor para o lansoprazol e pantoprazol em água do ponto 1(B).

Analito ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Tempo zero		24 horas		48 horas	
	Exatidão	CV	Exatidão	CV	Exatidão	CV
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
(+)-lansoprazol						
9,00	90,7	7,93	119	3,58	60,3	6,33
75,0	103	1,89	70,2	2,60	39,0	5,30
125	102	1,32	78,5	2,00	28,4	11,8
(-)-lansoprazol						
9,00	94,8	9,32	120	3,05	43,6	4,87
75,0	105	2,29	69,7	3,23	37,8	3,68
125	98,2	1,84	73,5	2,90	39,0	3,56
(+)-pantoprazol						
18,0	100	6,50	63,0	3,59	54,0	2,60
150	108	1,24	72,6	2,80	49,2	1,25
250	99,5	1,64	64,4	1,42	45,0	1,82
(-)-pantoprazol						
18,0	95,8	8,05	62,5	4,00	45,6	5,25
150	110	0,96	77,7	2,56	58,2	2,36
250	101	1,83	61,7	1,89	44,6	1,59

4.4.7 – Aplicação do método

O método validado foi aplicado como descrito no item 3.12. As curvas de calibração para cada enantiômero apresentaram valores de coeficiente de correlação linear, r , superiores a 0,99 e as precisões e exatidões variações de até 15%.

As amostras coletadas dos pontos do mapa da Figura 3.1 não apresentaram os enantiômeros dos fármacos lansoprazol e pantoprazol.

Acredita-se que a ausência seja devido à elevada instabilidade observada ao serem realizados os testes de estabilidade.

A estabilidade dos fármacos lansoprazol e omeprazol foi avaliada em água MilliQ por DellaGreca *et al*¹²³ em estudos de hidrólise em diferentes pHs e fotodegradação por irradiação de luz solar simulada. Os experimentos realizados em diferentes pHs indicaram que a degradação foi acelerada em condições ácidas e os fármacos permaneceram estáveis em pH 7,00 ou 9,00. Os produtos de degradação foram identificados por RMN e encontram-se ilustrados na Figura 4.32. Nota-se que a degradação também foi acelerada pela irradiação de luz solar simulada, onde após 72 horas, uma solução de lansoprazol em água Milli-Q continha apenas 24% do fármaco inalterado e o omeprazol com 43 horas de irradiação foi completamente degradado. Os compostos de degradação por irradiação para o lansoprazol e omeprazol encontram-se ilustrados nas Figuras 4.33 e 4.34, respectivamente.

O trabalho reporta ainda, que a luz solar induz significativamente a degradação do fármaco lansoprazol¹²³, o que justifica a dificuldade em encontrá-lo nas amostras coletadas.

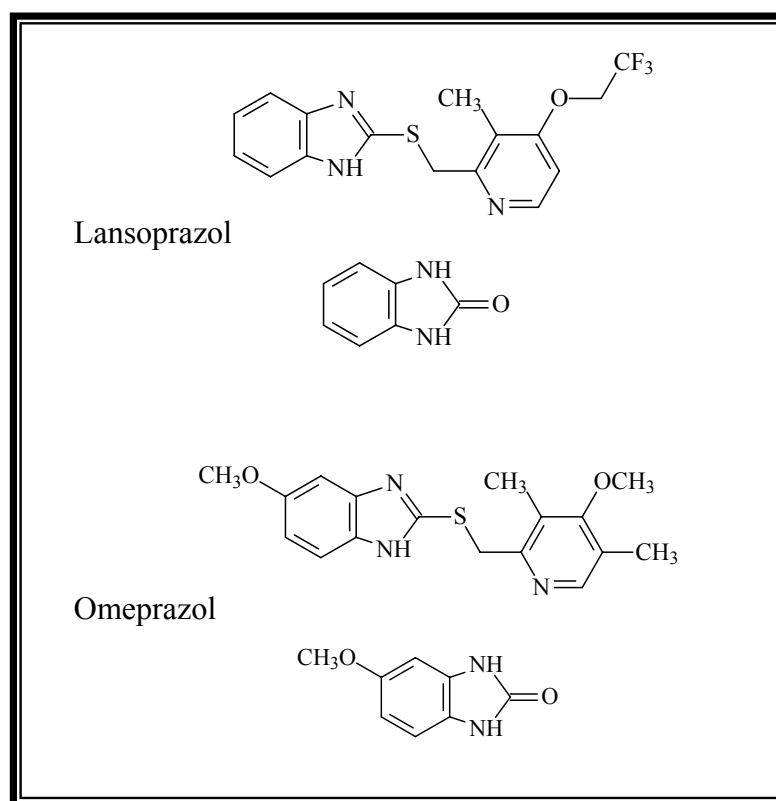


FIGURA 4.32 – Compostos de degradação para os fármacos lansoprazol e omeprazol em diferentes pHs.¹²³

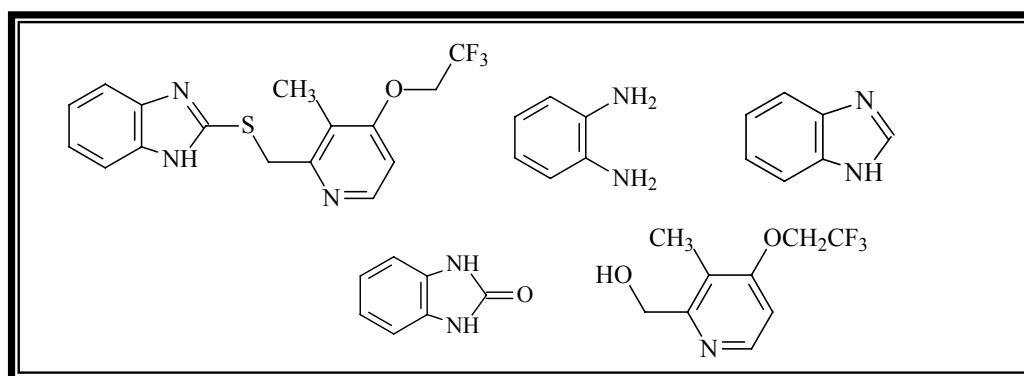


FIGURA 4.33 – Compostos de degradação por irradiação para o fármaco lansoprazol.¹²³

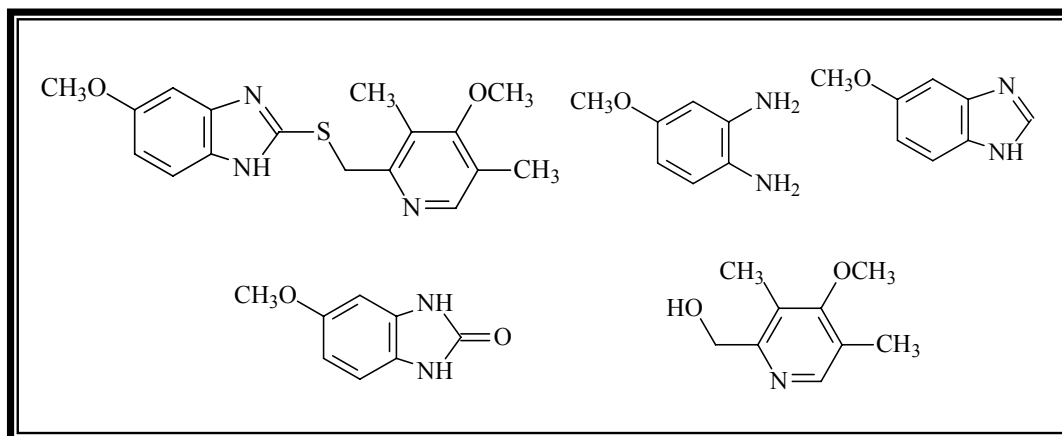


FIGURA 4.34 – Compostos de degradação por irradiação para o fármaco omeprazol.¹²³

Baseado no exposto e com objetivo de diminuir os limites de quantificação e detecção do método, foi considerada a substituição da espectroscopia na região do ultravioleta-visível, como detecção, por espectrometria de massas.

4.5 - Desenvolvimento e validação do método enantiosseletivo LC-LC/ESI-MS² para os fármacos lansoprazol e pantoprazol

Uma variedade de métodos para quantificação de fármacos como resíduos em ambientes aquáticos são reportados na literatura. Os métodos usualmente fazem uso da cromatografia gasosa ou líquida e detecção por espectrometria de massas. A Tabela 4.15 apresenta exemplos de aplicações.

TABELA 4.16 – Exemplos de métodos utilizados para a determinação de fármacos no ambiente aquático.

Métodos	Fármacos/ Metabólitos	Concentração (ng/L)	Matriz	Referência
CG/MS ²	16 - α - hidroxiestrona	1,00	Efluentes das ETEs de Frankfurt/ Main, Alemanha	19
CG/MS ²	17 - α - etinilestradiol	1,00	Efluentes das ETEs de Frankfurt/ Main, Alemanha	19
CG/MS ²		9,00	Efluentes de ETEs do Canadá	
CG/MS	17 - α - etinilestradiol	56,0 – 101,9	Estuário do Rio Douro	105
CG/MS ²	17 - β - estradiol	6,00	Efluentes de ETEs do Canadá	19
LC/MS ²	Acetaminofeno	250	Rio Ebro, Espanha	122
LC/MS ²		5990	Efluente de ETE na Croácia	
LC/MS ²	Acetaminofeno	381,5	Rio Viskan (Novembro, 2006)	124
LC/MS ²		120	Rio Viskan (Março, 2005)	
LC/MS ²	Acetaminofeno	2,24	Água superficial do Rio Tennessee (rio acima)	98
LC/MS ²	Acetaminofeno	130 – 26090	Influente de ETE na Croácia	122
LC/MS ²	Ácido amidotrizóico	100	Poços em Bade-Vurtemberga	125
LC/MS ²	Ácido clofibríco	0,5 – 82	Efluentes de ETEs na Itália	121
LC/MS ²	Ácido clofibríco	110	Influente de ETE na Croácia	122
LC/MS ²		20 – 30	Efluente de ETE na Croácia	
LC/MS ²		10 – 20	Rio Ebro, Espanha	
LC/MS ²	Ácido clofibríco	0,800 – 5,77	Rios Po e Lambro, Itália	126
CG/MS	Ácido clofibríco	18,6	Rio Elbe	127
CG/MS		0,01 – 0,04	Costa inglesa e <i>German Bight</i>	
CG/MS		0,28 – 1,35	Costa da Holanda, Alemanha, Dinamarca e Noruega	
CG/MS	Ácido clofibríco	0,01 – 0,03	Efluentes de ETEs em municípios do Rio de Janeiro	18
LC/MS ²	Ácido mefenâmico	3	Rio Ebro, Espanha	122

LC/MS ²		10	Efluente de ETE na Croácia	
LC/MS ²		5	Influente de ETE na Croácia	
LC/MS ²	Ácido mefenâmico	3 – 120	Esgoto municipal de países do ocidente da Península Balcânica	4
LC/MS ²	Amoxicilina	15 – 120	Efluentes de ETEs da Itália	121
LC/MS ²	Anidroeritromicina	120	Efluentes da ETE DWRF	21
LC/MS ²		350	Influente da ETE DWRF	
LC/MS ²		40,0	Efluente da ETE MWRF	
LC/MS ²		90,0	Influente da ETE MWRF	
LC/MS ²	Anidroeritromicina	10,0 – 100	Poços em Bade-Vurtemberga	125
LC/MS ²	Atenolol	27 – 1168	Efluentes de ETEs da Itália	121
LC/MS ²	Atenolol	250	Rio Ebro, Espanha	122
LC/MS ²		1150	Efluente de ETE na Croácia	
LC/MS ²		740	Influente de ETE na Croácia	
LC/MS ²	Atenolol	3,44 – 241	Rios Po e Lambro, Itália	126
LC/MS ²	Atenolol	280	Rio Viskan (Março, 2005)	124
LC/MS ²		31,7	Rio Viskan (Novembro, 2006)	
LC/MS ²	Atenolol	42 – 7560	Esgoto municipal de países do ocidente da Península Balcânica	4
LC/MS ²	Atorvastatina	10,3	Água superficial do Rio Tennessee (rio acima)	98
LC/MS ²	Azitromicina	6 – 1140	Esgoto municipal de países do ocidente da Península Balcânica	4
LC/MS ²	Azitromicina	20	Rio Ebro, Espanha	122
LC/MS ²		50 – 210	Efluente de ETE na Croácia	
LC/MS ²		300	Influente de ETE na Croácia	
LC/MS ²	Bezafibrato	0,790 – 57,1	Rios Po e Lambro, Itália	126
LC/MS ²	Bezafibrato	0,3 – 117	Efluentes de ETEs da Itália	121
LC/MS ²	Bezafibrato	10	Rio Ebro, Espanha	122
LC/MS ²		10	Efluente de ETE na Croácia	

LC/MS ²		50	Influente de ETE na Croácia	
LC/MS ²	Bezafibrato	0,025	Efluentes de ETEs em municípios do Rio de Janeiro	18
CG/MS	Biochanina A	17,1 – 191,4	Estuário do Rio Douro	105
CG/MS	Bisfenol A	0,1 – 10,7	Estuário do Rio Douro	105
LC/MS ²	Bisfenol A	13 – 2060	Esgoto municipal de países do ocidente da Península Balcânica	4
LC/MS ²	Bisoprolol	10 – 100	Poços em Bade-Vurtemberg	125
LC/MS ²	Cafeína	2,0 – 5,4	Mar da Escócia	127
LC/MS ²	Cafeína	72	Efluentes de ETEs municipais da Alemanha	104
LC/MS ²		530	Rios e córregos da Alemanha	
LC/MS ²	Cafeína	460	Efluente da ETE <i>East Aurora, NY</i>	22
LC/MS ²		1560	Efluente da ETE <i>Holland, NY</i>	
LC/MS ²	Cafeína	23,6 – 38,8	Água superficial do Rio Tennessee (rio acima)	98
LC/MS ²		23,2 – 32,3	Água superficial do Rio Tennessee (rio abaixo)	
LC/MS ²	Carbamazepina	4,03 – 4,58	Água superficial do Rio Tennessee (rio acima)	98
LC/MS ²		4,34 – 5,62	Água superficial do Rio Tennessee (rio abaixo)	
LC/MS ²	Carbamazepina	120 – 1550	Esgoto municipal de países do ocidente da Península Balcânica	4
LC/MS ²	Carbamazepina	179 – 1318	Efluentes de ETEs da Itália	121
LC/MS ²	Carbamazepina	110	Rio Ebro, Espanha	122
LC/MS ²		630	Efluente de ETE na Croácia	
LC/MS ²		950	Influente de ETE na Croácia	
CG/MS	Carbamazepina	100	Poços em Bade-Vurtemberg	125
LC/MS ²	Cetoprofeno	50,0	Rio Viskan (Março, 2005)	124
LC/MS ²		11,1	Rio Viskan (Novembro, 2006)	
LC/MS ²	Cetoprofeno	130 – 620	Efluente de ETE na Croácia	122

LC/MS ²		160 – 970	Influentes de ETE na Croácia	
LC/MS ²	Cetoprofeno	28 – 1520	Esgoto municipal de países do ocidente da Península Balcânica	4
LC/MS ²	Ciclofosfamida	2,1 – 9,0	Efluentes de ETES da Itália	121
LC/MS ²	Ciprofloxacina	360	Efluente da ETE Holland, NY	22
LC/MS ²	Ciprofloxacina	7 – 2610	Esgoto municipal de países do ocidente da Península Balcânica	4
LC/MS ²	Ciprofloxacina	27,0 – 378	Efluentes de ETES da Itália	121
LC/MS ²	Ciprofloxacina	14,36 – 26,15	Rios Po e Lambro, Itália	126
LC/MS ²	Citalopram	15	Rio Viskan (Março, 2005)	124
LC/MS ²		4,7	Rio Viskan (Novembro, 2006)	
LC/MS ²	Claritromicina	8 – 73	Efluentes de ETES da Itália	121
LC/MS ²	Claritromicina	0,49 – 20,30	Rios Po e Lambro, Itália	126
CG/MS	Daidzeína	14,6 – 603,5	Estuário do Rio Douro	105
LC/MS ²	Dapson	10 – 100	Poços em Bade-Vurtemberg	125
LC/MS ²	Dextropropoxifeno Dextropropoxifeno	3,1	Rio Viskan (Março, 2005)	124
LC/MS ²		2,2	Rio Viskan (Novembro, 2006)	
LC/MS ²	Diazepam	0,13 – 2,13	Rios Po e Lambro, Itália	126
LC/MS ²	Diclofenaco	18	Rio Viskan (Março, 2005)	124
LC/MS ²		5,8	Rio Viskan (Novembro, 2006)	
CG/MS	Diclofenaco	6,2	Estuário de Elbe	127
CG/MS	Diclofenaco	0,01 – 0,06	Efluentes de ETES em municípios do Rio de Janeiro	18
LC/MS ²	Diclofenaco	50 – 4200	Esgoto municipal de países do ocidente da Península Balcânica	4
CG/MS	Diclofenaco	100	Poços em Bade-Vurtemberg	125
LC/MS ²	Dimetildiazepam	1 – 62	Efluentes de ETES da Itália	121
LC/MS ²	Enalapril	0,05 – 0,54	Rios Po e Lambro, Itália	126
LC/MS ²	Enrofloxacina	2 – 18	Esgoto municipal de países do ocidente da Península Balcânica	4

LC/MS ²	Enrofloxacina	100	Efluente da ETE Holland, NY	22
LC/MS ²	Eritromicina	1,40 – 15,9	Rios Po e Lambro, Itália	126
LC/MS ²	Eritromicina	12	Rio Viskan (Março, 2005)	124
LC/MS ²		4,2	Rio Viskan (Novembro, 2006)	
LC/MS ²	Eritromicina	24 – 420	Esgoto municipal de países do ocidente da Península Balcânica	4
LC/MS ²	Eritromicina	9 – 353	Efluentes de ETES da Itália	121
LC/MS ²	Eritromicina	30	Rio Ebro, Espanha	122
LC/MS ²	Eritromicina	10 – 100	Poços em Bade-Vurtemberga	125
CG/MS	Estrona	0,009	Efluentes de ETES de <i>Frankfurt</i> , Alemanha	19
CG/MS		0,003	Efluentes de ETES no Canadá	
CG/MS	Estrona	99,8 – 112,9	Estuário do Rio Douro	105
LC/MS ²	Estrona	30 – 48	Efluentes de ETES da Itália	121
LC/MS ²	Famotidina	12 – 120	Esgoto municipal de países do ocidente da Península Balcânica	4
LC/MS ²	Fenazona	10 – 100	Poços em Bade-Vurtemberga	125
LC/MS ²	Furosemida	26 – 2102	Efluentes de ETES da Itália	121
LC/MS ²	Furosemida	1,72 – 254,7	Rios Po e Lambro, Itália	126
LC/MS ²	Furosemida	200	Rio Viskan (Março, 2005)	124
LC/MS ²		61,5	Rio Viskan (Novembro, 2006)	
LC/MS ²	Genfibrosil	60	Rio Ebro, Espanha	122
LC/MS ²		320	Efluente de ETE na Croácia	
LC/MS ²		360	Influente de ETE na Croácia	
LC/MS ²	Genfibrosil	3 – 1700	Esgoto municipal de países do ocidente da Península Balcânica	4
CG/MS	Genisteína	72,4 – 197,4	Estuário do Rio Douro	105
LC/MS ²	Hidroclorotiazida	60 – 1253	Efluentes de ETES da Itália	121
LC/MS ²	Hidroclorotiazida	0,53 – 255,8	Rios Po e Lambro, Itália	126
LC/MS ²	Hidroclorotiazida	50	Rio Viskan (Março, 2005)	124
LC/MS ²		16	Rio Viskan (Novembro, 2006)	

CG/MS	Ibuprofeno	0,60	Estuário de Elbe	127
LC/MS ²	Ibuprofeno	150	Rio Ebro, Espanha	122
LC/MS ²		40 – 800	Efluente de ETE na Croácia	
LC/MS ²		900	Influente de ETE na Croácia	
LC/MS ²	Ibuprofeno	12 – 1190	Esgoto municipal de países do ocidente da Península Balcânica	4
LC/MS ²	Ibuprofeno	4,46 – 78,50	Rios Po e Lambro, Itália	126
LC/MS ²	Ibuprofeno	16,4	Rio Viskan (Novembro, 2006)	124
CG/MS	Ibuprofeno	0,01	Efluentes de ETEs em municípios do Rio de Janeiro	18
LC/MS ²	Indometacina	10	Rio Ebro, Espanha	122
LC/MS ²	Indometacina	7 – 240	Esgoto municipal de países do ocidente da Península Balcânica	4
LC/MS ²	Iopamidol	100	Poços em Bade-Vurtemberg	125
LC/MS ²	Josamicina	8 – 16	Esgoto municipal de países do ocidente da Península Balcânica	4
LC/MS ²	Lincomicina	3,13 – 248,9	Rios Po e Lambro, Itália	126
LC/MS ²	Lincomicina	11 – 846	Efluentes de ETEs da Itália	121
LC/MS ²	Loratadina	20	Rio Ebro, Espanha	122
LC/MS ²	Lovastatina	18,3	Água superficial do Rio Tennessee (rio acima)	98
LC/MS ²	Metavastatina	800	Efluente de ETE na Croácia	122
LC/MS ²		1170	Influente de ETE na Croácia	
LC/MS ²	Metoprolol	10 – 100	Poços em Bade-Vurtemberg	125
LC/MS ²	Metoprolol	12 – 4680	Esgoto municipal de países do ocidente da Península Balcânica	4
LC/MS ²	Metoprolol	43	Rio Viskan (Março, 2005)	124
LC/MS ²		24,5	Rio Viskan (Novembro, 2006)	
LC/MS ²	Naproxeno	50	Rio Ebro, Espanha	122
LC/MS ²		160	Efluente de ETE na Croácia	
LC/MS ²		190	Influente de ETE na Croácia	

LC/MS ²	Naproxeno	9 – 1550	Esgoto municipal de países do ocidente da Península Balcânica	4
LC/MS ²	Naproxeno	80	Rio Viskan (Março, 2005)	124
LC/MS ²		21	Rio Viskan (Novembro, 2006)	
CG/MS	Naproxeno	0,01 – 0,05	Efluentes de ETEs em municípios do Rio de Janeiro	18
LC/MS ²	Nonilfenol	460 – 4400	Esgoto municipal de países do ocidente da Península Balcânica	4
LC/MS ²	Norfloxacina	16 – 2940	Esgoto municipal de países do ocidente da Península Balcânica	4
LC/MS ²	Octilfenol	17 – 272	Esgoto municipal de países do ocidente da Península Balcânica	4
LC/MS ²	Ofloxacina	150 – 1080	Efluentes de ETEs da Itália	121
LC/MS ²	Oleandomicina	0,07 – 2,79	Rios Po e Lambro, Itália	126
LC/MS ²	Oxazepam	28	Rio Viskan (Março, 2005)	124
LC/MS ²		6,2	Rio Viskan (Novembro, 2006)	
LC/MS ²	Oxytetraciclina	0,19 – 19,20	Rios Po e Lambro, Itália	126
LC/MS ²	Pravastatina	60 – 1170	Esgoto municipal de países do ocidente da Península Balcânica	4
LC/MS ²	Propanolol	100 – 470	Efluente de ETE na Croácia	122
LC/MS ²		80 – 290	Influente de ETE na Croácia	
LC/MS ²	Propanolol	12 – 255	Esgoto municipal de países do ocidente da Península Balcânica	4
LC/MS ²	Propifenazona	95	Efluentes de ETEs municipais da Alemanha	104
LC/MS ²		43	Rios e córregos da Alemanha	
LC/MS ²	Propifenazona	10 – 100	Poços em Bade-Vurtemberg	125
LC/MS ²	Propifenazona	7 – 461	Esgoto municipal de países do ocidente da Península Balcânica	4
LC/MS ²	Ranitidina	36 – 610	Efluentes de ETEs da Itália	121
LC/MS ²	Ranitidina	10	Rio Ebro, Espanha	122

LC/MS ²		200	Efluente de ETE na Croácia	
LC/MS ²		290	Influente de ETE na Croácia	
LC/MS ²	Ranitidina	24 – 758	Esgoto municipal de países do ocidente da Península Balcânica	4
LC/MS ²	Ranitidina	3,4	Rio Viskan (Novembro, 2006)	124
LC/MS ²		16	Rio Viskan (Março, 2005)	
LC/MS ²	Ranitidina	1,17 – 38,5	Rios Po e Lambro, Itália	126
LC/MS ²	Ronidazol	10 – 100	Poços em Bade-Vurtemberg	125
LC/MS ²	Roxitromicina	10 – 100	Poços em Bade-Vurtemberg	125
LC/MS ²	Roxitromicina	1 – 50	Esgoto municipal de países do ocidente da Península Balcânica	4
LC/MS ²	Salbutamol	1,1 – 18	Efluentes de ETES da Itália	121
LC/MS ²	Salbutamol	1,14 – 2,48	Rios Po e Lambro, Itália	126
LC/MS ²	Salbutamol	1,3	Rio Viskan (Março, 2005)	124
LC/MS ²	Sotalol	70	Rio Ebro, Espanha	122
LC/MS ²		210	Efluente de ETE na Croácia	
LC/MS ²		120 – 200	Influente de ETE na Croácia	
LC/MS ²	Sotalol	100	Poços em Bade-Vurtemberg	125
LC/MS ²	Sotalol	29 – 1080	Esgoto municipal de países do ocidente da Península Balcânica	4
LC/MS ²	Spiramicina	1,4 – 161	Efluentes de ETES da Itália	121
LC/MS ²	Spiramicina	9,79 – 74,20	Rios Po e Lambro, Itália	126
LC/MS ²	Sulfadiazina	10,0 – 100	Poços em Bade-Vurtemberg	125
LC/MS ²	Sulfadiazina	1 – 132	Esgoto municipal de países do ocidente da Península Balcânica	4
LC/MS ²	Sulfadimidina	10,0 – 100	Poços em Bade-Vurtemberg	125
LC/MS ²	Sulfametazina	19 – 1160	Esgoto municipal de países do ocidente da Península Balcânica	4
LC/MS ²	Sulfametoxazol	1300	Efluente da ETE <i>East Aurora, NY</i>	22

LC/MS ²		1300	Efluente da ETE <i>Holland, NY</i>	
LC/MS ²	Sulfametoxazol	46 – 253	Efluentes de ETEs da Itália	121
LC/MS ²	Sulfametoxazol	820	Efluente de ETE na Croácia	122
LC/MS ²		870	Influente de ETE na Croácia	
LC/MS ²	Sulfametoxazol	10 – 100	Poços em Bade-Vurtemberga	125
LC/MS ²				
LC/MS ²	Sulfametoxazol	6	Rio Viskan (Março, 2005)	124
LC/MS ²	Sulfametoxazol	5,81 – 9,51	Água superficial do Rio Tennessee (rio acima)	98
LC/MS ²		7,61 – 8,75	Água superficial do Rio Tennessee (rio abaixo)	
LC/MS ²	Sulfapiridina	4 – 931	Esgoto municipal de países do ocidente da Península Balcânica	4
LC/MS ²	Sulfatiazol	1 – 4	Esgoto municipal de países do ocidente da Península Balcânica	4
LC/MS ²	Tetraciclina	620	Efluente da ETE <i>Holland, NY</i>	22
LC/MS ²	Tilmicosina	0,43	Rios Po e Lambro, Itália	126
LC/MS ²	Tilosina	50,0	Efluente da ETE DWRf	21
LC/MS ²		180	Influente da ETE DWRf	
LC/MS ²		60,0	Influente da ETE MWRf	
LC/MS ²	Tilosina	0,29 – 2,77	Rios Po e Lambro, Itália	126
LC/MS ²	Trimetropin	120	Efluente da ETE <i>East Aurora, NY</i>	22
LC/MS ²		160	Efluente da ETE <i>Holland, NY</i>	
LC/MS ²	Trimetropin	20	Rio Ebro, Espanha	122
LC/MS ²		70 – 310	Efluente de ETE na Croácia	
LC/MS ²		4220	Influente de ETE na Croácia	
LC/MS ²	Trimetropin	35 – 2550	Esgoto municipal de países do ocidente da Península Balcânica	4
LC/MS ²	Trimetropin	8	Rio Viskan (Março, 2005)	124
LC/MS ²		2,6	Rio Viskan (Novembro, 2006)	
LC/MS ²	Trimetropin	2,41 – 7,00	Água superficial do Rio Tennessee (rio acima)	98

LC/MS ²		2,85	Água superficial do Rio Tennessee (rio abaixo)	
--------------------	--	------	--	--

Foi utilizado um espectrômetro de massas *ion-trap* Esquire 6000, com fonte de ionização do tipo *electrospray* (ESI), selecionado no modo positivo durante as análises. As condições de ionização foram otimizadas através do software do equipamento durante a injeção direta de soluções padrão dos fármacos, em metanol, na concentração de 100ng.mL⁻¹. As condições de operação da fonte foram: voltagem do capilar, 4000V; pressão de nebulização, 30psi; vazão do gás de secagem, 8,00L.min⁻¹ a uma temperatura de 325°C. Os espectros de massas foram obtidos no modo MRM (*multiple reaction monitoring mode*), onde a molécula protonada foi isolada e fragmentada para produzir o espectro de MS². Foram monitorados o íon molecular e o íon fragmento, para cada um dos enantiômeros. Para o lansoprazol o íon molecular [M+H]⁺ corresponde a $m/z=370$ e o íon fragmento, primeira transição, corresponde a [M-C₇H₅N₂]⁺ com $m/z=252$. Para o pantoprazol o íon molecular [M+H]⁺ corresponde a $m/z=384$ enquanto íon fragmento, primeira transição, corresponde a [M-C₈H₅N₂F₂O]⁺ com $m/z=200$.

De acordo com o Guia da Comunidade Européia (EC)¹²⁸ para a confirmação e identificação de fármacos, utilizando CLAE/MS-MS como técnica analítica, é necessário o monitoramento de dois ou mais íons. Neste estudo, foram monitoradas duas transições MRM (o íon molecular, como íon precursor, e o primeiro fragmento). A primeira transição de todos os íons foi utilizada para a quantificação enquanto os íons precursores poderiam ser utilizados para a confirmação do analito.

Os cromatogramas com os respectivos espectros de massas dos primeiros fragmentos de cada enantiômero encontram-se nas Figuras 4.35-40.

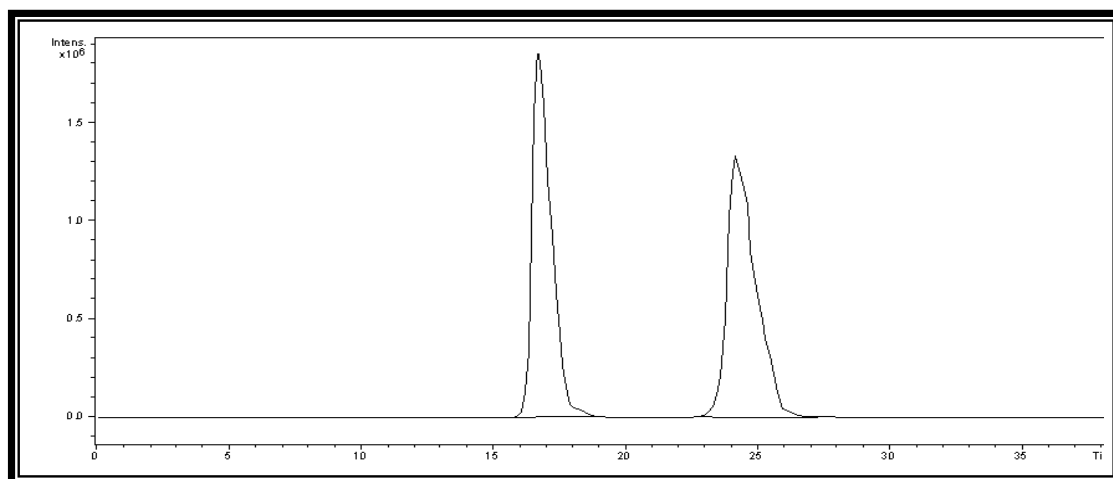


FIGURA 4.35 - Cromatograma de uma amostra de água do ponto 1(B) fortificada com lansoprazol na concentração de 100ng.mL⁻¹. Condições cromatográficas de acordo com a Tabela 4.11.

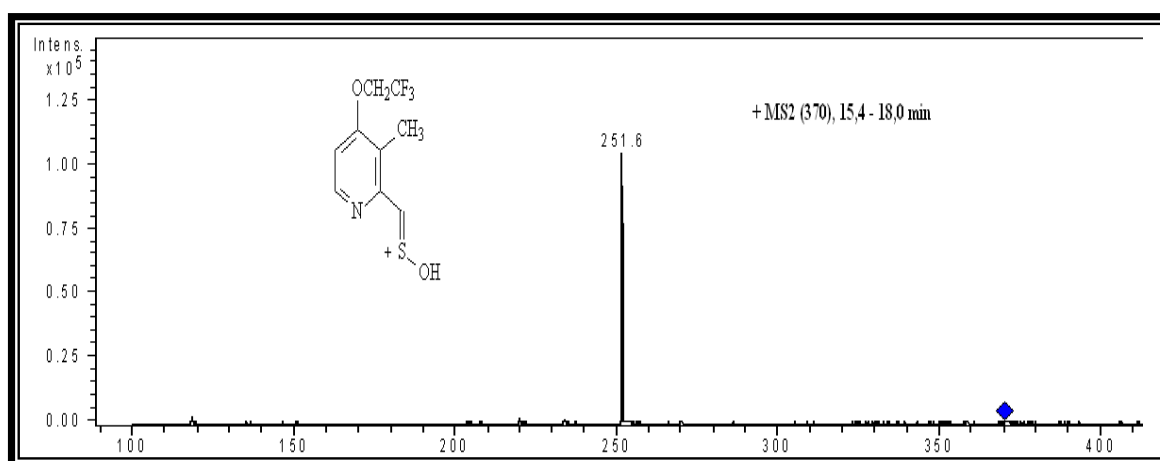


FIGURA 4.36 - Espectro de massas referente à primeira banda do cromatograma da Figura 4.35.



FIGURA 4.37 - Espectro de massas referente à segunda banda do cromatograma da Figura 4.35.

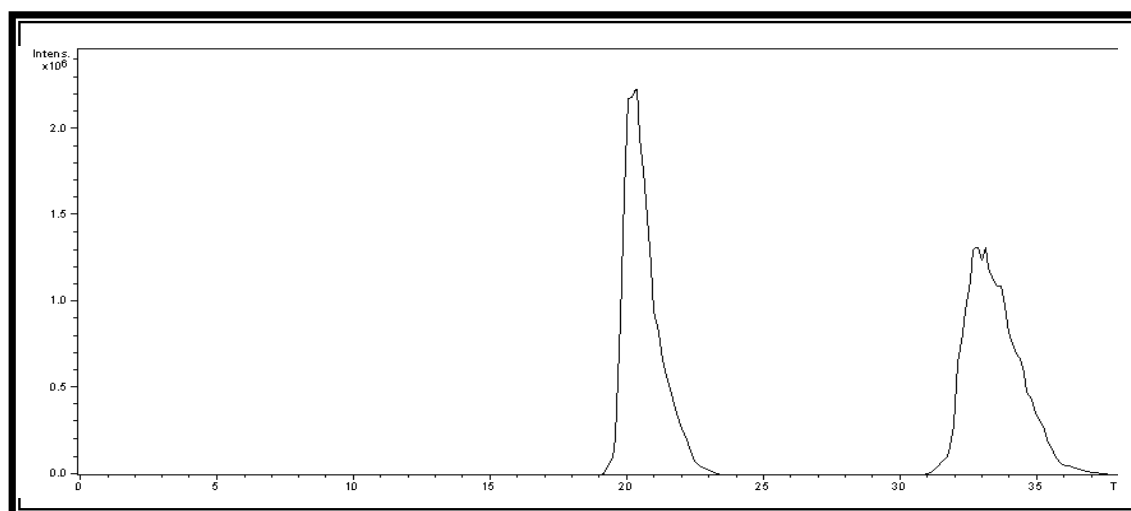


FIGURA 4.38 - Cromatograma de uma amostra de água do ponto 1(B) fortificada com pantoprazol na concentração de 100ng.mL⁻¹. Condições cromatográficas de acordo com a Tabela 4.11.

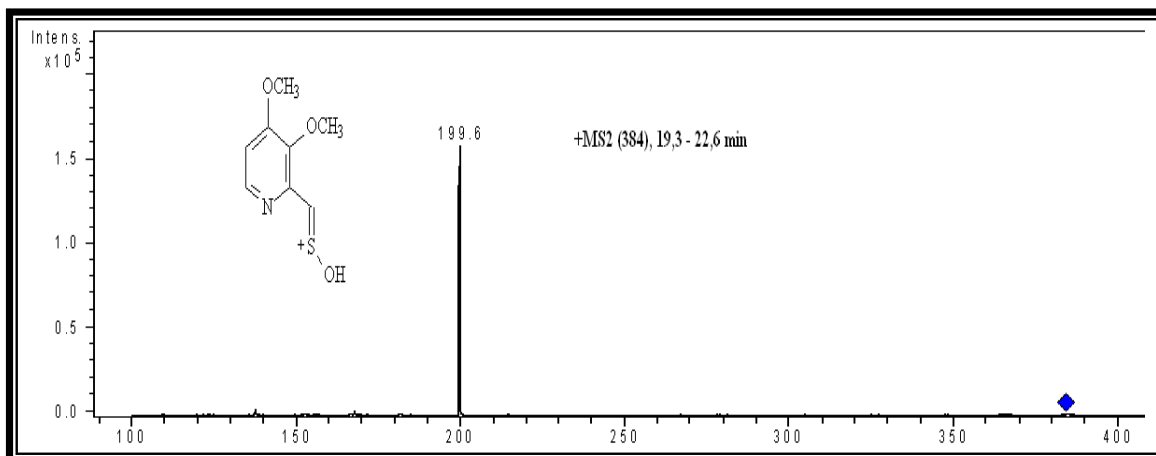


FIGURA 4.39 - Espectro de massas referente à primeira banda do cromatograma da Figura 4.38.

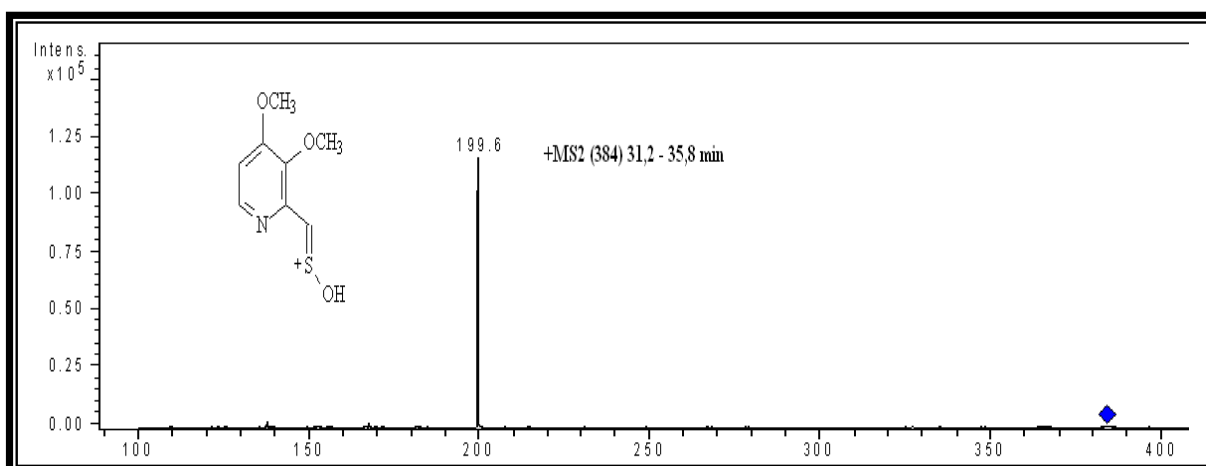


FIGURA 4.40 - Espectro de massas referente à segunda banda do cromatograma da Figura 4.38.

4.5.1 – Avaliação do efeito de matriz no LC-LC/ESI-MS²

Com os parâmetros cromatográficos para a separação dos analitos, condições de pré-tratamento da amostra e de ionização no MS estabelecidos, foi avaliada a presença de compostos interferentes provenientes da matriz, não eliminados no pré-tratamento, que podem afetar a detecção do analito, o qual é

conhecido como efeito de matriz.¹²⁹⁻¹³¹ A presença de compostos não monitorados e que coeluem com os analitos podem afetar a ionização, aumentando (enriquecendo) ou diminuindo (suprimindo) a resposta do analito.
129-131

O efeito de matriz pode ser avaliado tanto por pós-extração como por infusão pós-coluna.⁸⁴ No método pós-extração as áreas das bandas dos analitos na matriz fortificada e em solvente são comparadas, de acordo com a equação proposta por Viswanathan *et al.*¹³², na qual o efeito de matriz (FM) pode ser expresso como a razão entre a resposta do analito na presença da matriz e a resposta do analito em solvente:

$$FM = \frac{\text{Resposta do analito na presença da matriz}}{\text{Resposta do analito em solvente}}$$

Onde a resposta do analito é definida como a área, altura, razão de área ou razão da altura da banda cromatográfica.

Quando o valor de FM é igual a 1, significa que nenhum efeito de matriz é observado, FM menor que 1 sugere supressão de ionização, enquanto que FM maior do que 1 pode ser causado por um aumento na ionização. Um FM absoluto de cerca de 1 não significa que o método seja confiável. No entanto, valores de FM variáveis podem ser causados pela falta de precisão da análise. A variabilidade de FM deve apresentar coeficiente de variação menor do que 15%.

130

No método de infusão pós-coluna pode-se avaliar a influência da matriz na resposta do analito, uma vez que a matriz (sem o analito) é injetada no sistema cromatográfico e o analito é infuso após a coluna cromatográfica, e antes da fonte de ionização do espectrômetro de massas, como mostrado na Figura 4.41. Em seguida, é realizada a análise qualitativa dos resultados

comparando-se os cromatogramas injetando a matriz e o solvente nas condições cromatográficas do método.

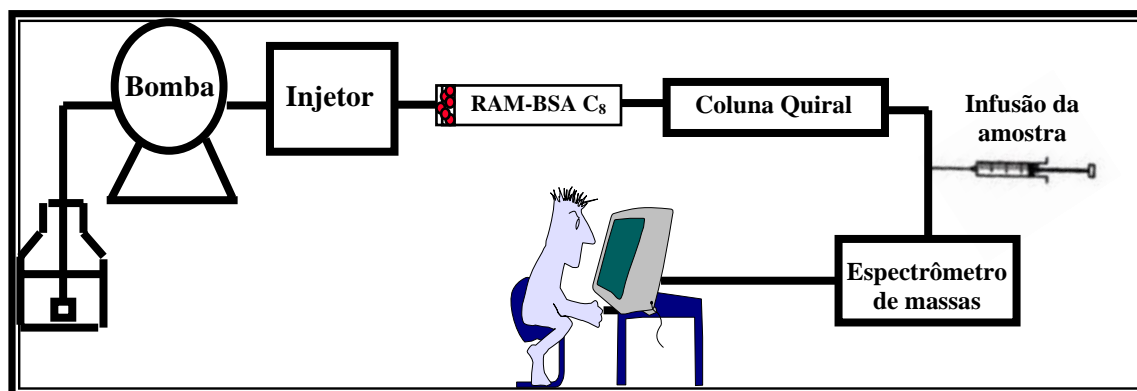


FIGURA 4.41 – Esquema do sistema de infusão pós-coluna.

No presente trabalho, o efeito matriz foi avaliado pelos dois métodos, a fim de se determinar o efeito do uso de colunas RAM no tratamento das amostras.^{98,99} Portanto, primeiramente foram preparadas amostras dos fármacos lansoprazol e pantoprazol, em triplicata, na concentração de $100\mu\text{g.L}^{-1}$ em água Milli-Q e na matriz (Ponto 1B). E, em seguida, foram realizados os estudos do efeito de matriz.

A sobreposição dos cromatogramas das Figuras 4.42 e 4.43 permitiram avaliar qualitativamente o pouco efeito de matriz sobre os analitos, com uma pequena supressão apenas no início do cromatograma.

Os resultados de fator matriz do método pós-extração encontram-se na Tabela 4.16, onde é possível confirmar um pequeno efeito de matriz, chegando a supressões de no máximo 0,32, o que corresponde a 32% para o (-)-pantoprazol.

A baixa influência do efeito de matriz na ionização dos compostos permite concluir que o método de pré-tratamento da amostra foi eficiente. Sendo assim, não foi usado um padrão interno para a validação do método.

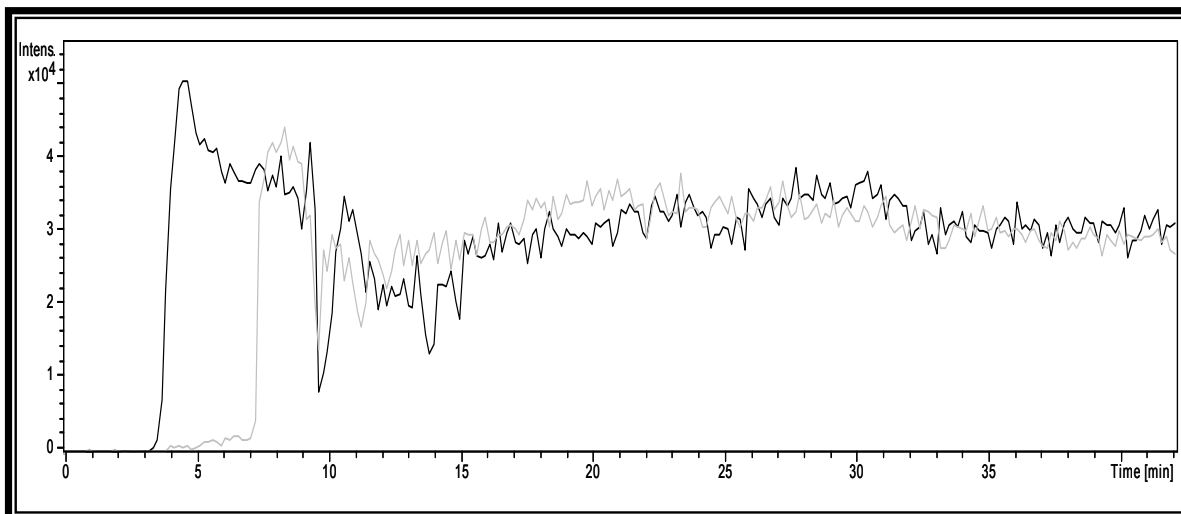


FIGURA 4.42 – Efeito de matriz por infusão pós-coluna para o lansoprazol na concentração de 100ng.mL^{-1} : (-) - água do ponto 1(B); (-) – água Milli-Q. Condições cromatográficas de acordo com a Tabela 4.11.

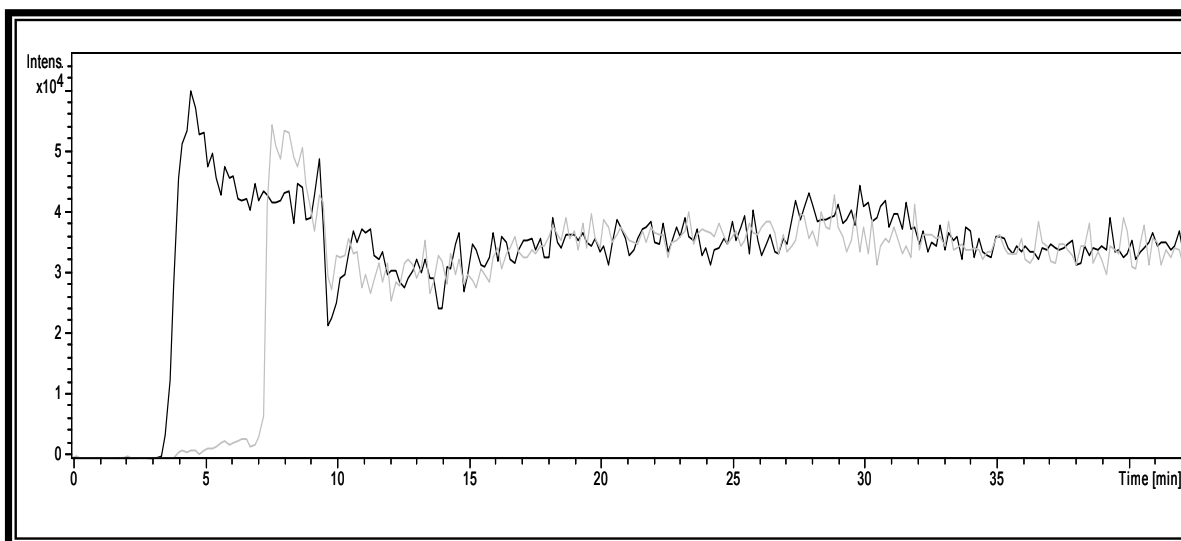


FIGURA 4.43 – Efeito de matriz por infusão pós-coluna para o pantoprazol na concentração de 100ng.mL^{-1} : (-) - água do ponto 1(B); (-) – água Milli-Q. Condições cromatográficas de acordo com a Tabela 4.11.

TABELA 4.17 – Fator Matriz calculado a partir dos resultados do método pós-extração.

Fármacos	Lansoprazol		Pantoprazol	
	(+)	(-)	(+)	(-)
Áreas (fármacos em água Milli-Q)	13097703	15781836	29314827	23458702
	13950005	16236554	32884093	28790751
	13590919	16306166	32757147	29391656
Média	13546209	16108185	31652022	27213703
Áreas (fármacos em água do Ponto 1B)	12248948	15535572	23827695	18223413
	11369649	15596714	22329538	18145115
	11914659	15636426	23396087	19073850
Média	11844419	15589570	23184440	18480792
FM	0,87	0,97	0,73	0,68

4.5.2 – Validação do método

A análise dos enantiômeros do lansoprazol e pantoprazol foi realizada utilizando-se as condições cromatográficas descritas na Tabela 4.11, que são as mesmas que foram utilizadas para o método enantiosseletivo de quantificação simultânea de lansoprazol e pantoprazol com detecção por UV-vis (método 2).

A seletividade foi avaliada através do efeito de matriz, onde não foi observada a presença de interferentes co-eluinto com os enantiômeros dos fármacos e assim prejudicando suas ionizações.

Em busca de limites de quantificação mais baixos, além do uso do espectrômetro de massas como detector, o volume de injeção foi aumentado de 500 para 1000 μ L.

As curvas de calibração para o (+)-lansoprazol e (-)-lansoprazol foram plotadas em função das áreas das bandas cromatográficas relativas às seguintes concentrações: 1,20; 2,40; 4,80; 6,40; 9,60; 19,2; 38,4 e 76,8 μ g.L⁻¹.

Para o (+)-pantoprazol e (-)-pantoprazol as concentrações foram: 0,800; 1,60; 3,20; 6,40; 12,8; 25,6 e 51,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

As curvas analíticas, obtidas através de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, foram:

- (+)-lansoprazol: $Y = -96650,85833 + 853901,61356 * X$
- (-)-lansoprazol: $Y = -184884,15195 + 1,15947 \text{ E}6 * X$
- (+)-pantoprazol: $Y = -344595,35019 + 2,10496 \text{ E}6 * X$
- (-)-pantoprazol: $Y = -213463,6328 + 2,22153 \text{ E}6 * X$

Os coeficientes de correlação linear (r) obtidos das curvas de calibração foram acima de 0,99. A precisão expressa pelos coeficientes de variação (CV%) das triplicatas, foi inferior a 15% e a exatidão apresentou um desvio menor que 15% do valor nominal em todas as concentrações da curva, exceto para o limite de quantificação (primeiros pontos das curvas) onde o desvio encontrado foi de 15-20%. Todos os valores obtidos estão dentro dos critérios estabelecidos para a validação do método.

A precisão e exatidão intra e interdias do método foram determinadas analisando-se cinco replicatas dos três controles de qualidade. Os resultados encontram-se na Tabela 4.17 e mostram que os valores de coeficiente de variação estão entre 0,16 – 13,7%, considerando-se os valores encontrados para todos os compostos. Os valores de exatidão variaram entre 85,0 – 115 %.

TABELA 4.18 – Precisão (CV%) e exatidão interdias e intradia do método desenvolvido.

Analito (ng/mL)	1º dia (n= 5)		2º dia (n= 5)		3º dia (n= 5)		3 dias (média) (n= 15)	
	Exatidão	CV	Exatidão	CV	Exatidão	CV	Exatidão	CV
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
(+)-Lansoprazol								
0,720	108	4,13	97,3	5,16	99,3	4,19	101	4,49
20,0	108	3,85	105	2,96	101	2,19	105	3,00
35,0	104	1,87	104	2,76	108	4,07	105	2,90
(-)-Lansoprazol								
0,720	115	2,25	96,4	3,31	98,5	7,39	103	4,32
20,0	114	1,18	105	2,33	89,3	1,14	103	1,55
35,0	105	2,83	102	1,29	111	13,8	106	5,97
(+)-Pantoprazol								
0,480	108	4,77	104	3,67	102	3,34	105	3,93
7,00	89,0	2,57	93,2	0,43	85,4	1,47	89,2	1,49
10,0	88,0	3,63	85,1	4,50	87,4	0,87	86,8	3,00
(-)-Pantoprazol								
0,480	104	3,54	86,4	3,98	104	3,54	98,1	3,69
7,00	86,3	2,52	88,2	1,31	86,3	2,52	86,9	2,12
10,0	87,7	2,52	86,6	0,16	87,7	2,52	87,3	1,73

Portanto, todos os valores estão de acordo com os critérios de aceitação do método, ou seja, variabilidades menores ou iguais a 15%.⁹⁰

A eficiência de extração para os fármacos foi avaliada com os três controles de qualidade, preparados em quintuplicata, e os valores obtidos encontram-se na Tabela 4.18.

TABELA 4.19 – Eficiência de extração obtida para as amostras controle de qualidade dos fármacos.

Analito ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Recuperação (%)	Analito ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Recuperação (%)
(+) lansoprazol		(-) lansoprazol	
0,720	97,7	0,720	104
20,0	104	20,0	110
35,0	105	35,0	104
(+) pantoprazol		(-) pantoprazol	
0,480	102	0,480	93,6
7,00	89,4	7,00	85,5
10,0	85,3	10,0	86,5

Comparando-se os resultados de recuperação do método 2, onde foram injetados 500 μL de amostra, com os deste método (injeções de 1000 μL) verifica-se que a coluna RAM foi eficiente na extração dos analitos da água do ponto 1(B) e na transferência deles para a coluna quiral em ambos os métodos.

Os valores de limite de quantificação obtidos foram de 0,600 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para ambos os enantiômeros do lansoprazol e de 0,400 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para os enantiômeros do pantoprazol, e os valores de limite de detecção de 0,150 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 0,200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para cada enantiômero do lansoprazol e pantoprazol, respectivamente. Comparando-se com os valores de limites obtidos com o detector de UV-vis, nota-se uma diminuição de uma ordem de grandeza nas concentrações.

A estabilidade em auto-injetor foi avaliada assim como para o método 2, onde amostras de controle de qualidade (n=5) em água (Ponto 1B) foram injetadas e analisadas imediatamente (tempo zero) e após 24 e 48 horas. Os resultados encontram-se na Tabela 4.19 e mostram a instabilidade dos

fármacos na matriz, com valores de precisão de exatidão fora do que preconiza o guia de validação adotado.¹¹³

TABELA 4.20 – Resultados do estudo de estabilidade em auto-injetor para o lansoprazol e pantoprazol em água do ponto 1(B).

Analito ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Tempo zero		24 horas		48 horas	
	Exatidão	CV	Exatidão	CV	Exatidão	CV
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
(+)-lansoprazol						
0,720	92,8	8,97	129,8	3,69	50,7	7,23
20,0	104	2,89	69,2	2,78	29,3	5,25
35,0	105	2,45	60,5	1,34	28,3	10,8
(-)-lansoprazol						
0,720	98,3	9,94	74,0	2,07	53,8	6,83
20,0	107	3,29	50,6	3,23	27,8	4,48
35,0	106	2,71	46,0	1,91	29,0	13,1
(+)-pantoprazol						
0,480	89,6	3,81	53,0	3,59	47,0	3,80
7,00	99,8	1,26	12,6	13,8	10,1	1,28
10,0	102	1,26	53,4	0,42	45,0	8,71
(-)-pantoprazol						
0,480	94,8	8,05	52,5	2,00	45,8	3,26
7,00	100	0,86	11,7	1,24	8,8	19,0
10,0	101	0,83	51,2	1,18	45,2	1,22

4.5.3 – Aplicação do método

Para a aplicação do método, as curvas de calibração de cada enantiômero apresentaram valores do coeficiente de correlação linear, r , superior a 0,98, o que mostra a linearidade do método. E, os valores de precisão e

exatidão apresentaram desvios de até 15% . O cromatograma da Figura 4.46 exemplifica o ponto intermediário do controle de qualidade (CQM) durante a aplicação do método.

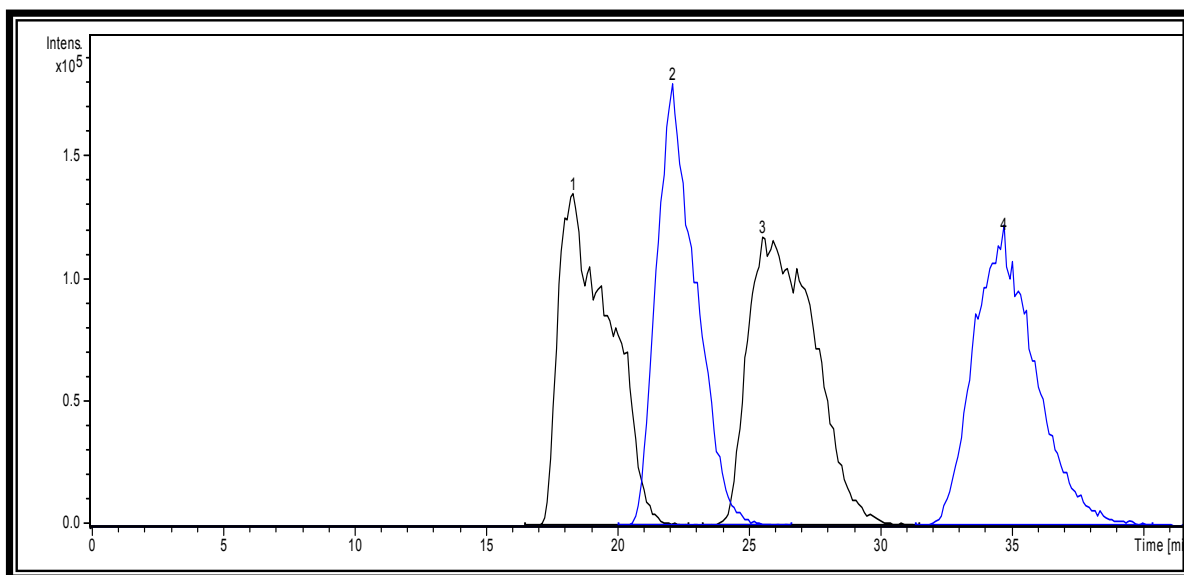


FIGURA 4.44 – Cromatograma referente à amostra de CQM, (-) lansoprazol e (-) pantoprazol. Condições cromatográficas de acordo com a Tabela 4.4.

Foram injetadas amostras coletadas nos pontos dos mapas das Figuras 3.1 e 3.2. No entanto, os enantiômeros dos fármacos lansoprazol e pantoprazol não foram encontrados.

Gros *et al.*¹²² desenvolveram, validou e aplicou um método para a quantificação de fármacos em águas superficiais e de esgoto com pré-tratamento de amostra e concentração por extração em fase sólida seguido de análises por LC/MS-MS. Dentre os fármacos estudados encontra-se o lansoprazol, com um limite de detecção igual a $0,005\mu\text{g.L}^{-1}$ e um limite de quantificação de $0,016\mu\text{g.L}^{-1}$. As amostras foram concentradas cerca de 500 vezes e mesmo com os baixos limites alcançados os fármacos não foram detectados ao se aplicar o método.

Em um trabalho recente, Terzic *et al.*⁴ estudaram a presença de contaminantes emergentes na região ocidental de Balcãs, onde o fármaco

lansoprazol encontra-se entre os compostos estudados. Com pré-tratamento e concentração da amostra, baseado no trabalho de Gros *et al.*¹²², e detecção por espectrometria de massas, o limite de detecção foi de $0,014\mu\text{g.L}^{-1}$ para o lansoprazol, que não foi detectado ao aplicar-se o método.

O método desenvolvido envolve injeção direta de água do ponto 1(B) ($1000\mu\text{L}$) com detecção simultânea dos enantiômeros dos fármacos lansoprazol e pantoprazol por ESI-MS². Os limites de quantificação e detecção obtidos para o fármaco lansoprazol - $0,600$ e $0,150\mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente – são superiores comparando-se com os trabalhos de Gros *et al.*¹²² e Terzic *et al.*⁴. Entretanto, este é o único método enantiosseletivo desenvolvido por CLAE/MS² com injeção direta de amostra, para a quantificação simultânea dos fármacos lansoprazol e pantoprazol na matriz aquosa ambiental – água residual e de estuário. Portanto, acredita-se que a instabilidade dos compostos em água residual seja o fator responsável pela sua ausência nas amostras coletadas e não os limites de quantificação e detecção alcançados.

5 – CONCLUSÕES

Foram desenvolvidos métodos enantiosseletivos para a quantificação dos fármacos inibidores de bomba protônica (PPI), omeprazol, lansoprazol e pantoprazol, em água residual e de estuário.

Os enantiômeros do omeprazol foram detectados em uma amostra de água do estuário do Rio Douro – Porto, Portugal; por outro lado, os mesmos não foram encontrados nas amostras coletadas no Rio Monjolinho – São Carlos, Brasil.

A quantificação simultânea dos enantiômeros dos fármacos lansoprazol e pantoprazol facilita o seu monitoramento em matrizes aquáticas, assim como em estudos de degradação biótica e abiótica.

As percentagens obtidas de exclusão de macromoléculas, associadas à faixa de peso molecular das macromoléculas excluídas com o uso das colunas RAM-BSA, denotam a sua eficiência no tratamento de amostras ambientais. Assim, a cromatografia multidimensional torna-se uma alternativa viável para a quantificação de micromoléculas em matrizes aquáticas ambientais. Os volumes reduzidos de amostras usadas, quando comparados aos métodos de tratamento através de extração em fase sólida, é um dos grandes atrativos dos métodos por injeção direta de amostras.

Métodos por cromatografia líquida de alta eficiência, com injeção direta de amostras, para quantificação enantiosseletiva de fármacos quirais, em matrizes complexas, tendo colunas de meios de acesso restrito na primeira dimensão e uma coluna quiral na segunda dimensão, estão bem estabelecidos para matrizes biológicas, mas não para matrizes ambientais.

Esse trabalho reporta, em nosso conhecimento, o desenvolvimento dos primeiros métodos enantiosseletivos para a quantificação dos fármacos omeprazol, lansoprazol e pantoprazol, em matrizes aquáticas. Além disso, este

trabalho também é o primeiro a reportar o uso de colunas RAM-BSA para tratamento de amostras ambientais.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. PETROVIC, M.; GONZALEZ, S. & BARCELO, D., "Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water". *TrAC, Trends in Analytical Chemistry*. **22**(10): 685, 2003.
2. PETROVIC, M.; HERNANDO, M.D.; DÍAZ-CRUZ, M.S. & BARCELÓ, D., "Liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review". *Journal of Chromatography A*. **1067**: 1, 2005.
3. HEBERER, T., "Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data". *Toxicology letters*. **131**(1-2): 5, 2002.
4. TERZIC, S.; SENTA, I.; AHEL, M.; GROS, M.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D.; MULLER, J.; KNEPPER, T.; MARTÍ, I.; VENTURA, F.; JOVANCIC, P. & JABUCAR, D., "Occurrence and fate of emerging wastewater contaminants in Western Balkan Region". *Science of the Total Environment*. **399**: 66, 2008.
5. SANDERSON, H.; JOHNSON, D.J.; REITSMA, T.; BRAIN, R.A.; WILSON, C.J. & SOLOMON, K.R., "Ranking and prioritization of environmental risks of pharmaceuticals in surface waters". *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. **39**(2): 158, 2004.
6. HERNANDO, M.D.; MEZCUA, M.; FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. & BARCELÓ, D., "Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments". *Talanta*. **69**(2): 334, 2006.
7. WENNMALM, Å. & GUNNARSSON, B., "Pharmaceutical management through environmental product labeling in Sweden". *Environment International*. **In Press, Corrected Proof**
8. STUER-LAURIDSEN, F.; BIRKVED, M.; HANSEN, L.P.; HOLTEN LÜTZHØFT, H.C. & HALLING-SØRENSEN, B., "Environmental risk assessment of human pharmaceuticals in Denmark after normal therapeutic use". *Chemosphere*. **40**(7): 783, 2000.
9. MORLEY, N.J., "Environmental risk and toxicology of human and veterinary waste pharmaceutical exposure to wild aquatic host-parasite relationships". *Environmental Toxicology and Pharmacology*. **27**(2): 161, 2009.

10. LÄNGE, R. & DIETRICH, D., "Environmental risk assessment of pharmaceutical drug substances--conceptual considerations". *Toxicology letters*. **131**(1-2): 97, 2002.
11. CARLSSON, C.; JOHANSSON, A.-K.; ALVAN, G.; BERGMAN, K. & KÜHLER, T., "Are pharmaceuticals potent environmental pollutants?: Part II: Environmental risk assessments of selected pharmaceutical excipients". *Science of the Total Environment*. **364**(1-3): 88, 2006.
12. CARLSSON, C.; JOHANSSON, A.-K.; ALVAN, G.; BERGMAN, K. & KÜHLER, T., "Are pharmaceuticals potent environmental pollutants?: Part I: Environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients". *Science of the Total Environment*. **364**(1-3): 67, 2006.
13. CRANE, M.; WATTS, C. & BOUCARD, T., "Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals". *Science of the Total Environment*. **367**(1): 23, 2006.
14. DAUGHTON, C.G. & TERNES, T.A., "Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change?" *Environmental Health Perspect*. **107**: 907 1999.
15. BILA, D.M. & DEZOTTI, M., "Fármacos no meio ambiente". *Quimica Nova*. **26**(4): 523, 2003.
16. SILVA, A.R.M.; PORTUGAL, F.C.M. & NOGUEIRA, J.M.F., "Advances in stir bar sorptive extraction for the determination of acidic pharmaceuticals in environmental water matrices: Comparison between polyurethane and polydimethylsiloxane polymeric phases". *Journal of Chromatography A*. **1209**(1-2): 10, 2008.
17. Agência Nacional de Águas, www.ana.gov.br. Acessado em 23/01/2009
18. STUMPF, M.; TERNES, T.A.; WILKEN, R.-D.; RODRIGUES, S.V. & BAUMANN, W., "Polar drug residues in sewage and natural waters in the State of Rio de Janeiro, Brazil". *Science of the Total Environment*. **225**(1,2): 135, 1999.
19. TERNES, T.A.; STUMPF, M.; MUELLER, J.; HABERER, K.; WILKEN, R.D. & SERVOS, M., "Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil". *Science of the Total Environment*. **225**(1,2): 81, 1999.
20. FEITOSA-FELIZZOLA, J.; TEMIME, B. & CHIRON, S., "Evaluating on-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography-ion trap mass spectrometry for reliable quantification and confirmation of several

- classes of antibiotics in urban wastewaters". *Journal of Chromatography A*. **1164**: 95, 2007.
21. YANG, S.; CHA, J. & CARLSON, K., "Trace analysis and occurrence of anhydroerythromycin and tylosin in influent and effluent wastewater by liquid chromatography combined with electrospray tandem mass spectrometry". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **385**: 623, 2006.
22. BATT, A.L. & AGA, D.S., "Simultaneous Analysis of Multiple Classes of Antibiotics by Ion Trap LC/MS/MS for Assessing Surface Water and Groundwater Contamination". *Analytical Chemistry*. **77**: 2940, 2005.
23. KOSTOPOULOU, M. & NIKOLAOU, A., "Analytical problems and the need for sample preparation in the determination of pharmaceuticals and their metabolites in aqueous environmental matrices". *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **27**(11): 1023, 2008.
24. BARREIRO, J.C.; MORAES, M.C. & CASS, Q.B., *Emerging Contaminants: Novel Trends on Aquatic Environment Contamination (Pharmaceutical Chiral Compounds in Aquatic Environment)*, in Eetu Heikkinen. (Org.). *Focus on Water Resource Research*. 2008, Nova Science Publishers.
25. RICHARDSON, S.D., "Environmental mass spectrometry: Emerging contaminants and current issues". *Analytical Chemistry*. **78**(12): 4021, 2006.
26. ELJARRAT, E.; GUERRA, P. & BARCELÓ, D., "Enantiomeric determination of chiral persistent organic pollutants and their metabolites". *Trends in Analytical Chemistry*. **27**(10): 847, 2008.
27. STANLEY, J.K.; RAMIREZ, A.J.; CHAMBLISS, C.K. & BROOKS, B.W., "Enantiospecific sublethal effects of the antidepressant fluoxetine to a model aquatic vertebrate and invertebrate". *Chemosphere*. **69**(1): 9, 2007.
28. BUSER, H.-R.; MULLER, M.D.; BALMER, M.E.; POIGER, T. & BUERGE, I.J., "Stereoisomer composition of the chiral UV filter 4-methylbenzylidene camphor in environmental samples". *Environmental science & technology*. **39**(9): 3013, 2005.
29. LIU, W.; GAN, J.; SCHLENK, D. & JURY, W.A., "Enantioselectivity in environmental safety of current chiral insecticides". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **102**(3): 701, 2005.

30. YUAN, L.-M., "Effect of mobile phase additive on chiral separation". *Separation and Purification Technology*. **63**(3): 701, 2008.
31. ILISZ, I.; BERKECZ, R. & PÉTER, A., "Retention mechanism of high-performance liquid chromatographic enantioseparation on macrocyclic glycopeptide-based chiral stationary phases". *Journal of Chromatography A*. **1216**(10): 1845, 2009.
32. CASS, Q.B.D., A. L. G., *Desenvolvimento de Métodos por HPLC. Fundamentos, Estratégias e Validação*. 2001, São Carlos: EdUFSCar. 77.
33. HÜHNERFUSS, H. & SHAH, M.R., "Enantioselective chromatography--A powerful tool for the discrimination of biotic and abiotic transformation processes of chiral environmental pollutants". *Journal of Chromatography A*. **1216**(3): 481, 2009.
34. SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J. & GLAJCH, J.L., *Chiral Separations*, in *Practical HPLC Method Development*, INC, J.W.A.S., Editor. 1997. p. 537.
35. GILBERT, M.T., *Chiral Chromatography*, in *High Performance Liquid Chromatography*, WRIGHT, Editor. 1987: Bristol. p. 291.
36. IKAI, T.; YAMAMOTO, C.; KAMIGAITO, M. & OKAMOTO, Y., "Immobilized-type chiral packing materials for HPLC based on polysaccharide derivatives". *Journal of Chromatography B*. **875**(1): 2, 2008.
37. BOJARSKI, J.; ABOUL-ENEIN, H.Y. & GHANEM, A., "What's new in chromatographic enantioseparations". *Current Analytical Chemistry*. **1**(1): 59, 2005.
38. YASHIMA, E., "Polysaccharide-based chiral stationary phases for high-performance liquid chromatographic enantioseparation". *Journal of Chromatography, A*. **906**(1-2): 105, 2001.
39. BERTHOD, A., "Chiral Recognition Mechanisms". *Analytical Chemistry*. **1**: 2093, 2006.
40. ARMSTRONG, D.W. & ZHANG, B., "Chiral stationary phases for HPLC - Choosing the right stationary phase can be daunting". *Analytical Chemistry*. **73**(19): 557A, 2001.
41. HAGINAKA, J., "Recent progresses in protein-based chiral stationary phases for enantioseparations in liquid chromatography". *Journal of Chromatography B*. **875**(1): 12, 2008.

42. HAGINAKA, J., "Protein-based chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography enantioseparations". *Journal of Chromatography A*. **906**(1-2): 253, 2001.
43. COIMBRA, M. *Determinação do Coeficiente Cromatográfico de Partição, Kw de Inibidores da Bomba de Prótons*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química, 2007. p 140
44. ARMSTRONG, D.W.; TANG, Y.; CHEN, S.; ZHOU, Y.; BAGWILL, C. & CHEN, J., "Macrocyclic Antibiotics as a New Class of Chiral Selectors for Liquid Chromatography". *Analytical Chemistry*. **66**: 1473, 1994.
45. OKAMOTO, Y. & KAIDA, Y., "Resolution by high-performance liquid chromatography using polysaccharide carbamates and benzoates as chiral stationary phases". *Journal of Chromatography A*. **666**(1-2): 403, 1994.
46. HESSE, G. & HAGEL, R., "Complete separation of a racemic mixture by elution chromatography on cellulose triacetate". *Chromatographia*. **6**(6): 277, 1973.
47. OKAMOTO, Y.; KAWASHIMA, M. & HATADA, K., "Chromatographic resolution. 7. Useful chiral packing materials for high-performance liquid chromatographic resolution of enantiomers: phenylcarbamates of polysaccharides coated on silica gel". *Journal of the American Chemical Society*. **106**(18): 5357, 1984.
48. OKAMOTO, Y. & YASHIMA, E., "Polysaccharide derivatives for chromatographic separation of enantiomers". *Angewandte Chemie, International Edition*. **37**(8): 1021, 1998.
49. YASHIMA, E. & OKAMOTO, Y., "Chiral discrimination on polysaccharides derivatives". *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **68**(12): 3289, 1995.
50. OKAMOTO, Y.; KAIDA, Y.; HAYASHIDA, H. & HATADA, K., "Tris(1-phenylethylcarbamate)s of cellulose and amylose as useful chiral stationary phases for chromatographic optical resolution". *Chemical Letters*, (6): 909, 1990.
51. BONATO, P.S.; JABOR, V.A.P. & MASETTO DE GAITANI, C., "Enantioselective analysis of drugs: Contributions of high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis". *Quimica Nova*. **28**(4): 683, 2005.
52. FRANCO, P. & ZHANG, T., "Common approaches for efficient method development with immobilised polysaccharide-derived chiral stationary phases". *Journal of Chromatography B*. **875**(1): 48, 2008.

53. ZHANG, T.; NGUYEN, D.; FRANCO, P.; ISOBE, Y.; MICHISHITA, T. & MURAKAMI, T., "Cellulose tris(3,5-dichlorophenylcarbamate) immobilised on silica: A novel chiral stationary phase for resolution of enantiomers". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **46**(5): 882, 2008.
54. CASS, Q.B.; LUIZA, A.; DEGANI, G. & CASSIANO, N., "The use of a polysaccharide-based column on multimodal elution". *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. **23**(7): 1029, 2000.
55. CASS, Q.B.; DEGANI, A.L.G.; CASSIANO, N.M. & PEDRAZOLLI, J., "Enantiomeric determination of pantoprazole in human plasma by multidimensional high-performance liquid chromatography". *Journal of chromatography. B: Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. **766**(1): 153, 2002.
56. CASS, Q.B.; DEGANI, A.L.G. & CASSIANO, N.M., "Effects on enantioselectivity by the use of polysaccharide-based columns by multimodal elution". *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. **26**(13): 2083, 2003.
57. CASS, Q.B. & BATIGALHIA, F., "Enantiomeric resolution of a series of chiral sulfoxides by high-performance liquid chromatography on polysaccharide-based columns with multimodal elution". *Journal of Chromatography A*. **987**(1-2): 445, 2003.
58. Gazeta Mercantil,
http://indexet.gazetamercantil.com.br/arquivo/2009/02/11/651/IND.FAR_MACEUTICA:-Mercado-de-genericos-cresce-18,9-em-2008.html.
Acessado em 19/03/2009
59. Federação Nacional dos Farmacêuticos,
http://www.fenafar.org.br/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=219:dez-anos-de-genericos-no-brasil-avancos-e-desafios-para-o-acesso-aos-medicamentos&catid=38:publicados.
Acessado em 19/03/2009
60. Associação Brasileira das Indústrias de Medicamentos Genéricos,
www.inpi.gov.br/menu-esquerdo/academia-da-propriedade-intelectual-e-inovacao/.../MesaRedonda_09-09-08_MariaSilvia.pdf Acessado em 19/03/2009
61. Câmara Basil-China de Desenvolvimento Econômico, www.cbcde.org.br.
Acessado em 23/01/2009

62. Secretária do Estado de Saúde-MT, www.saude.mt.gov.br/portal/manchetes/manchete.php?pk_noticia=2382. Acessado em 16/02/2009
63. BRUNI, A.T. *Estudos Teóricos Aplicados à Farmacologia: omeprazol e compostos análogos*. Campinas, Instituto de Química, 2000. p 176.
64. HOOGERWERF, W.A. & PASRICHA, P.J., *Agents used for control of gastric acidity and treatment of peptic ulcers and gastroesophageal reflux disease*, in *The pharmacological basis of therapeutics*. 2001: Nova Iorque. p. 1005.
65. SAVARINO, V.; DI MARIO, F. & SCARPIGNATO, C., "Proton pump inhibitors in GORD: An overview of their pharmacology, efficacy and safety". *Pharmacological Research*. **59**(3): 135, 2009.
66. HATLEBAKK, J.G., "Gastric Acidity - comparison of esomeprazole with other proton pump inhibitors". *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. **17**(1): 10, 2003.
67. DE LIMA, V.V. *Colunas de acesso restrito e biorreatores de enzima GAPDH:: desenvolvimento e aplicacao em cromatografia liquida de alta eficiencia*. São Carlos, Departamento de Química, 2004. p 173.
68. JUNGnickel, P.W., "Pantoprazole: A new proton pump inhibitor". *Clinical Therapeutics*. **22**(11): 1268, 2000.
69. Horn, J., "The proton-pump inhibitors: Similarities and differences". *Clinical Therapeutics*. **22**(3): 266, 2000.
70. KANAZAWA, H.; OKADA, A.; HIGAKI, M.; YOKOTA, H.; MASHIGE, F. & NAKAHARA, K., "Stereospecific analysis of omeprazole in human plasma as a probe for CYP2C19 phenotype". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **30**(6): 1817, 2003.
71. CASS, Q.B.; LIMA, V.V.; OLIVEIRA, R.V.; CASSIANO, N.M.; DEGANI, A.L.G. & PEDRAZZOLI JR., J., "Enantiomeric determination of the plasma levels of omeprazole by direct plasma injection using high-performance liquid chromatography with achiral-chiral column-switching". *Journal of Chromatography B*. **798**(2): 275, 2003.
72. MIURA, M.; TADA, H. & SUZUKI, T., "Simultaneous determination of lansoprazole enantiomers and their metabolites in plasma by liquid chromatography with solid-phase extraction". *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. **804**(2): 389, 2004.

73. GOMES, R.F.; CASSIANO, N.M.; PEDRAZZOLI JR, J. & CASS, Q.B., "Two-dimensional chromatography method applied to the enantiomeric determination of lansoprazole in human plasma by direct sample injection". *Chirality*, 2009.
74. KATSUKI, H.; HAMADA, A.; NAKAMURA, C.; ARIMORI, K. & NAKANO, M., "High-performance liquid chromatographic assay for the simultaneous determination of lansoprazole enantiomers and metabolites in human liver microsomes". *Journal of Chromatography, B: Biomedical Sciences and Applications*. **757**(1): 127, 2001.
75. MIURA, M.; TADA, H.; SATOH, S.; HABUCHI, T. & SUZUKI, T., "Determination of rabeprazole enantiomers and their metabolites by high-performance liquid chromatography with solid-phase extraction". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **41**(2): 565, 2006.
76. BELAZ, K.R.A.; COIMBRA, M.; BARREIRO, J.C.; MONTANARI, C.A. & CASS, Q.B., "Multimilligram enantioresolution of sulfoxide proton pump inhibitors by liquid chromatography on polysaccharide-based chiral stationary phase". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **47**(1): 81, 2008.
77. MONTANARI, M.L.C.; CASS, Q.B.; LEITAO, A.; ANDRICOPULO, A.D. & MONTANARI, C.A., "The role of molecular interaction fields on enantioselective and nonselective separation of chiral sulfoxides". *Journal of Chromatography A*. **1121**(1): 64, 2006.
78. TORIBIO, L.; DEL NOZAL, M.J.; BERNAL, J.L.; ALONSO, C. & JIMENEZ, J.J., "Comparative study of the enantioselective separation of several antiulcer drugs by high-performance liquid chromatography and supercritical fluid chromatography". *Journal of Chromatography A*. **1091**(1-2): 118, 2005.
79. DE LIMA, V.V.; CASSIANO, N.M. & CASS, Q.B., "Desenvolvimento de colunas cromatográficas de meios de acesso restrito proteína-imobilizada e suas avaliações para a análise de fármacos com injeção direta de plasma humano". *Química Nova*. **29**(1): 72, 2006.
80. CHICO, J.; MECA, S.; COMPANYYO, R.; PRAT, M.D. & GRANADOS, M., "Restricted access materials for sample clean-up in the analysis of trace levels of tetracyclines by liquid chromatography. Application to food and environmental analysis". *Journal of Chromatography A*. **1181**: 1, 2008.

81. SLOBODA, E. *Influência do tamanho molecular aparente das substâncias húmicas aquáticas na eficiência da coagulação com sulfato de alumínio e cloreto férrico*. São Carlos, Instituto de Química, 2007. p 230.
82. JUNIOR, E.S.; ROCHA, J.C.; ROSA, A.H.; ZARA, L.F. & DOS SANTOS, A., "Substâncias Húmicas Aquáticas: fracionamento molecular e caracterização de rearranjos internos após complexação com íons metálicos". *Quimica Nova*. **24**(3): 339, 2001.
83. CASSIANO, N.M.; LIMA, V.V.; OLIVEIRA, R.V.; DE PIETRO, A.C. & CASS, Q.B., "Development of restricted-access media supports and their application to the direct analysis of biological fluid samples via high-performance liquid chromatography". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **384**: 1462, 2006.
84. SOUVERAIN, S.; RUDAZ, S. & VEUTHEY, J.L., "Restricted Access Materials and Large Particle Supports for on-line sample preparation: an attractive approach for biological fluids analysis". *Journal of Chromatography B*. **801**: 141, 2004.
85. MULLETT, W.M., "Determination of drugs in biological fluids by direct injection of sample for liquid-chromatography analysis". *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. **70**: 263, 2007.
86. BELAZ, K.R.A.; CASS, Q.B. & OLIVEIRA, R.V., "Determination of albendazole metabolites by direct injection of bovine plasma and multidimensional achiral-chiral high performance liquid chromatography". *Talanta*. **76**(1): 146, 2008.
87. CASS, Q.B. & GALATTI, T.F., "A method for determination of the plasma levels of modafinil enantiomers, (+/-)-modafinilic acid and modafinil sulphone by direct human plasma injection and bidimensional achiral-chiral chromatography". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **46**(5): 937, 2008.
88. CASS, Q.B.; GOMES, R.F.; CALAFATTI, S.A. & PEDRAZOLLI JR., J., "Determination of amoxicillin in human plasma by direct injection and coupled-column high-performance liquid chromatography". *Journal of Chromatography A*. **987**(1-2): 235, 2003.
89. DE PAULA, F.C.C.R.; DE PIETRO, A.C. & CASS, Q.B., "Simultaneous quantification of sulfamethoxazole and trimethoprim in whole egg samples by column-switching high-performance liquid chromatography using restricted access media column for on-line sample clean-up". *Journal of Chromatography A*. **1189**(1-2): 221, 2008.

90. OLIVEIRA, R.V. & CASS, Q.B., "Evaluation of Liquid Chromatographic Behavior of Cephalosporin Antibiotics Using Restricted Access Medium Columns for On-line Sample Cleanup of Bovine Milk". *J. Agric. Food Chem.* **54**(4): 1180, 2006.
91. PEREIRA, A.V. & CASS, Q.B., "High-performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in bovine milk using an on-line clean-up column." *Journal of Chromatography B.* **826**(1-2): 139, 2005.
92. YOSHIDA, H.; MORITA, I.; TAMAI, G.; MASUJIMA, T.; TSURU, T.; TAKAI, N. & IMAI, H., " Some Characteristics of a Protein-Coated ODS Column and its Use for the Determination of Drugs by the Direct Injection Analysis of Plasma Samples". *Chromatographia.* **19**: 466, 1984.
93. MENEZES, M.L. & FELIX, G., "Analysis of Organochlorine Pesticides in Plain Milk Using Direct Injection on na ISRP Column with Column Switching". *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies.* **19**: 3221, 1996.
94. MENEZES, M.L. & FELIX, G., "On-Line Extration and Separation of Bendiocarb, Methomyl, Methylparathion and Pentachlorophenol Pesticides from Raw Milk". *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies.* **21**: 2863, 1998.
95. MENEZES, M.L.; FELIX, G. & DEMARCHI, A.C.C.O., "On-Line Extration and Determination of Carbofuran in Raw Milk by Direct HPLC Injection on na ISRP Column". *Chromatographia.* **47**: 81, 1998.
96. FELIX, G. & CAMPESE, D. *Determination by HPLC of the chiral conversion of drugs in biologic fluids on new RAM-CHIRAL columns.* in *30th Internacional Symposium & Exhibit on High Peformance Liquid Phase Separations and Related techiniques.* 2006. San Francisco-CA-USA.
97. HOGENDOORN, E.A.; DIJKMAN, E.; BAUMANN, B.; HIDALGO, C.; SANCHO, J.V. & HERNANDEZ, F., "Strategies in Using Analytical Restricted Access Media Columns for the Removal of Humic Acid Interferences in the Trace Analysis of Acidic Herbicides in Water Samples by Coupled Column Liquid Chromatography with UV Detection". *Analytical Chemistry.* **71**: 1111, 1999.
98. CONLEY, J.M.; SYMESB, S.J.; KINDELBERGER, S.A. & SEAN M. RICHARDS, S.M., "Rapid liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of a broad mixture of

- pharmaceuticals in surface water". *Journal of Chromatography A*. **1185**: 206, 2008.
99. DE STEENE, J.C.V. & LAMBERT, W.E., "Validation of a solid-phase extraction and liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometric method for the determination of nine basic pharmaceuticals in wastewater and surface water samples". *Journal of Chromatography A*. **1182**: 153, 2008.
100. LI, D.; YANGA, M.; HUB, J.; ZHANGA, Y.; CHANGB, H. & JIN, F., "Determination of penicillin G and its degradation products in a penicillin production wastewater treatment plant and the receiving river". *Water Research*, 2007.
101. GULKOWSKA, A.; LEUNG, H.W.; SO, M.K.; TANIYASU, S.; YAMASHITA, N.; YEUNG, L.W.Y.; RICHARDSON, B.J.; LEI, A.P.; GIESY, J.P. & LAM, P.K.S., "Removal of antibiotics from wastewater by sewage treatment facilities in Hong Kong and Shenzhen, China". *Water Research*, 2007.
102. 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". *Quimica Nova*. **31**(3): 623, 2008.
103. ANDREU, V. & PICO, Y., "Determination of Linear Alkylbenzenesulfonates and Their Degradation Products in Soils by Liquid Chromatography-Electrospray-Ion Trap Multiple-Stage Mass Spectrometry". *Analytical Chemistry*. **76**: 2878, 2004.
104. TERNES, T.; BONERZ, M. & SCHMIDT, T., "Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and rivers by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry". *Journal of Chromatography A*. **938**: 175, 2001.
105. RIBEIRO, C.; TIRITAN, M.E.; ROCHA, E. & ROCHA, M.J., "Seasonal and Spatial Distribution of Several Endocrine-Disrupting Compounds in the Douro River Estuary, Portugal". *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. **56**: 1, 2009.
106. OLIVEIRA, R.V.; DE PIETRO, A.C. & CASS, Q.B., "Quantification of cephalexin as residue levels in bovine milk by high-performance liquid chromatography with on-line sample cleanup". *Talanta*. **71**(3): 1233, 2007.

107. NOVELLI, A. *Estudo limnológico e ecotoxicológico da água e sedimento do rio Monjolinho - São Carlos (SP), com ênfase nas substâncias de referência cádmio e cobre*. São Carlos, EESC (Escola de Engenharia de São Carlos), 2005. p 212.
108. PELÁEZ-RODRIGUES, M. *Avaliação da qualidade da água da Bacia do Alto Jacaré-Guaçú/SP (Ribeirão do Feijão e Rio do Monjolinho) através de variáveis físicas, químicas e biológicas*. São Carlos, EESC (Escola de Engenharia de São Carlos), 2001. p 145.
109. ESPÍNDOLA, E.L.G., *O Rio Monjolinho: um estudo de caso*, in *A Bacia Hidrográfica do rio Monjolinho*. 2000. p. 36.
110. SALAMI, L.N.B. *Estudo das influências climáticas e antropogênicas nas características físico e químicas no rio Monjolinho*. São Carlos, EESC (Escola de Engenharia de São Carlos), 1996. p 135.
111. BARRETO, A.S. *Estudo da distribuição de metais em ambiente lótico, com ênfase na assimilação das comunidades biológicas e na sua quantificação no sedimento e água*. São Carlos, EESC (Escola de Engenharia de São Carlos), 1999. p 276.
112. WU, F.C.; EVANS, R.D.; DILLON, P.J. & CAI, Y.R., "Rapid quantification of humic and fulvic acids by HPLC in natural waters". *Applied Geochemistry*. **22**: 1598, 2007.
113. RESOLUÇÃO-RE N° 899, DE 29 DE MAIO DE 2003, http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm#. Acessado em 12/02/2009
114. SAMBE, H.; HOSHINA, K.; HOSOYA, K. & HAGINAKA, J., "Simultaneous determination of bisphenol A and its halogenated derivatives in river water by combination of isotope imprinting and liquid chromatography-mass spectrometry". *Journal of Chromatography A*. **1134**(1-2): 16, 2006.
115. PETROVIC, M.; TAVAZZI, S. & BARCELO, D., "Column-switching system with restricted access pre-column packing for an integrated sample cleanup and liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of alkylphenolic compounds and steroid sex hormones in sediment". *Journal of Chromatography A*. **971**(1-2): 37, 2002.
116. LIMA, V.V. *Colunas RAM e Biorreatores de GAPDH: Desenvolvimento, Avaliação e Aplicação em CLAE*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química 2004. p 173.

117. MATLIN, S.A., M.; TIRITAN, M.E.; CRAWFORD, A.J.; CASS, Q.B. & BOYD, D.R., "HPLC with carbohydrate carbamate chiral phases: Influence of chiral phase structure on enantioselectivity". *Chirality*. **6**(2): 135, 1994.
118. BEROVA, N.; NAKANISHI, K. & WOODY, R.W., *Circular Dichroism: Principles and Applications*. 2º ed. 1994, Nova Iorque. 576.
119. ELIEL, E.L. & WILEN, S.H., *Stereochemistry of Organic Compounds*. 1994, Nova Iorque. 1267.
120. Guidance for Industry Analytical Procedures and Methods Validation. August 2000, www.fda.gov/CDER/GUIDANCE/4252fnl.pdf. Acessado em 12/02/2009
121. CASTIGLIONI, S.; BAGNATI, R.; CALAMARI, D.; FANELLI, R. & ZUCCATO, E., "A multiresidue analytical method using solid-phase extraction and high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban wastewaters". *Journal of Chromatography A*. **1092**: 206, 2005.
122. GROS, M.; PETROVIC, M. & BARCELO, D., "Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters". *Talanta*. **70**: 678, 2006.
123. DELLAGRECA, M.; IESCE, M.R.; PREVITERA, L.; RUBINO, M.; TEMUSSI, F. & BRIGANTE, M., "Degradation of lansoprazole and omeprazole in the aquatic environment". *Chemosphere*. **63**(7): 1087, 2006.
124. KHALAF, H.; SALSTE, L.; KARLSSON, P.; IVARSSON, P.; JASS, J. & OLSSON, P.-E., "In vitro analysis of inflammatory responses following environmental exposure to pharmaceuticals and inland waters". *Science of the Total Environment*. **407**(4): 1452, 2009.
125. SACHER, F.; LANGE, F.T.; BRAUCH, H.-J. & BLANKENHORN, I., "Pharmaceuticals in groundwaters: Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany". *Journal of Chromatography A*. **938**(1-2): 199, 2001.
126. CALAMARI, D.; ZUCCATO, E.; CASTIGLIONI, S.; BAGNATI, R. & FANELLI, R., "Strategic Survey of Therapeutic Drugs in the Rivers Po and Lambro in Northern Italy". *Environmental science & technology*. **37**: 1241, 2003.

127. WEIGEL, S.; KUHLMANN, J. & HUHNERFUSS, H., "Drugs and personal care products as ubiquitous pollutants: occurrence and distribution of clofibric acid, caffeine and DEET in the North Sea". *Science of the Total Environment*. **295**(1-3): 131, 2002.
128. Commission Decision (2002/657/EC) of 12 August 2002, Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results., <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:221:0008:0036:EN:PDF>.
129. ROGATSKY, E. & STEIN, D., "Evaluation of Matrix Effect and Chromatography Efficiency: New Parameters for Validation of Method Development". *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. **16**: 1757, 2005.
130. 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*. **XY**: 1, 2009.
131. SRNERAGLIA, J.; BALDREY, S.F. & WATSON, D., "Matrix Effects and Selectivity Issues in LC-MS-MS". *Chromatographia*. **55**: S95, 2002.
132. VISWANATHAN, C.T.; BANSAL, S.; BOOTH, B.; DESTEFANO, A.J.; ROSE, M.J.; SAILSTAD, J.; SHAH, V.P.; SKELLY, J.P.; SWANN, P.G. & WEINER, R., "Quantitative bioanalytical methods validation and implementation: Best practices for chromatographic and ligand binding assays". *Pharmaceutical Research*. **24**(10): 1962, 2007.