



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**IDENTIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS  
ANSIOLÍTICOS E ANTIEPILEPTICOS E SEUS  
METABÓLITOS EM EFLUENTE HOSPITALAR**

**TESE DE DOUTORADO**

**Carlos Alberto Araújo de Almeida**

**Santa Maria, RS, Brasil.**

**2012**

**IDENTIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS  
ANSIOLÍTICOS E ANTIEPILÉPTICOS E SEUS METABÓLITOS  
EM EFLUENTE HOSPITALAR**

**Carlos Alberto Araújo de Almeida**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Química.**

**Orientador: Prof. Tit. Dr. Ayrton Figueiredo Martins**

**Santa Maria, RS, Brasil.**

**2012**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Naturais e Exatas  
Programa de Pós-Graduação em Química**

A comissão examinadora abaixo assinada aprova a tese

**IDENTIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS  
ANSIOLÍTICOS E ANTIEPILEPTICOS E SEUS METABÓLITOS  
EM EFLUENTE HOSPITALAR**

elaborada por

**Carlos Alberto Araújo de Almeida**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Doutor em Química**

**Comissão Examinadora**

  
Prof. Tit. Dr. Ayrton Figueiredo Martins (Orientador), UFSM

  
Prof. Dr. Osmar D. Prestes, UNIPAMPA

  
Prof. Drª Carla Sirtori, UNILA

  
Prof. Dr. Daniel Ricardo Arsand, IF SUL – Pelotas

  
Prof. Drª Martha Adaime, UFSM

Santa Maria, 06 de dezembro de 2012.

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Almeida, Carlos Alberto Araújo de  
Identificação e determinação de fármacos ansiolíticos e  
antiepilépticos e seus metabólitos em efluente hospitalar  
/ Carlos Alberto Araújo de Almeida.-2012.  
148 p. ; 30cm

Orientador: Ayrton Figueiredo Martins  
Coorientador: Renato Zanella  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de  
Pós-Graduação em Química, RS, 2012

1. Determinação de ansiolíticos e antiepilépticos 2.  
Efluente Hospitalar 3. Identificação de metabólitos de  
fármacos psicoativos 4. LC-MS/MS\_QTRAP 5. Avaliação  
preliminar do risco I. Martins, Ayrton Figueiredo II.  
Zanella, Renato III. Título.

**Se alguém lhe bloquear a porta, não gaste energia  
com o confronto, procure as janelas.  
Lembre-se da sabedoria da água:  
“...a água nunca discute com seus obstáculos, mas os  
contorna.”**

Autor desconhecido

Dedico este trabalho a Deus, às pessoas que me amam, às que nos momentos difíceis de minha vida estiveram e estão ao meu lado, às que me incentivaram, às que acreditaram em mim, às que com coração sincero torceram pela minha vitória e às que me ajudaram. Porque se pude ir mais longe foi porque recebi a ajuda de gigantes.

## **Agradecimentos**

A Deus, este Ser Supremo, que ilumina nosso caminho e nos dá forças para seguir sempre em frente, nos revigorando, nos fortalecendo, e que nos ajuda a superar os obstáculos. Agradeço, também, a Deus pelas inúmeras pedras e obstáculos que houve no caminho porque agora ao fim desta etapa e olhando para trás vi que isto me fez forte e consegui completar esta caminhada.

Ao Prof. Tit. Dr. Ayrton F. Martins por sua dedicação, paciência, sensibilidade e apoio ao longo desta jornada. Por ter acreditado na minha capacidade e principalmente pela forma como soube mostrar o caminho para a realização deste trabalho. E principalmente por abrir as portas do conhecimento, bem como a expansão dos meus horizontes.

Ao Prof. Tit. Dr. Carlos Augusto Mallmann e ao Prof. Dr. Paulo Dilkin - Coordenadores do Laboratório de Análises Micotoxicológicas, pela disponibilização do laboratório e dos equipamentos para a realização desta pesquisa, também pela orientação e estímulo, muito obrigado.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Química que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

À minha esposa, Maria Inês da Silva Almeida, e minha filha, Luísa da Silva Almeida, pelo carinho, amor, compreensão e incentivo diante dificuldades, das angústias, das pedras no caminho, que souberam superar e compreender as minhas ausências, a minha falta de tempo dispensado com vocês. Graças a isto foi possível concretizar este sonho, muito obrigado, sem as quais seria difícil a realização deste trabalho.

À minha família principalmente a minha tia Therezinha de Maria que esteve sempre comigo assumindo o papel de mãe pelo incentivo durante esta caminhada, que infelizmente não está mais entre nós, mas em pensamento sempre se faz presente ao vô José Luiz Ribeiro, a meu pai Djalma, a Nita, à Daniela, à Cristiane Rosa da Silva, a Selena, a madrinha Diná pela amizade e presença em muitos momentos importantes, pelo estímulo e apoio incondicional.

Aos colegas do LAMIC Cristiane, Fabiana, Luciane, Andressa, Fernanda, Vanessa, Jane e tantos outros que trabalharam conosco muito obrigado pelo apoio e amizade. Em especial ao Maurício, pela sua colaboração no auxílio do desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas/CCS.

Aos professores Daniel Arsand, Osmar D. Prestes, Djalma Dias da Silveira, Marta Adaime e Marcelo Wilde pelas consideráveis sugestões prestadas no exame de qualificação.

Aos professores Carla Sirtoli, Daniel Arsand, Osmar D. Prestes, Marta Adaime, Sérgio Mortari e Ricardo Brandão pelas consideráveis sugestões prestadas pela participação na banca examinadora e pelas valiosas sugestões.

Aos colegas do LATER Marcelo, Daiane Balconi, Magale, Daiane Skupin, Franciele, Carla e Sheila que contribuíram significativamente na realização deste trabalho, também pelo convívio, paciência e apoio durante a realização desta Tese. Agradeço especialmente a Carla Brenner pela colaboração e incentivo no auxílio do desenvolvimento do trabalho, a sua incansável dedicação e apoio, através de seu conhecimento técnico, companheirismo, os quais foram imprecendíveis para vencermos as muitas dificuldades que surgiram pelo caminho.

Que as nossas energias sejam as mesmas da nascente de todas as vidas. Que as nossas mãos possam ser a expressão das mãos do Grande Criador. Que nossos olhos possam brilhar, assim como brilham o Sol da Vida e o sol de nossos corações. Que as nossas preces sejam de gratidão e nossas ações tenham a consciência da dança da vida, do Grande Mistério, presente em cada ação. Que nossos pés toquem a Mãe Terra com carinho, tornando cada passo sagrado. Que todos os trabalhos de nossas vidas possam ser serviços de auxílio e evolução. Agradeço a este ser criador do Universo, aos meus amigos e irmãos do C.E.U. JOAO BATISTA, especialmente ao Irmão Rafael Barcellos, pelo sábio uso de suas palavras e mensagens, pelo seu incansável desprendimento, nos momentos de dificuldade, também pela sua amizade e com sua energia nos momentos mais difíceis desta longa jornada.

À todos aqueles que me acompanharam, vivenciaram e contribuíram de alguma forma para a concretização deste trabalho, MUITO OBRIGADO.

# RESUMO

Tese de Doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Química  
Universidade Federal de Santa Maria

## Identificação e determinação de fármacos ansiolíticos e antiepilépticos e seus metabólitos em efluente hospitalar

AUTOR: CARLOS ALBERTO ARAÚJO DE ALMEIDA  
ORIENTADOR: PROF. TIT. DR AYRTON FIGUEIREDO MARTINS  
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 06 de dezembro de 2012.

Uma nova metodologia analítica foi desenvolvida com a finalidade de investigar a presença de cinco fármacos psicoativos (ansiolíticos e antiepilépticos): bromazepam, carbamazepina, clonazepam, diazepam e lorazepam no efluente do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), visto que estes compostos são amplamente utilizados no tratamento da ansiedade e da epilepsia. As amostras foram coletadas de dois pontos para a verificação da concentração dos compostos: o Ponto A (efluente do PA-HUSM) e o ponto B (efluente geral – que abrange o HUSM e a Biblioteca Central). Utilizou-se um método de clean-up/pré-concentração por extração em fase sólida, para avaliar a ocorrência de ansiolíticos e antiepilépticos no efluente do HUSM. Deste modo, três métodos para determinar estes compostos foram desenvolvidos e validados: i) cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta (HPLC-UV), ii) cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massa (LC-MS) e iii) cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa com ionização por eletronebulização e armadilha de íons (LC-MS/MS\_Qtrap). Dentre os métodos avaliados, o LC-MS/MS\_Qtrap com eletronebulização no modo positivo obteve melhores resultados. O limite de detecção (LOD,  $S/N \geq 3$ ) para bromazepam e lorazepam foi  $4,90 \pm 0,95 \text{ ng L}^{-1}$  e, para carbamazepina, clonazepam e diazepam,  $6,10 \pm 1,50 \text{ ng L}^{-1}$ . O limite de quantificação (LOQ,  $S/N \geq 10$ ) foi de  $30,00 \pm 1,10 \text{ ng L}^{-1}$ , para bromazepam, clonazepam e lorazepam; carbamazepina,  $50,00 \pm 1,81 \text{ ng L}^{-1}$  e, diazepam,  $40,00 \pm 0,98 \text{ ng L}^{-1}$ . A faixa linear do método (LC-MS/MS\_Qtrap) para bromazepam foi de  $30\text{-}1500 \text{ ng L}^{-1}$ , para carbamazepina  $50\text{-}2500 \text{ ng L}^{-1}$ ; clonazepam de  $30\text{-}2500 \text{ ng L}^{-1}$ , diazepam  $40\text{-}2500 \text{ ng L}^{-1}$  e para lorazepam foi de  $30\text{-}2000 \text{ ng L}^{-1}$ . O coeficiente de correlação ( $R^2 > 0,997$ ) para todos os compostos. A eficiência da metodologia foi verificada através da recuperação com a fortificação em três níveis de concentração em triplicata de amostras de efluente hospitalar. As taxas de recuperação média constatadas foram: para bromazepam  $93,9\% \pm 2,1$ ; carbamazepina  $92,6\% \pm 4,2$ ; clonazepam  $93,9\% \pm 3,0$ ; diazepam  $91,8\% \pm 6,0$  e lorazepam foi de  $93,8\% \pm 4,3$ . As concentrações médias das drogas psiquiátricas detectadas no efluente do PA-HUSM e efluente geral foram respectivamente: bromazepam,  $195,0 \pm 6,4 \text{ ng L}^{-1}$  e  $137,1 \pm 7,0 \text{ ng L}^{-1}$ ; carbamazepina,  $589,6 \pm 6,1 \text{ ng L}^{-1}$  e  $460,7 \pm 9,3 \text{ ng L}^{-1}$ , diazepam,  $645,0 \pm 0,3 \text{ ng L}^{-1}$  e  $571,0 \pm 9,9 \text{ ng L}^{-1}$ , lorazepam,  $95,7 \pm 6,7 \text{ ng L}^{-1}$  e  $42,4 \pm 4,2 \text{ ng L}^{-1}$  e clonazepam,  $134,3 \pm 9,8 \text{ ng L}^{-1}$  e  $56,9 \pm 9,9 \text{ ng L}^{-1}$ . A identificação dos metabólitos no efluente hospitalar foi realizada através de LC-MS/MS\_Qtrap. Os metabólitos identificados foram: 3-hidroxi-bromazepam (bromazepam), 7-amino-clonazepam (clonazepam), carbamazepina 10,11-epóxido, 10-dihidroxi-10,11-dihidrocarbamazepina, iminoquinona, 2-hidroxi-carbamazepina e acridona (carbamazepina), nordiazepam, oxazepam e temazepam (diazepam) e, seus caminhos de fragmentação foram propostos. Foi realizada uma avaliação de risco preliminar de ansiolíticos e antiepilépticos com o auxílio de dados da literatura e foi verificado que os compostos carbamazepina e diazepam apresentaram maior risco com Quociente de Risco teórico (0,85 e 0,90, respectivamente) entre os compostos analisados. De acordo com os resultados obtidos pode-se dizer que apresentam risco médio, requerendo maior atenção em termos de toxicidade. Entretanto, dados na literatura não foram encontrados sobre a Concentração Prevista que Não Causa Efeito (PNEC) para bromazepam, clonazepam e lorazepam, impossibilitando o cálculo do quociente de risco (QR) para estes compostos. Portanto, foi evidenciada a ocorrência de ansiolíticos e antiepilépticos no efluente do HUSM em concentrações na ordem de  $\text{ng L}^{-1}$ . O método analítico por LC-MS/MS\_Qtrap desenvolvido para a determinação das drogas psicoativas (bromazepam, carbamazepina, clonazepam, diazepam e lorazepam) no efluente hospitalar provou ser sensível, seletivo, dispensando manipulação laboriosa da amostra e exigindo corrida cromatográfica de apenas 15 minutos. A ocorrência destes fármacos e os riscos ambientais associados demonstram a necessidade de sistema mais eficiente de tratamento para o efluente hospitalar.

**Palavras-Chave:** ansiolíticos e antiepilépticos; LC-MS/MS\_Qtrap; efluente hospitalar; avaliação preliminar do risco; metabólitos.



**ABSTRACT**  
Ph.D. Thesis  
Chemistry Post-Graduation Program  
Federal University of Santa Maria

**Identification and determination of metabolites of antiepileptic and anxiolytic drugs in hospital effluent**

AUTHOR: CARLOS ALBERTO ARAUJO DE ALMEIDA  
ADVISER: PROF. TIT. DR. AYRTON FIGUEIREDO MARTINS  
Date and Location's Defense: Santa Maria, Dezember, 06, 2012.

A new analytical methodology was developed in order to investigate the presence of five psychoactive drugs (anxiolytic and antiepileptics), namely, bromazepam, carbamazepine, clonazepam, diazepam, and lorazepam in the effluent of the University Hospital of Santa Maria (HUSM) of the Federal University of Santa Maria (UFSM), since these compounds are widely used in the treatment of anxiety and epilepsy. Samples were collected from two points to check the concentration of the compounds: Point A (Emergency) and point B (General Effluent - which covers the Central Library and HUSM). The method of clean-up/pre-concentration by solid phase extraction (SPE) was used to assess the occurrence of anxiolytic and antiepileptic drugs in the effluent of HUSM. Three methods were developed and validated to determine these compounds: i) high performance liquid chromatography with ultraviolet detection (HPLC-UV), ii) high performance liquid chromatography with detection by mass spectrometry (LC-MS), and iii) liquid chromatography-ion trap-tandem mass spectrometry with electrospray ionization (LC-MS/MS\_Qtrap). Among the methods evaluated, LC-MS/MS\_Qtrap with electrospray in positive mode yielded better results. The detection limit (LOD,  $S/N \geq 3$ ) for lorazepam and bromazepam was  $4.90 \pm 0.95$  ng L<sup>-1</sup> and for carbamazepine, clonazepam and diazepam,  $6.10 \pm 1.50$  ng L<sup>-1</sup>. The limit of quantification (LOQ,  $S/N \geq 10$ ) was  $30.00 \pm 1.10$  ng L<sup>-1</sup> bromazepam, clonazepam and lorazepam;  $50.00 \pm 1.81$  ng L<sup>-1</sup>, carbamazepine; and  $40.00 \pm 0.98$  ng L<sup>-1</sup> diazepam. The linear range of the assay (LC-MS/MS\_Qtrap) was 30-1500 ng L<sup>-1</sup> for bromazepam; 50-2500 ng L<sup>-1</sup>, carbamazepine; 30-2500 ng L<sup>-1</sup>, clonazepam; 40-2500 ng L<sup>-1</sup>, diazepam; and 30 - 2000 ng L<sup>-1</sup>, lorazepam. The correlation coefficient ( $R^2 > 0.997$ ) for all compounds. The effectiveness of the methodology was verified by recovery with the fortification of three concentration levels in triplicate samples of hospital effluent. The average recovery rates observed were:  $93.9 \pm 2.1\%$  for bromazepam;  $92.6 \pm 4.2\%$ , carbamazepine;  $93.9 \pm 3.0$  clonazepam;  $91.8 \pm 6.0$  for diazepam; and  $93.8 \pm 4.3$  for lorazepam. The mean concentrations of psychiatric drugs detected in the effluent of the Emergency and General Effluent were respectively:  $195.0 \pm 6.4$  ng L<sup>-1</sup> and  $137.1 \pm 7.0$  ng L<sup>-1</sup> for bromazepam;  $589.6 \pm 6.1$  ng L<sup>-1</sup>, and  $460.7 \pm 9.3$  ng L<sup>-1</sup>, carbamazepine;  $645.0 \pm 0.3$  ng L<sup>-1</sup> and  $571.0 \pm 9.9$  ng L<sup>-1</sup>, diazepam;  $95.7 \pm 6.7$  ng L<sup>-1</sup> and  $42.4 \pm 4.2$  ng L<sup>-1</sup> lorazepam; and  $134.3 \pm 9.8$  ng L<sup>-1</sup> and  $56.9 \pm 9.9$  ng L<sup>-1</sup> clonazepam. The identification of metabolites in the hospital effluent was made through (LC-MS/MS\_Qtrap). The metabolites identified were: 3-hydroxybromazepam (bromazepam), 7-aminoclonazepam (clonazepam), carbamazepine 10,11-epoxide, 10-dihydroxy-10,11-dihydrocarbamazepine, iminoquinone, 2-hydroxy-carbamazepine and acridone (carbamazepine), and nordiazepam, oxazepam and temazepam (diazepam), and their fragmentation pathways were proposed. Was performed a preliminary risk assessment of anxiolytic and antiepileptic drugs with the aid of literature data and found that the carbamazepine and diazepam compounds showed the highest risk (0.85 and 0.90, respectively) among the compounds analyzed. According to the results we can say that they present medium risk requiring more attention in terms of toxicity. However, no literature data were found on the Predicted No Effect Concentration (PNEC) for bromazepam, lorazepam, clonazepam, not allowing the calculation of risk quotient (RQ) for these compounds. Therefore, we observed the occurrence of anxiolytic and antiepileptic drugs in the effluent of HUSM at concentrations in the order of ng L<sup>-1</sup>. The analytical method for LC-MS/MS\_Qtrap developed for the determination of psychoactive drugs (bromazepam, carbamazepine, clonazepam, diazepam and lorazepam) in hospital effluent proved to be sensitive and selective, eliminating laborious sample handling and requiring chromatographic run of just 15 minutes. The occurrence of these drugs and environmental risks associated demonstrate the need for more efficient treatment for the hospital effluent.

**Keywords:** anxiolytics and antiepileptics; LC-MS/MS\_Qtrap; hospital effluent; preliminary risk assessment.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Possíveis rotas de contaminação do meio ambiente com fármacos. ....	5
Figura 2 - Representação esquemática de (A) um sistema de fossa séptica conjugada de (B) filtro anaeróbio, adotado no tratamento de efluentes do HUSM.....	7
Figura 3 – Esquema ilustrativo do sistema de esgotos do HUSM e os pontos de coleta de efluente: 3.a -Ponto B - Efluente Geral; 3.b - Ponto A – Efluente do Pronto atendimento e 3.c – Representação esquemática do sistema de saneamento do HUSM/UFMS. (Fonte da foto aérea: Google, Wilde, 2011). ....	8
Figura 4 - Estrutura geral dos benzodiazepínicos. (Fonte: Borges <i>et al.</i> , 2009) .....	15
Figura 5 - Rota metabólica do diazepam e estrutura química de seus metabólitos. ....	20
Figura 6 - Metabolismo da carbamazepina. ....	21
Figura 7 - Reação de biotransformação pela via de epoxidação da carbamazepina. ....	22
Figura 8 - Principais vias metabólicas de biotransformação da carbamazepina. ....	22
Figura 9 – Fluxograma da extração em fase sólida dos ansiolíticos e antiepilépticos para a determinação por HPLC-UV, LC-MS e LC-MS/MS. ....	52
Figura 10 - Avaliação da variação do pH para a determinação de ansiolíticos e antiepilépticos. Condições: solução aquosa fortificadas com 100 µg L <sup>-1</sup> de padrão (metanol). ....	61
Figura 11 - Avaliação de diferentes sorventes para determinação de ansiolíticos e antiepilépticos. Condições: solução aquosa fortificada com 100 µg L <sup>-1</sup> de padrão (metanol). ....	62
Figura 12 - Resultados obtidos para a avaliação da variável solvente de eluição do analito. Sendo (A) metanol:acetato de etila (50:50 v/v); (B) acetonitrila:acetato de etila (50:50 v/v); (C) metanol; (D) acetonitrila; (E) metanol:ácido acético (0,1%) 80:20 v/v; (F) metanol:hidróxido de sódio (0,1%) 80:20 v/v .....	64
Figura 13 - Gráfico de Pareto apresenta as variáveis e suas influências no processo. Linha vertical no diagrama define o nível de 95% de confiança, (L) significa variável linear e (Q) significa variável Quadrática. ....	65
Figura 14 - Superfície de resposta obtida através de análise de bromazepam por HPLC-UV a) volume de solvente e pH; b) sorvente e volume de solvente; c) capacidade de sorção e volume de solvente, d) capacidade de sorção e pH; e) sorvente e pH e f) capacidade de sorção e sorvente. ....	67
Figura 15 – Cromatogramas de bromazepam, carbamazepina, lorazepam, clonazepam e diazepam determinados em HPLC-UV: (a) Amostra de efluente do PA-HUSM isenta dos compostos; (b) Padrão de 3000 ng L <sup>-1</sup> em metanol e (c) Amostra de efluente fortificado com padrões de ansiolíticos e antiepilépticos na concentração de 8000 ng L <sup>-1</sup> .....	69
Figura 16 - Amostra de efluente do PA-HUSM isenta dos compostos.....	70
Figura 17 - Amostra de efluente do PA-HUSM fortificado com um padrão de 5000 ng L <sup>-1</sup> de bromazepam, carbamazepina, clonazepam, lorazepam e diazepam. ....	70
Figura 18 - Padrão de bromazepam, carbamazepina, clonazepam, lorazepam e diazepam (5000 ng L <sup>-1</sup> ) em metanol. ....	71
Figura 19 - Amostra de efluente do PA-HUSM isenta dos compostos determinadas por LC-MS/MS. ....	72
Figura 20 - Amostra de efluente do PA-HUSM fortificado com um padrão de 800 ng L <sup>-1</sup> de bromazepam, carbamazepina, clonazepam, lorazepam e diazepam diluído em metanol. ....	73
Figura 21 - Padrão de: (a) bromazepam, (b) carbamazepina, (c) clonazepam, (d) lorazepam e (e) diazepam (1000 ng L <sup>-1</sup> ) em metanol. ....	74

Figura 22 - Espectro de massas da fragmentação do bromazepam e rota de fragmentação proposta. Infusão do padrão com concentração de padrão de 100 µg L <sup>-1</sup> em metanol. ....	84
Figura 23 - Espectro de massas da fragmentação da carbamazepina e a rota de fragmentação proposta. Infusão do padrão com concentração de padrão de 100 µg L <sup>-1</sup> em metanol. ....	85
Figura 24 - Espectro de massas da fragmentação do clonazepam e a rota de fragmentação proposta. Infusão do padrão com concentração de padrão de 100 µg L <sup>-1</sup> em metanol. ....	86
Figura 25 - Espectro de massas da fragmentação do diazepam e a rota de fragmentação proposta. Infusão do padrão com concentração de padrão de 100 µg L <sup>-1</sup> em metanol. .	87
Figura 26 - Espectro de massas da fragmentação do lorazepam e a rota de fragmentação proposta. ....	88
Figura 27 - Espectro de massas do metabólito 3-hidroxi-bromazepam - <i>m/z</i> 332 e seu fragmento, em amostra de efluente do PA-HUSM. Condição: <i>Enhanced MS</i> + EPI (a) com energia de colisão 20 V e (b) com energia de colisão 60 V. ....	93
Figura 28 - Rota de fragmentação proposta para o metabólito 3-OH-bromazepam. ....	94
Figura 29 - Espectro de massas do metabólito 7-aminoclonazepam <i>m/z</i> 286 e respectivos fragmentos, em amostra efluente PA-HUSM. Condição: <i>Enhanced MS</i> + EPI com CE 20 V. ....	95
Figura 30 - Rota de fragmentação proposta para o metabólito 7 aminoclonazepam. ....	96
Figura 31 - Espectro de massas do metabólito carbamazepina 10,11-epóxido, íon-pai <i>m/z</i> 252 e seus fragmentos em amostra de efluente geral do HUSM. Condição: <i>Enhanced MS</i> + EPI com: (a) fragmentos com CE de 20 V; (b) fragmentos com CE de 40 V e (c) fragmentos com CE de 60 V. ....	97
Figura 32 - Espectro de massas do metabólito carbamazepina 10,11-epóxido, íon-pai <i>m/z</i> 252 e seus fragmentos. Em amostra de efluente PA-HUSM Condição: <i>Enhanced MS</i> + EPI (a) com CE 20 V, (b) com CE 40 V, (c) com CE 60 V. ....	97
Figura 33 - Rota de fragmentação proposta para o metabólito carbamazepina 10,11 epóxido. ....	98
Figura 34 - Espectro de massas do metabólito 10-OH-CBZ e seus fragmentos, em amostra efluente PA-HUSM. Precursor íon 194 + EPI. Condição: <i>Enhanced MS</i> + EPI (a) com energia de colisão 20 V, (b) com energia de colisão 40 V. ....	99
Figura 35 - Rota de fragmentação proposta para o metabólito 10-OH-CBZ. ....	100
Figura 36 - Espectro de massas do metabólito 2-OH-carbamazepina <i>m/z</i> 253 e seus fragmentos, amostra efluente geral HUSM. Condição: <i>Enhanced MS</i> + EPI (a) com energia de colisão 20 V, (b) com energia de colisão 40 V, (c) com energia de colisão 60 V. ....	101
Figura 37 - Rota proposta para a fragmentação do metabólito 2-OH-carbamazepina. .	102
Figura 38 - Espectro de massas do metabólito iminoquinona <i>m/z</i> 207 e seus fragmentos, amostra efluente PA-HUSM. Condição: <i>Enhanced MS</i> + EPI (a) com energia de colisão 20 V; (b) com energia de colisão 40 V. ....	103
Figura 39 - Espectro de massas do metabólito iminoquinona <i>m/z</i> 207 e seus fragmentos, amostra efluente geral-HUSM. Condição: <i>Enhanced MS</i> + EPI (a) com energia de colisão 20 V, (b) com energia de colisão 40 V. ....	103
Figura 40 - Rota proposta para a fragmentação do metabólito iminoquinona. ....	104
Figura 41 - Espectro de massas do metabólito acridona <i>m/z</i> 196 e seus fragmentos, amostra efluente geral HUSM. Condição: <i>Enhanced MS</i> + EPI (a) com energia de colisão 20 V, (b) com energia de colisão 40 V e (c) com energia de colisão 60 V. ....	104
Figura 42 - Rota de fragmentação proposta para o metabólito acridona. ....	105

Figura 43 - Espectro de massas do metabólito nordiazepam $m/z$ 271 e seus fragmentos, amostra efluente geral HUSM. Condição: <i>Enhanced MS+ EPI</i> (a) com energia de colisão 20 V, (b) com energia de colisão 40 V e (c) com energia de colisão 60 V. ....	106
Figura 44 - Rota de fragmentação proposta para o metabólito nordiazepam. ....	107
Figura 45 - Espectro de massas do metabólito oxazepam $m/z$ 287 e seus fragmentos, amostra efluente geral HUSM. Condição: <i>Enhanced MS+ EPI</i> (a) com energia de colisão 20 V, (b) com energia de colisão 40 V, (c) com energia de colisão 60 V. ....	108
Figura 46 - Rota de fragmentação proposta para o metabólito oxazepam. ....	110
Figura 47 - Espectro de massas do metabólito temazepam $m/z$ 301,2 e seus fragmentos, amostra efluente geral HUSM. Precursor íon 154. Condição: <i>Enhanced MS+ EPI</i> (a) com energia de colisão 20 V, (b) com energia de colisão 40 V e (c) com energia de colisão 60 V. ....	110
Figura 48 - Espectro de massas do metabólito temazepam $m/z$ 301 e seus fragmentos, amostra efluente geral HUSM. Condição: <i>Enhanced MS+ EPI</i> (a) com energia de colisão 20 V, (b) com energia de colisão 40 V. ....	111
Figura 49 - Espectro de massas do metabólito temazepam $m/z$ 301 e seus fragmentos, amostra efluente PA-HUSM. Condição: <i>Enhanced MS+ EPI</i> (a) com energia de colisão 20 V, (b) com energia de colisão 40 V e (c) com energia de colisão 60 V. ....	111
Figura 50 - Rota de fragmentação proposta para o metabólito temazepam. ....	112
Figura 51 - Superfície de resposta obtida através de análise de carbamazepina por HPLC-UV a) volume de solvente e pH; b) sorvente e volume de solvente; c) capacidade de sorção e volume de solvente, d) capacidade de sorção e pH; e) sorvente e pH e f) capacidade de sorção e sorvente. ....	134
Figura 52 - Superfície de resposta obtida através de análise de clonazepam por HPLC-UV a) volume de solvente e pH; b) sorvente e volume de solvente; c) capacidade de sorção e volume de solvente, d) capacidade de sorção e pH; e) sorvente e pH e f) capacidade de sorção e sorvente. ....	135
Figura 53 - Superfície de resposta obtida através de análise de lorazepam por HPLC-UV a) volume de solvente e pH; b) sorvente e volume de solvente; c) capacidade de sorção e volume de solvente, d) capacidade de sorção e pH; e) sorvente e pH e f) capacidade de sorção e sorvente. ....	136
Figura 54 - Superfície de resposta obtida através de análise de diazepam por HPLC-UV a) volume de solvente e pH; b) sorvente e volume de solvente; c) capacidade de sorção e volume de solvente, d) capacidade de sorção e pH; e) sorvente e pH e f) capacidade de sorção e sorvente. ....	137
Figura 55 – Perfil da seletividade: curva analítica de bromazepam preparadas com <i>spike</i> na matriz (efluente) e sem matriz (em metanol), utilizando HPLC-UV. ....	138
Figura 56 – Perfil da seletividade: curva analítica de carbamazepina preparadas com <i>spike</i> na matriz (efluente) e sem matriz (em metanol), utilizando HPLC-UV. ....	138
Figura 57 – Perfil da seletividade: curva analítica de clonazepam preparada com <i>spike</i> na matriz (efluente) e sem matriz (em metanol), utilizando HPLC-UV. ....	139
Figura 58 – Perfil da seletividade: curva analítica de diazepam preparadas com <i>spike</i> na matriz (efluente) e sem matriz (em metanol), utilizando HPLC-UV. ....	139
Figura 59 – Perfil da seletividade: curva analítica de lorazepam preparadas com <i>spike</i> na matriz (efluente) e sem matriz (em metanol), utilizando HPLC-UV. ....	140
Figura 60 – Perfil da seletividade: curva analítica de bromazepam preparadas com <i>spike</i> na matriz (efluente) e sem matriz (em metanol), utilizando LC-MS. ....	140
Figura 61 – Perfil da seletividade: curva analítica de carbamazepina preparadas com <i>spike</i> na matriz (efluente) e sem matriz (em metanol), utilizando LC-MS. ....	141
Figura 62 – Perfil da seletividade: curva analítica de clonazepam preparados com <i>Spike</i> na matriz (efluente) e sem matriz (em metanol), utilizando LC-MS. ....	141

Figura 63 – Perfil da seletividade: curva analítica de diazepam preparadas com <i>spike</i> na matriz (efluente) e sem matriz (em metanol), utilizando LC-MS.....	142
Figura 64 – Perfil da seletividade: curva analítica de lorazepm preparadas com <i>spike</i> na matriz (efluente) e sem matriz (em metanol), utilizando LC-MS.....	142
Figura 65 – Perfil da seletividade: curva analítica de bromazepam preparadas com <i>spike</i> na matriz (efluente) e sem matriz (em metanol), utilizando LC-MS/MS. ....	143
Figura 66 – Perfil da seletividade: curva analítica de carbamazepina preparadas com <i>spike</i> na matriz (efluente) e sem matriz (em metanol), utilizando LC-MS/MS.....	143
Figura 67 – Perfil da seletividade: curva analítica de clonazepam preparadas com <i>spike</i> na matriz (efluente) e sem matriz (em metanol), utilizando LC-MS/MS. ....	144
Figura 68 – Perfil da seletividade: curva analítica de diazepam preparadas com <i>spike</i> na matriz (efluente) e sem matriz (em metanol), utilizando LC-MS/MS. ....	144
Figura 69 – Curva analítica de diazepam preparadas com <i>spike</i> na matriz (efluente) e sem matriz (em metanol), utilizando LC-MS/MS. ....	145

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentração média de fármacos medidos no efluente do HUSM – 2006-2012.....	9
Tabela 2 - Ação farmacológica, estruturas químicas e propriedades físico-químicas de ansiolíticos e antiepilépticos.....	16
Tabela 3 – Íon precursor (M+H <sup>+</sup> ) e íon produto (m/z) de ansiolíticos, antiepilépticos e seus metabólitos reportados na literatura. ....	40
Tabela 4 - Concentrações de ansiolíticos e antiepilépticos detectados no meio ambiente, reportadas na literatura. ....	42
Tabela 5 - Concentrações de metabólitos de ansiolíticos e antiepilépticos detectados no meio ambiente, reportadas na literatura.....	43
Tabela 6 – Variáveis e níveis estudados para a otimização da metodologia para a determinação dos fármacos psicoativos por SPE e HPLC-UV. ....	50
Tabela 7 - Composição da fase móvel para determinação de ansiolíticos e antiepilépticos .....	56
Tabela 8 - Concentrações de padrões de ansiolíticos e antiepilépticos utilizados na curva (ng L <sup>-1</sup> ).....	58
Tabela 9 - Concentrações de padrões de ansiolíticos e antiepilépticos utilizados na avaliação dos ensaios de recuperação (ng L <sup>-1</sup> ).....	59
Tabela 10 – Figuras-de-mérito para a validação de ansiolíticos e antiepilépticos no efluente do HUSM, através da determinação por HPLC-UV.....	75
Tabela 11 – Figuras-de-mérito para a validação de ansiolíticos e antiepilépticos no efluente do HUSM, através da determinação por LC-MS. ....	78
Tabela 12 – Figuras-de-mérito para a validação de ansiolíticos e antiepilépticos no efluente do HUSM, através da determinação por LC-MS/MS.....	81
Tabela 13 – Avaliação da linearidade para as curvas na matriz e sem matriz.....	81
Tabela 14 – Íons e fragmentos monitorados para a determinação dos fármacos psicoativos através de LC-MS.....	82
Tabela 15 - Parâmetros da fonte de ionização utilizados para a determinação de ansiolíticos e antiepilépticos por LC-MS/MS.....	82
Tabela 16 - Parâmetros do espectrômetro de massas utilizados na determinação dos analitos.....	83
Tabela 17 – Concentrações ambientais medidas (MEC) médias de ansiolíticos e antiepilépticos determinadas no efluente do Pronto-Atendimento do Hospital Universitário de Santa Maria, no período de 23 a 25/04/2010, através da determinação por HPLC-UV. ....	89
Tabela 18 – Concentrações ambientais medidas (MEC) de ansiolíticos e antiepilépticos no efluente do Pronto-Atendimento do Hospital Universitário de Santa Maria no período de 09 a 11/10/2010, através da determinação por LC-MS.....	89
Tabela 19 – Concentrações ambientais medidas (MEC) de ansiolíticos e antiepilépticos nos dois pontos de coleta, ponto (A) PA-HUSM e ponto (B) efluente geral do Hospital Universitário de Santa Maria, através da determinação por LC-MS/MS. ....	91
Tabela 20 – Comparação das técnicas cromatográficas utilizadas para a determinação de ansiolíticos e antiepilépticos no efluente do HUSM/UFSM. ....	92
Tabela 21 – Íon precursor (M+H <sup>+</sup> ) e Íon produto (m/z) de ansiolíticos, antiepilépticos e seus metabólitos identificados no efluente do PA-HUSM e efluente geral.....	113
Tabela 22 - Concentração ambiental predita (PEC) e o quociente de risco (QR) dos principais ansiolíticos e antiepilépticos usados no HUSM.....	114

Tabela 23 – Ensaio de recuperação e precisão intra-dia de fármacos psicoativos em amostras de efluente hospitalar do HUSM utilizando HPLC-UV (n=7). .....	146
Tabela 24 – Ensaio de recuperação e precisão intra-dia de fármacos psicoativos em amostras de efluente hospitalar do HUSM utilizando LC-MS (n=7). .....	146
Tabela 25 – Ensaio de recuperação e precisão intra-dia de fármacos psicoativos em amostras de efluente hospitalar do HUSM utilizando LC-MS/MS (n=7). .....	146
Tabela 26 – Estudo de reprodutibilidade (Precisão Intermediária – inter-dia) de ansiolíticos e antiepilépticos em amostras de efluente do HUSM utilizando HPLC-UV. ....	147
Tabela 27 – Estudo de reprodutibilidade (Precisão Intermediária – inter-dia) de ansiolíticos e antiepilépticos em amostras de efluente do HUSM utilizando LC-MS. ....	147
Tabela 28 – Estudo de reprodutibilidade (Precisão Intermediária – inter-dia) de ansiolíticos e antiepilépticos em amostras de efluente do HUSM utilizando LC-MS/MS. ....	148

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ESI</b>	– Eletronenulização, do inglês, <i>electrospray ionization</i>
<b>EPI</b>	– do inglês, <i>Enhanced product ion</i>
<b>EMS</b>	– do inglês, <i>Enhanced MS</i>
<b>FIA</b>	– análise de injeção em fluxo, do inglês, <i>Flow injection analysis</i>
<b>HPLC-UV</b>	– Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultra violeta
<b>HUSM</b>	– Hospital Universitário de Santa Maria
<b>LAMIC</b>	– Laboratório de Análises Micotoxicológicas
<b>LATER</b>	– Laboratório de Pesquisa em Tratamento de Efluentes e Resíduos
<b>LC-MS</b>	– Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massa
<b>LC-MS/MS</b>	– Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial
<b>LC-MS/MS_Qtrap</b>	– Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa com ionização por eletronebulização e armadilha de íons
<b>MRM</b>	– monitoramento múltiplo de reações, do inglês, <i>multiple reaction monitoring</i>
<b>m/z</b>	– massa/carga
<b>PA</b>	– Pronto Atendimento
<b>PEC</b>	– (do inglês <i>Predicted Environmental Concentration</i> ) - Concentração Ambiental Prevista
<b>PI</b>	– íon precursor, do inglês, <i>precursor ion</i>
<b>PNEC</b>	– (do inglês <i>Predict No Effect Concentration</i> ) - Concentração Prevista que Não Causa Efeito
<b>QR</b>	– Quociente de Risco
<b>SPE</b>	– extração em fase sólida, do inglês, <i>solid-phase extraction</i>
<b>TIC</b>	– cromatograma de íons total, do inglês, <i>total ion chromatogram</i>
<b>UFSM</b>	– Universidade Federal de Santa Maria
<b>XIC</b>	– cromatograma de íons extraídos, do inglês, <i>extracted ion chromatograms</i>



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	1
2 OBJETIVOS .....	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 Ocorrência de fármacos como contaminantes ambientais.....	4
3.2 Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) no contexto de Efluentes Hospitalares6	
3.3 Legislação sobre resíduos de fármacos no meio ambiente .....	9
3.4- Risco potencial de substâncias ativas no ambiente .....	10
3.5 Fármacos ansiolíticos e antiepilépticos.....	13
3.5.1 Estrutura química, ações farmacológicas e propriedades físico químicas .....	14
3.5.2 Farmacocinética dos ansiolíticos e antiepilépticos.....	17
3.5.3 Efeitos adversos e toxicidade dos ansiolíticos e antiepilépticos.....	24
3.5.4 Ecotoxicidade dos ansiolíticos e antiepilépticos.....	25
3.6 Metodologias para a análise de Fármacos .....	28
3.6.1 Preparação, extração e pré-concentração da amostra .....	28
3.6.1.1 Extração em fase sólida .....	29
3.6.2 Técnicas cromatográficas .....	32
3.6.2.1 Cromatografia Líquida.....	32
3.7 Técnicas hifenadas para determinação de fármacos psicoativos e seus metabólitos37	
3.7.1 Determinação em amostras biológicas .....	37
3.7.2 Determinação em amostras ambientais.....	41
3.8 Validação do método .....	44
3.9 Planejamento fatorial .....	45
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	46
4.1 Materiais .....	46
4.1.1 Aparelhos e acessórios.....	46
4.1.2 Reagentes e Soluções .....	47
4.1.3 Padrões.....	47
4.1.4 Colunas cromatográficas.....	47
4.1.5 Membranas de filtração.....	47
4.1.6 Sorventes para extração em fase sólida .....	48
4.1.7 Amostragem.....	48
4.2 Métodos .....	48
4.2.1 Preparo das soluções padrão .....	48
4.2.2 Determinação de ansiolíticos e antiepilépticos utilizando cromatografia líquida com detecção por UV .....	49
4.2.2.1 Avaliação de sorventes confeccionados <i>home-made</i> para extração em fase sólida.....	49
4.2.2.2 Otimização da metodologia.....	49
4.2.2.3 Quantificação de fármacos psicoativos utilizando HPLC-UV .....	50
d) Determinação da concentração de bromazepam, carbamazepina, clonazepam, lorazepam e diazepam no efluente PA-HUSM por HPLC-UV .....	53
4.2.3 Determinação de ansiolíticos e antiepilépticos utilizando Cromatografia Líquida com espectrometria de massas – LC-MS .....	53
4.2.3.1 Adequação dos parâmetros do espectrômetro de massas para a análise de ansiolíticos e antiepilépticos por LC-MS .....	53
4.2.3.2 Determinação da concentração de bromazepam, carbamazepina, clonazepam, lorazepam e diazepam no efluente PA-HUSM por LC-MS. ....	54

4.2.4 Determinação de ansiolíticos e antiepilépticos utilizando cromatografia líquida com espectrometria de massas – LC-MS/MS.....	54
4.2.4.1 Adequação dos parâmetros do espectrômetro de massas e fonte de ionização	55
4.2.4.2 Fase móvel.....	55
4.2.4.3 Determinação da concentração de bromazepam, carbamazepina, clonazepam, lorazepam e diazepam no efluente do Hospital Universitário por LC-MS/MS.....	56
4.2.4.4 Identificação dos metabólitos de bromazepam, carbamazepina, clonazepam, lorazepam e diazepam.....	56
4.3 Validação do método de determinação de ansiolíticos e antiepilépticos.....	57
4.3.1 Seletividade.....	57
4.3.2 Sensibilidade e linearidade .....	57
4.3.3 Faixa de trabalho e faixa linear de trabalho .....	58
4.3.4 Limite de detecção e limite de quantificação.....	58
4.3.5 Exatidão (Ensaio de recuperação) .....	58
4.3.6 Precisão (repetitividade e precisão intermediária) .....	59
4.3.7 Efeito matriz .....	59
4.4 Avaliação de risco preliminar da exposição de ansiolíticos e antiepilépticos no meio ambiente – caso HUSM .....	60
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	61
5.1 Determinação de ansiolíticos e antiepilépticos utilizando HPLC-UV.....	61
5.1.1 Ensaio Preliminares .....	61
5.1.1.1 Avaliação dos sorvente e a da influência do pH, utilizando a extração em fase sólida.....	61
5.1.1.2 Avaliação da fase móvel e comprimento de onda.....	63
5.1.1.3 Condicionamento do sorvente e escolha do solvente utilizado na eluição da SPE63	
5.1.2 Otimização multivariada feita através de planejamento fatorial .....	65
5.1.3 Superfície de Resposta para a SPE de bromazepam, carbamazepina, clonazepam, diazepam e lorazepam.....	66
5.2 Validação do método analítico .....	68
5.2.1 Seletividade.....	68
5.2.2 Figuras-de-mérito.....	75
5.2.3 Adequação dos parâmetros do espectrômetro de massas e fonte de ionização ...	81
5.3 Determinação da concentração de bromazepam, carbamazepina, clonazepam, diazepam e lorazepam.....	88
5.3.1 Determinação no efluente PA-HUSM por HPLC-UV .....	88
5.3.2 Determinação no efluente PA-HUSM por LC-MS .....	89
5.3.3 Determinação no efluente PA-HUSM e no efluente geral por LC-MS/MS .....	90
5.3.4 Comparação das técnicas utilizadas para a determinação fármacos psicoativos no efluente do HUSM/UFMS.....	91
5.4 Identificação dos metabólitos de bromazepam, carbamazepina, clonazepam, diazepam e lorazepam no efluente do HUSM.....	92
5.4.1 Metabólitos do bromazepam.....	93
5.4.1.1 Metabólito 3-hidroxi-bromazepam.....	93
5.4.2 Metabólitos do clonazepam.....	95
5.4.2.1 Metabólito 7-aminoclonazepam .....	95
5.4.3 Metabólitos da carbamazepina .....	96
5.4.3.1 Carbamazepina 10,11-epóxido .....	96
5.4.3.2 Metabólito 10-dihidro-10,11-dihidroxicarbamazepina.....	99
5.4.3.3 Metabólito 2-Hidróxi-carbamazepina.....	101
5.4.3.4 Iminoquinona.....	102
5.4.3.5 Acridona .....	104

5.4.4 Metabólitos do diazepam .....	105
5.4.4.1 Nordiazepam (N-desmetildiazepam) .....	106
5.4.4.2 Oxazepam.....	108
5.4.4.3 Temazepam .....	110
5.5 Avaliação preliminar do risco de drogas psicoativas no ambiente - o caso do HUSM114	
6 CONCLUSÕES .....	116
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	118
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	119

## 1 INTRODUÇÃO

A água é um bem precioso e cada vez mais tema de debates no mundo todo. O uso irracional e a poluição de fontes deste recurso natural podem ocasionar a falta de água doce potável, caso nenhuma providência seja tomada.

Diariamente, uma grande quantidade de água é utilizada nos hospitais, gerando um alto volume de efluente, sendo uma fonte de liberação incontestável de substâncias químicas e farmacêuticas no seu efluente (GAUTAM *et al.*, 2007; SUAREZ, *et al.*, 2009).

Atualmente, inúmeros contaminantes emergentes são detectados em amostras ambientais, sendo que muitos apresentam persistência como os agrotóxicos, agentes de diagnóstico, fragrâncias, fármacos, produtos de cuidado pessoal, esteróides e muitos outros compostos (KOT-WASIK *et al.*, 2007; ZHANG & ZHOU, 2007).

Milhares de toneladas de fármacos são utilizados, anualmente, com diferentes finalidades, tanto de uso em humanos quanto para uso veterinário, aumentando a preocupação sobre a presença de compostos farmacêuticos no meio ambiente, principalmente, devido aos seus potenciais riscos para o meio aquático. (SANTOS *et al.*, 2007).

Foram feitas inúmeras investigações sobre a presença de compostos farmacêuticos no ambiente aquático em diversos países. Uma grande quantidade de fármacos e, também seus metabólitos, até o nível de traços ( $\text{ng L}^{-1}$  ou  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) foram detectados em amostras de efluentes, águas de superfície, subterrâneas e até mesmo em amostras de água potável (SHUCARA, 2007; CALISTO *et al.*, 2011).

Os benzodiazepínicos são fármacos psicoativos amplamente utilizados no tratamento da ansiedade. Estes compostos atuam no Sistema Nervoso Central (SNC) como ansiolíticos, hipnóticos, anticonvulsivantes e relaxantes musculares (GOODMAN & GILMAN, 2010; COELHO *et al.*, 2009; LIMA, 2009).

Apesar da crescente preocupação relacionada ao tratamento do esgoto hospitalar, pouca atenção tem sido dada à geração deste efluente em hospitais, laboratórios médicos de pesquisa e instituições de saúde em geral (GAUTAM, *et al.*, 2007; SUAREZ, *et al.*, 2009).

Alguns fármacos mostram ação de persistência no meio ambiente, pois mesmo se os compostos forem degradados, eles são continuamente introduzidos (RADJENOVIC *et al.*, 2007). Existem relatos na literatura sobre a ocorrência de

efluentes que continham fármacos parcialmente metabolizados, que não sendo tratados corretamente, podem ocasionar um desequilíbrio ambiental (GAUTAM *et al.*, 2007).

A ocorrência de fármacos residuais no meio ambiente pode gerar efeitos adversos em organismos aquáticos e terrestres. O efeito pode ser em qualquer nível da hierarquia biológica: célula – órgãos – organismo – população – ecossistema. Alguns desses efeitos podem ser observados em concentrações na ordem de  $\text{ng L}^{-1}$  (SHUCARA, 2007).

No Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), a situação é semelhante a maioria dos estabelecimentos de saúde pública brasileiros. Os efluentes gerados no HUSM – especialmente, aqui, na ala sul do hospital – passam por tratamento em fossa séptica e filtro anaeróbio, que, juntamente com outros efluentes precariamente tratados, são lançados em curso d'água que passa pelo Campus da UFSM e, que, por fim, deságuam em arroio pertencente à sub-bacia hidrográfica do rio Vacacaí-Mirim (FRANCK, 2008).

Assim, há uma necessidade de desenvolvimento de métodos analíticos que possam identificar e quantificar, entre outros tantos, ansiolíticos e antiepilépticos no efluente hospitalar, e que permitam uma avaliação preliminar do risco para a saúde pública e ambiental.

Outra finalidade deste estudo foi a identificação de metabólitos destes fármacos no efluente hospitalar do HUSM: tal investigação é de extrema importância dada a grande escassez de dados sobre a ocorrência e os efeitos destas substâncias e de seus possíveis metabólitos no meio ambiente em geral.

## 2 OBJETIVOS

O objetivo principal do presente estudo foi o desenvolvimento de metodologia avançada para quantificar a presença de ansiolíticos e antiepilépticos, bem como identificar possíveis metabólitos no efluente geral e no efluente do pronto atendimento do Hospital Universitário da UFSM. Outro objetivo foi a proposição de rotas de fragmentação dos compostos e de seus metabólitos.

Os objetivos específicos desta investigação foram:

- Desenvolvimento e avaliação de metodologia analítica de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta (LC-UV), cromatografia líquida de alta eficiência assistida por espectrometria de massas (LC-MS) e cromatografia líquida assistida por espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS), para a determinação de ansiolíticos e antiepilépticos (bromazepam, carbamazepina, clonazepam, lorazepam e diazepam) no efluente hospitalar do HUSM/UFSM;
- Avaliar diferentes sorventes para extração em fase sólida de ansiolíticos e antiepilépticos do efluente hospitalar;
- Conduzir avaliação preliminar do risco gerado pelo descarte do efluente hospitalar contendo estes fármacos psicoativos para a saúde pública e ambiental.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Ocorrência de fármacos como contaminantes ambientais

Além dos contaminantes prioritários convencionais (compostos carcinogênicos) existem outros agentes tóxicos que manifestam persistência no meio ambiente, como os microcontaminantes (fármacos, pesticidas, metais tóxicos e hidrocarbonetos polinucleares), que vêm sendo investigados em amostras ambientais (VERENITCH *et al.*, 2006). Neste contexto, o Brasil, junto com os Estados Unidos, França e Alemanha, constituem os maiores consumidores de medicamentos do mundo (PEDROSO, 2007).

Os fármacos vêm recebendo atenção especial em pesquisas ambientais, pois, a contaminação provocada por esta classe de compostos é um fenômeno complexo (BOUND & VOULVOULIS, 2004; RODRIGUEZ-MOZAZ *et al.*, 2007). A poluição originada por fármacos tem sua complexidade fundamentada no grande número de moléculas de vários grupos terapêuticos, com diferentes propriedades físico-químicas, estruturas químicas, ação ambiental e muitas vezes de natureza persistente (TERNES, 2001; CASTIGLIONI *et al.*, 2004).

Mesmo assim, o impacto de resíduos farmacêuticos no ambiente aquático não recebe a atenção que merece, os dados existentes são insuficientes - sobre ecotoxicologia, biodegradação, toxicidade e destino no meio ambiente, não permitindo ilações sobre o modo de ação típico destas substâncias biologicamente ativas (HALLING-SORENSEN *et al.*, 1998; JONES *et al.*, 2004).

Recentemente, o monitoramento de fármacos residuais no meio ambiente aquático vem ganhando grande interesse devido ao fato de muitas dessas substâncias serem frequentemente encontradas em efluentes de Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs) em concentrações na faixa de  $\mu\text{g L}^{-1}$  e  $\text{ng L}^{-1}$  (SHUCARA, 2007).

Após a administração, aproximadamente 70% dos fármacos são excretados para o esgoto doméstico, sendo na atualidade motivo de grande preocupação devido a sua persistência no ambiente, que muitas vezes pode resultar em elevada toxicidade à biota aquática (TERNES *et al.*, 2001; ROQUE, 2009). Os processos de tratamento convencionais de água, na maioria das vezes, não conseguem remover completamente os resíduos fármacos (TERNES *et al.*, 2001).

As fontes de contaminação da água por fármacos são inúmeras, e a maior preocupação é com os efeitos que causam ao meio ambiente (PEDROSO, 2007). Após o consumo, os compostos ativos são, na maioria das vezes, parcial ou completamente metabolizados e convertidos em metabólitos hidrofílicos. Entretanto, uma significativa quantidade dessas substâncias é excretada na urina (COSTA, 2009). As drogas usadas na medicina humana são excretadas via fezes e urina ligeiramente transformadas em glucuronídeos e sulfatos ou mesmo inalteradas (CLARA *et al.*, 2004).

A Figura 1 mostra as rotas de exposição de fármacos ao meio ambiente. A rota de entrada de fármacos no ambiente aquático, mais significativa, é através de estações de tratamento de esgoto (ETE). Quando o esgoto é encaminhado para a ETEs, os fármacos podem ser biodegradados, degradados parcialmente ou, ainda, permanecerem inalterados, contaminando o meio ambiente através de uma variedade de caminhos (SUCHARA, 2007).

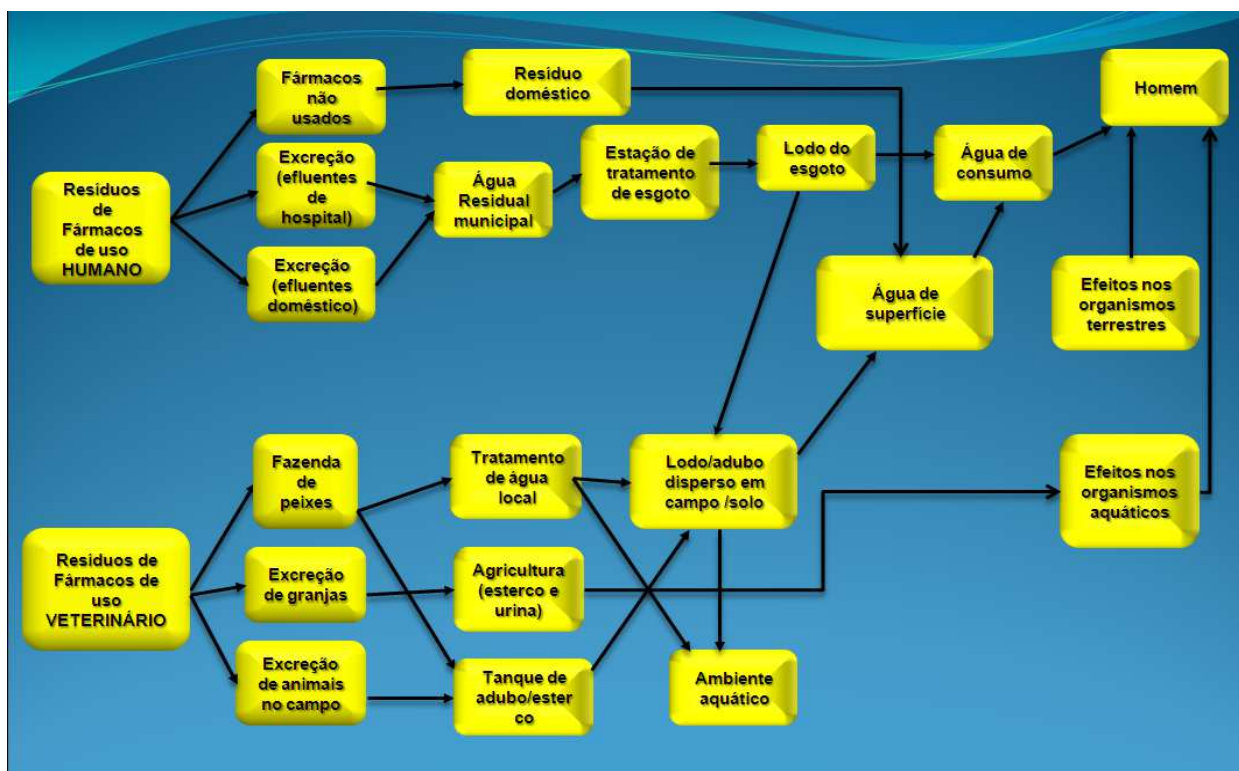


Figura 1 - Possíveis rotas de contaminação do meio ambiente com fármacos. (Fonte: Adaptado de Suchara, 2007)

Em estudos reportados na literatura, a carbamazepina foi detectada em concentrações na faixa de 0,02 a 0,55  $\mu\text{g L}^{-1}$  em efluentes tratados (PALMER *et al.*, 2008). Este composto também foi identificado em efluente hospitalar da cidade de Almeria na Espanha (GÓMEZ *et al.*, 2006) e outros países europeus, como França,



Itália, Grécia e Suécia (ANDREOZZI *et al.*, 2003). Foram encontrados resíduos deste fármaco em águas de abastecimento, rios e lagos em vários países da Europa (TERNES, 1998). Segundo Tixier *et al.* (2003), a carbamazepina apresenta altas concentrações quando comparadas às outras drogas presentes em matrizes ambientais.

Huerta-Fontela *et al.* (2010) elaboraram metodologia para a determinação rápida de multi-resíduos de fármacos de diferentes classes terapêuticas e seus metabólitos em amostras de afluentes e efluentes da região da Catalunha (Espanha). Foram determinados resíduos de ansiolíticos e antiepilépticos: bromazepam (afluente: 0,79-3,66  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; efluente: 0,10-15,54  $\mu\text{g L}^{-1}$ ); carbamazepina (afluente: 0,03-0,11  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; efluente: 0,004-0,17  $\mu\text{g L}^{-1}$ ); lorazepam (afluente: 0,04-0,50  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; efluente: 0,004-0,53  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e diazepam (afluente: 0,05  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Também foram detectados metabólitos, carbamazepina epóxido (afluente: 0,19-4,03  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; efluente: 0,07-2,38  $\mu\text{g L}^{-1}$ ); para oxazepam (afluente: 0,02-1,22  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; efluente: 0,03-0,32  $\mu\text{g L}^{-1}$ ).

### **3.2 Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) no contexto de Efluentes Hospitalares**

De acordo com Kumar *et al.* (2007), os hospitais são uma fonte de resíduos de fármacos que, geralmente, são descartados para o meio ambiente, e os seus efeitos para a saúde humana e ambiental são pouco conhecidos. Segundo a portaria 306/2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o descarte dos efluentes sanitários hospitalares pode ser feito na rede de esgotos, ou em corpo receptor, desde que atendam respectivamente as diretrizes estabelecidas pelos órgãos ambientais, gestores de recursos hídricos e de saneamento, competentes (ANVISA, 2004).

O HUSM dispõe de 291 leitos na Unidade de Internação e 37 leitos da Unidade de Tratamento Intensivo, além de salas de ambulatórios, salas de atendimento de emergência, Centro Cirúrgico e Obstétrico. Sua equipe de trabalho é composta, em média, por 2296 pessoas (médicos, enfermeiras, professores, servidores, residentes e estagiários), tendo uma abrangência regional de 112 cidades, somando-se a população de aproximadamente 3 milhões de habitantes (<http://www.husm.ufsm.br>).

O Hospital Universitário realiza o tratamento das águas servidas geradas através de um sistema dotado de fossa séptica conjugada com filtro anaeróbio (Figura 2); logo após, este resíduo tratado é descartado em um curso d'água que passa pelo Campus da UFSM (WILDE, 2011).

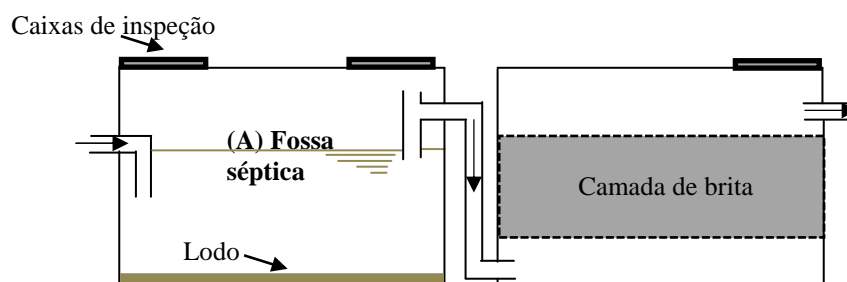


Figura 2 - Representação esquemática de (A) um sistema de fossa séptica conjugada de (B) filtro anaeróbio, adotado no tratamento de efluentes do HUSM. (Fonte: Adaptado de Wilde, 2011).

O sistema de saneamento do HUSM é composto por vários locais para o lançamento do esgoto tratado, em corpo receptor (córrego ou curso d'água), onde as amostragens do presente estudo foram feitas (Figura 3 – Ponto A e B). O ponto A designado “Efluente do PA” (Figura 3.a) compreende os esgotos lançados por essa unidade de emergência acrescidos dos efluentes da ala sul do hospital, enquanto que, o ponto nomeado “Efluente Geral” (Figura 3.b) contém a maior parte do esgoto lançado pelo HUSM; contudo, esse ponto recebe ainda, adicionalmente, o esgoto gerado pela biblioteca central da UFSM. Na Figura 3.c está demonstrado um esquema do sistema de tratamento e os pontos de coleta do efluente do HUSM. O efluente do PA é o ponto mais problemático e mais estudado, até o presente momento. (WILDE, 2011).

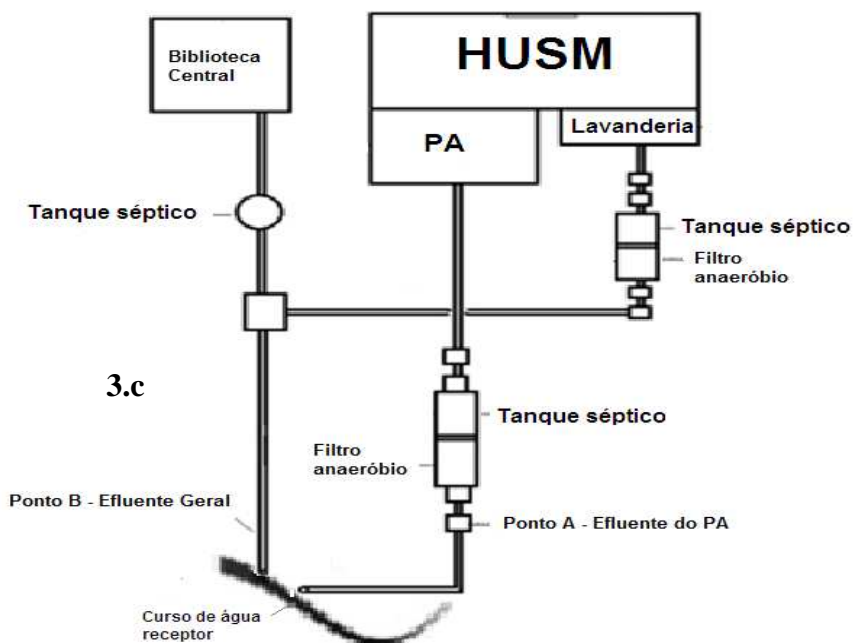
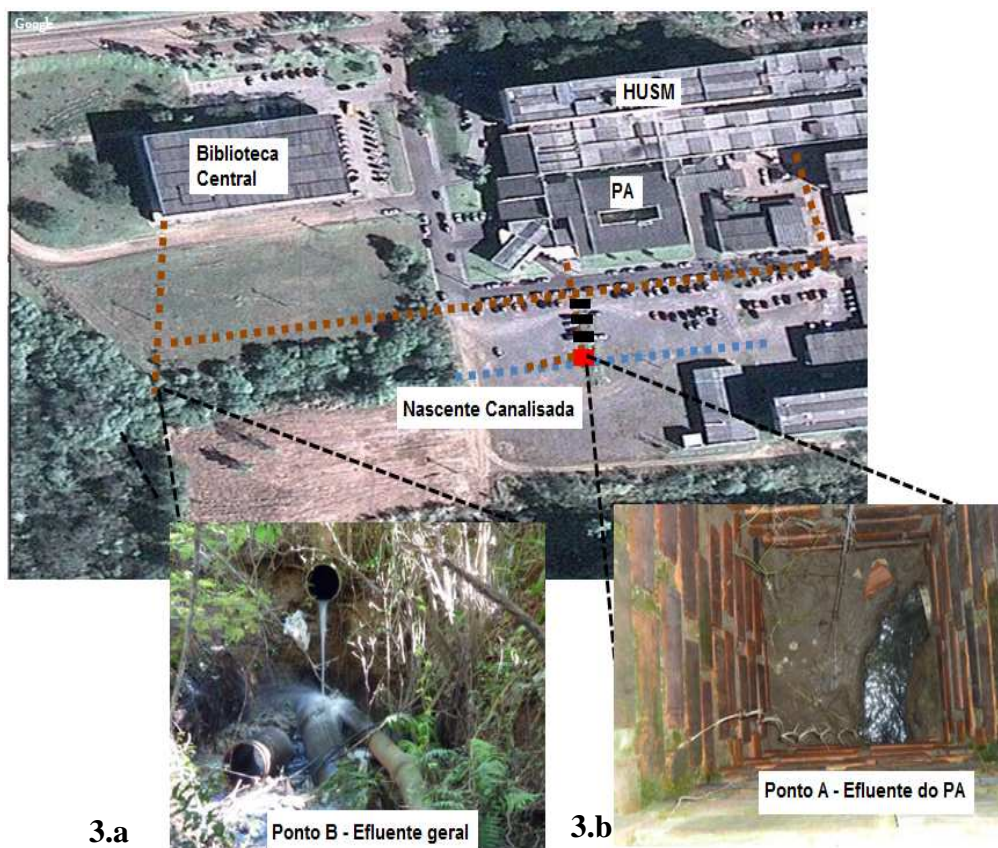


Figura 3 – Esquema ilustrativo do sistema de esgotos do HUSM e os pontos de coleta de efluente: 3.a - Ponto B - Efluente Geral; 3.b - Ponto A – Efluente do Pronto atendimento e 3.c – Representação esquemática do sistema de saneamento do HUSM/UFMS. (Fonte da foto aérea: Adaptado de Google, Wilde, 2011).

O grupo de pesquisas do LATER (Laboratório de Pesquisa em Tratamento de Efluentes e Resíduos) da UFSM tem realizado estudos sobre a problemática do lançamento de resíduos de fármacos no efluente do HUSM e potenciais soluções têm sido reportadas (MARTINS *et al.*, 2008; MARTINS *et al.*, 2009; MARTINS *et al.*, 2011; BRENNER *et al.*, 2011; WILDE, 2011; MINETTO *et al.*, 2012). Na Tabela 1 estão as concentrações médias de fármacos medidos no efluente do HUSM analisados pelo LATER de 2006-2012. Todavia, ainda não foi dada a merecida atenção ao problema, até agora, pelos órgãos competentes.

Tabela 1 – Concentração média de fármacos medidos no efluente do HUSM – 2006-2012.

Fármacos	Consumo anual (kg)	Técnica analítica	Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	*PEC/PNEC
Amoxicilina	5,810	SPE +HPLC-UV	27,0	>1
Atenolol	0,095	SPE +HPLC-FLD	1,38-4,48	0,27
Propranolol	0,172	SPE +HPLC-FLD	0,00-1,63	4,25
Metoprolol	0,072	SPE +HPLC-FLD	1,37-9,93	>1
Ciprofloxacina	1,67	SPE +HPLC-DAD LC-MS/MS_QTRAP	21,0	1,98-4,0
Cefazolina	2,5	SPE +HPLC-DAD LC-MS/MS_QTRAP	Somente metabólitos	-----
Ceftazidima	3,0	SPE +HPLC-DAD LC-MS/MS_QTRAP	Somente metabólitos	-----
Diclofenaco	0,025	SPE +HPLC-DAD	1,7	17,7
Dexametazona	2,508	SPE +HPLC-DAD	2,63	-----
Nonilfenol	-----	SPE +HPLC-DAD	916	>1
Etoxilado	-----	SPE +HPLC-UV	----	>1
Nonilfenol	-----	SPE +HPLC-UV	----	>1
Sulfametoxazol	5,41	LC-MS/MS_QTRAP	27,8	11,4
Trimetoprima	----	LC-MS/MS_QTRAP	6,65	<1
Acetato de Ciproterona	0,17	SPE +HPLC-DAD	2,2	----
Flutamina	0,45	SPE +HPLC-DAD	9,0	----
Citrato de Tamoxifeno	1,56	SPE +HPLC-DAD	0,0	----
Espironolactona	0,335	SPE +HPLC-DAD	4,0	----

Fonte: Dados fornecidos pelo LATER/UFSM (2012).

\*PEC - Concentração Ambiental Prevista; PNEC - Concentração Prevista que Não Causa Efeito.

### 3.3 Legislação sobre resíduos de fármacos no meio ambiente

Como os riscos gerados pelos contaminantes emergentes ainda são pouco conhecidos, as normas que regulam sua emissão para o meio ambiente são praticamente inexistentes (COSTA, 2009).

Em 1998, o FDA (do inglês *Food and Drug Administration*) publicou um guia – “*Guidance for Industry: Environmental Assessment of Human Drug and Biologics*

**Applications**” que fornece informações sobre quando se deve fazer uma avaliação do risco ambiental e como preparar estas avaliações (PEDROSO, 2007).

A União Européia (EU) possui normas de avaliação de risco ambiental para produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PCPS - **Pharmaceutical and Personal Care Products**) e desreguladores endócrinos. Nesta regulamentação consta que produtos farmacêuticos ativos devem passar por avaliações de toxicidade crônica. A EU possui também uma diretriz, que estabelece níveis seguros de concentrações farmacêuticas de uso veterinário no meio ambiente, não devendo exceder de  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$  no solo e  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$  em efluentes (COSTA, 2009). Na Holanda, Muller *et al.* (2002) propuseram limites toxicológicos para 13 fármacos em água potável, e recomendam limite de  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  para carbamazepina.

O Brasil não possui legislação sobre limites toxicológicos para fármacos, somente a norma RDC N° 306, de 7 de dezembro de 2004 da ANVISA. Estas normas são compostas pelo Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde e pela Resolução N° 358, de 29 de abril de 2005 (Ministério do Meio Ambiente, 2005) que dispõe sobre o tratamento e a disposição final dos resíduos (EICKHOFF *et al.*, 2009).

A resolução n° 129/2006 do Conselho Estadual de Meio Ambiente – CONSEMA, da Secretaria do Meio Ambiente do Estado do Rio Grande do Sul, dispõe sobre a definição de critérios e padrões de emissão para a toxicidade de efluentes líquidos lançados em águas superficiais no Estado do Rio Grande do Sul. Esta resolução aplica-se quando a vazão máxima de lançamento do efluente da fonte geradora for igual ou superior  $10.000 \text{ m}^3 \text{ dia}^{-1}$ , não sendo permitido o lançamento de efluentes líquidos de novas fontes poluidoras em ampliação com acréscimo de vazão em corpos d’água intermitentes ou com interrupção de vazão (PEDROSO, 2007).

### **3.4- Risco potencial de substâncias ativas no ambiente**

A avaliação do potencial de risco ambiental baseia-se em dados como consumo, características físico-químicas, entre outros. A finalidade de realizar uma avaliação do risco ambiental é prever a possível contaminação no meio ambiente. A Agência Européia de Avaliação de Medicamentos (EMA) propôs metodologias para a avaliação do risco ambiental de determinada substância (EMA, 2006). Substâncias que apresentam um aumento em sua exposição ambiental são incluídas no grupo de

substâncias com potencial risco ambiental (JENSEN *et al.*, 2007; GRUNG *et al.*, 2008; BLASER *et al.*, 2008; DOMENE *et al.*, 2008).

Os estudos de impacto ambiental avaliam potenciais efeitos negativos sobre peixes, *dáfnias* (microcrustáceos que atuam como consumidores primários na cadeia alimentar aquática), algas, bactérias, vermes terrestres, plantas e invertebrados presentes. Estas análises utilizam testes padronizados para a avaliação da ecotoxicidade, verificando os efeitos de curto prazo, utilizando predominantemente a mortalidade como ponto final. Porém, estes testes não determinam a cronicidade destes efeitos que, em condições reais, devem incluir a exposição destes organismos a diferentes xenobióticos durante período de tempo muito mais prolongado que o considerado nestes estudos. Outro fator também a ser considerado é o efeito resultante da interação entre vários destes compostos (MARQUES, 2008).

Conforme a EMEA, (2006), a avaliação do risco potencial ao ambiente apresenta três fases. A fase I compreende a Concentração Ambiental Prevista (PEC, do inglês *Predicted Environmental Concentration*); avalia teoricamente a quantidade de fármaco lançado no meio ambiente de acordo com seu uso e exposição. O limite de ação desta fase é a concentração de  $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$ , ou seja, se o fármaco apresenta uma concentração abaixo deste limite, este fármaco não apresenta risco ao meio ambiente.

Quando o PEC for maior ou igual a  $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$ , o fármaco passa então para a segunda fase e são realizados estudos de toxicidade, destino e efeitos no meio ambiente (EMEA, 2006). A fase II consiste em informações sobre o destino e os efeitos no ambiente (fornece dados de concentração diária do fármaco, taxas de excreção humana e taxas de remoção em sistemas de tratamento) e, a fase III, avalia o comportamento específico e o risco (EMEA, 2006).

Conforme a revisão feita por Arsand (2010), o valor para PEC é estimado, e restrito a ambientes aquáticos. Pode, também, guiar o estudo de fármacos como contaminantes emergentes. Através deste cálculo podem-se tomar decisões sobre quais fármacos prioritários devem ser estudados e qual ação deve ser posta em prática para diminuir o seu potencial risco como contaminante. O PEC pode, então, ser calculado segundo a Equação 1.

$$PEC_{convencional} = \frac{A.(100 - R)g}{(365.P.V.D.100)} [gL^{-1}] \quad (1)$$

Onde:

“A” é a quantidade (kg) da substância utilizada por ano na população estudada;

“R” (%) são as rotas de remoção da substância em questão através de processos como absorção, volatilização, hidrólise e outros processos;

“P” é o número de habitantes em questão;

“V” é o volume (m<sup>3</sup>) de efluente gerado per capita (geralmente entre 0,15 e 0,30 m<sup>3</sup> dia<sup>-1</sup>);

“D” é o fator de diluição utilizado para efluentes para águas superficiais.

Para avaliar o Quociente de Risco (QR) é considerada a Concentração Prevista que Não Causa Efeito (PNEC, do inglês *Predict No Effect Concentration*) no meio ambiente, sendo este um índice aceito para a avaliação de risco de uma substância. O PNEC é derivado do menor valor da toxicidade aguda (LC<sub>50</sub>, EC<sub>50</sub> ou IC<sub>50</sub>) dividido por fator de 1000 (HERNANDO *et al.*, 2006). O QR tem como valor limite 1; quando exceder a 1, há indicação de risco ecotoxicológico. Quando se usam dados de toxicidade crônica, ou seja, Concentração de Efeito Não Observado (NOEC, do inglês *Non-Observed-Effects Concentration*), o valor de QR limite é de 10 (CARLSSON *et al.*, 2006).

Foi proposto o uso da Concentração Ambiental Mensurada (MEC, do inglês *Measured Environmental Concentration*) para o cálculo de QR, sendo utilizado como critério para a avaliação de risco que o QR seja < 0,1 como mínimo risco para organismos aquáticos, 0,1 ≤ QR < 1 risco médio e QR ≥ 1 risco alto (HERNANDO *et al.*, 2006).

Conforme Wilde, 2011 as seguintes situações foram admitidas: (1) todo o fármaco receitado foi usado para o tratamento no hospital; (2) a fração de fármacos excretada foi lançada no sistema de esgotos; (3) sem transformações dos fármacos após a excreção no sistema de esgotos e (4) o padrão de uso foi distribuído uniformemente temporal e espacialmente.

De acordo com Escher *et al.* (2010), para o estudo de um caso específico como de um hospital, a Equação 1 pode ser reduzida para a Equação 2.

$$PEC_{Efl.} = \frac{A \cdot E}{V_{Efl.} \cdot 365} \quad (2)$$

Onde:

$PEC_{Efl.}$  é a concentração prevista no efluente (g L<sup>-1</sup>);

A – é o quantidade do fármaco consumido no hospital (g),

E- é a fração excretada na urina e nas fezes;

$V_{Efl}$  - É a quantidade de efluente lançado por dia ( $L \text{ dia}^{-1}$ ).

De acordo com a revisão de Arsand (2010), o valor para PNEC é obtido experimentalmente através de metodologia prevista pela Comissão Europeia (EU TGD, 2003-a). Este valor estima qual a concentração em que uma substância pode ser encontrada no ambiente sem trazer perigo a este meio.

Autores como Blaser *et al.* (2008) utilizaram a mesma metodologia para avaliar o risco de toxicidade de prata utilizada em materiais nano-funcionalizados obtendo resultados satisfatórios. Desta forma, confirmando que esta metodologia pode não somente ser utilizada para estimar o risco ambiental de fármacos e substâncias orgânicas ativas.

O uso da predição da concentração no ambiente e a avaliação da existência de risco, por meio desta metodologia, tem se mostrado eficiente, uma vez que possibilita uma avaliação com segurança (GRUNG *et al.*, 2008).

### **3.5 Fármacos ansiolíticos e antiepilépticos**

A ansiedade e a insônia são consideradas como respostas normais do organismo diante de situações de perigo real e constitui um sinal de alarme, portanto, mecanismo essencial para a defesa e a sobrevivência do indivíduo e da própria espécie (CORDIOLI, 2000; ABRAHAN, 2003).

A epilepsia é um distúrbio cerebral crônico de diversas etiologias, associadas a descargas excessivas dos neurotransmissores. Os sintomas podem variar desde uma perda da consciência de poucos segundos até crises complexas de duração prolongada (CARPENTER *et al.*, 2002; KLIEMANN & MONTE, 2004; NETO & MARCHETTI, 2005; MARCHETTI *et al.*, 2005).

Ansiolíticos são fármacos capazes de reduzir a ansiedade, com pouco ou nenhum efeito, sobre as funções motoras ou mentais. Podem produzir sonolência e estimular o início e a manutenção de um estado de sono (SILVA, 2006).

Antiepilépticos, mais comumente chamados de anticonvulsivantes são fármacos que deprimem seletivamente o SNC. Sua principal aplicação está na supressão de crises, acessos ou ataques epiléticos sem causar dano ao SNC nem depressão respiratória (KLIEMANN & MONTE, 2004).



### 3.5.1 Estrutura química, ações farmacológicas e propriedades físico químicas

Os fármacos mais utilizados para o tratamento da ansiedade são os benzodiazepínicos por apresentarem eficácia no tratamento da ansiedade, relativa seletividade de efeitos, baixa toxicidade e menor capacidade de provocar dependência. Têm também efeitos de relaxante muscular, anticonvulsivantes e sedativos (LIMA, 2009).

A estrutura química básica dos benzodiazepínicos (Figura 4) possui um anel incomum com sete (7) átomos (anel diazepínico) unidos a um anel aromático, e também os quatro grupos principais substituídos, que podem ser modificados sem perda da atividade (GODDMAN & GILMAN, 2010).

Em função da meia vida de excreção podem ser classificados em três grupos (LARINI, 1997):

- Compostos de ação ultracurta, com meia vida menor que 10 h (ex.: Triazolam = 1,7 a 3 h; Midazolam 2 a 5 h e Temazepam = 10 h);
- Compostos de ação curta com meia vida de 10 a 24 h (ex.: Oxazepam e Lorazepam);
- Compostos de ação longa com tempo de meia vida maior que 24 h (ex.: Diazepam = 24 a 50 h, Flurazepam = 50 a 100 h, Prazepam = 26 a 200 h)

Para uma maior atividade ansiolítica, os benzodiazepínicos devem ter as seguintes características:

- (a) grupo metila ligado ao átomo de nitrogênio na posição 1;
- (b) grupo extrator de elétrons, como Cl, NO ou C, F, na posição 7.

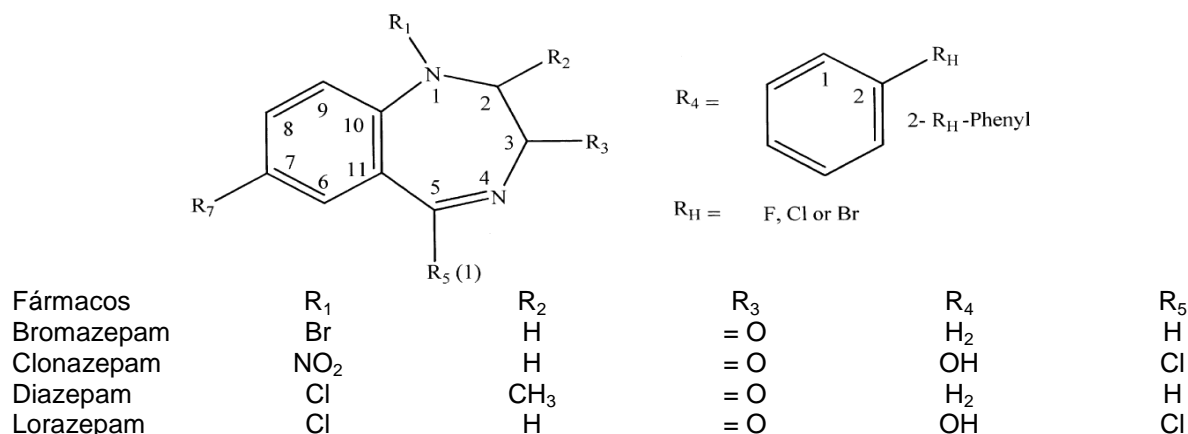


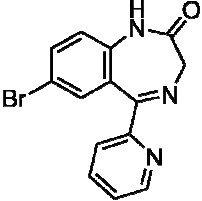
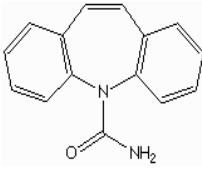
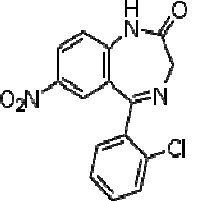
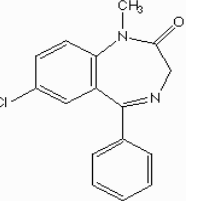
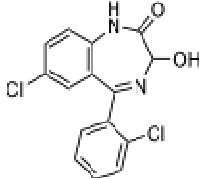
Figura 4 - Estrutura geral dos benzodiazepínicos. (Fonte: Adaptado de Borges *et al.*, 2009)

A carbamazepina é um antiepilético, do grupo dos Iminostilbenos, que apresenta estrutura química similar a dos antidepressivos tricíclicos. Apresenta um núcleo tricíclico iminodibenzóico, com um grupo carbamoil na posição 5, o qual é essencial para a atividade anticonvulsivante (KUBOVA & MARES, 1993; MOSTARDEIRO, 2001; CARUSO *et al.*, 2002).

A Tabela 2 apresenta a estrutura química dos ansiolíticos e antiepiléticos, suas principais ações farmacológicas e propriedades físico-químicas.

As propriedades físico-químicas (solubilidade em água, polaridade e volatilidade) influenciam o comportamento e o destino de um composto no ambiente, sendo que estas propriedades são características de cada composto. Outros fatores que também exercem influência são o grupo funcional e as propriedades ácido-bases (CUNHA, 2005).

Tabela 2 - Ação farmacológica, estruturas químicas e propriedades físico-químicas de ansiolíticos e antiepiléticos

FÁRMACOS					
Propriedade	Bromazepam	Carbamazepina	Clonazepam	Diazepam	Lorazepam
Fórmula molecular	$C_{14}H_{10}BrN_3O$	$C_{15}H_{12}N_2O$	$C_{15}H_{10}ClN_3O_3$	$C_{16}H_{13}N_2ClO$	$C_{15}H_{10}N_2Cl_2O_2$
Estrutura química					
Nomenclatura oficial IUPAC	7-bromo-1,3-diidro-5-(2-piridil)-2H-1,4-benzodiazepina-2-ona	5H-Dibenzo [b,f] azepina 5-carboxamida	5-(2-Clorofenil)-1,3- diidro-7-nitro-2H-1,4 benzodiazepina -2-(H)ona	7- Cloro-1,3-dihidro-1-metil-5-fenil-2H-1,4-benzodiazepina-2-ona .	7-cloro-5-(2-clorofenil)-1,3-diidro-3-hidroxi-2H-1,4-benzodiazepina-2-ona
Peso molecular ( $g\ mol^{-1}$ )	316,15	236,72	315,72	284,74	321,15
CAS N°	1812-30-2	298-46-4	1622-61-3	1622-61-3	846-49-1
pKa	2,90	2,3 (grupo cetona)* 13,9 (grupo amina)	1,50	3,3	1,30
Coeficiente de partição octanol-água ( $\log_{k_{ow}}$ )	1,7	2,45	2,4	3,0	2,4
Nome Comercial	Lexotan	Tegretol	Rivotril	Valium	Lorax
Ações farmacológicas	Ansiolítico, Hipnótico; relaxante neuromuscular-esquelético, sedativo.	Antiepilético, analgésico, desvios comportamentais e emocionais no epiléptico, relaxante neuromuscular-esquelético, sedativo, doença bipolar.	Ansiolítico, analgésico tratamento da Síndrome do Pânico, insônia, tratamento da epilepsia, antidepressivo.	Ansiolítico, hipnótico, tratamento ansiedade e insônia, relaxante neuromuscular-esquelético; sedativo, antiepilético.	Ansiolítico, analgésico tratamento da insônia, antiepilético.
Excreção como composto inalterado (%)	84,0	20,0-30,0	90,0	70,0	90,0
Consumo HUSM/2010 (g), fornecido pelo setor de farmácia-HUSM)	6,0	1500,0	14,0	178,0	5,0

Fonte: Korolkovas & Burckhalter, 1988; Kubova & Mares, 1993; Mostardeiro, 2001; Caruso *et al.*, 2002; Gehlen, 2003; Moreno *et al.*, 2004; Rouini *et al.*, 2008; Steentoft *et al.*, 2009, \*Punyapalakul & Sitthisorn, 2010, Goodman & Gilman, 2010.

A avaliação da interação dos compostos com o meio no que diz respeito à absorção, transporte e polaridade da molécula é feito através do coeficiente de partição octanol-água ( $\log K_{ow}$ ), que é uma medida de lipofilicidade de um composto. A lipofilicidade é definida como a razão da concentração do composto, no equilíbrio, após a dissolução em um sistema de duas fases, formadas por dois solventes imiscíveis: água e 1-octanol. Como regra geral, os compostos não polares têm  $K_{ow}$  acima de 4 ou 5 e os polares possuem valores inferiores a 1-1,5, e entre estes encontramos os compostos moderadamente polares (CUNHA, 2005).

### **3.5.2 Farmacocinética dos ansiolíticos e antiepilépticos**

Na farmacocinética dos benzodiazepínicos é essencial não se considerar apenas a cinética do fármaco, mas também a dos metabólitos ativos, que possuem características próprias. É importante fazer esta análise, pois algumas vezes os níveis de metabólitos ativos são mais elevados do que o composto inicialmente administrado (FERRAZ, 2010).

As propriedades farmacocinéticas da carbamazepina são influenciadas pela pouca solubilidade em água e pela capacidade de aumentar a conversão em metabólitos ativos, através das enzimas oxidativas hepáticas (GOODMAN & GILMAN, 2010).

#### **Absorção**

A velocidade de absorção de um determinado fármaco e o conseqüente aparecimento de substâncias ativas no sangue são fatores determinantes da intensidade da sua ação. Os fármacos deste grupo terapêutico, utilizados essencialmente como ansiolíticos e hipnótico-sedativos, são administrados na maioria dos casos por via oral, e são, geralmente, bem absorvidos (FERRAZ, 2010).

Os benzodiazepínicos geralmente são absorvidos pelo trato gastrointestinal, porém outras vias podem ser utilizadas: intramuscular (absorção lenta), intravenosa e retal (OGA, 2003; GOODMAN & GILMAN, 2010).

O diazepam é rapidamente absorvido após a administração oral, atingindo a concentração plasmática máxima após 30 - 90 minutos. O clonazepam é rapidamente absorvido por via gastro-intestinal e as concentrações plasmáticas máximas são

alcançadas dentro de uma a quatro horas após administração oral apresentando a biodisponibilidade média de 90% (LIMA, 2009).

O bromazepam atinge a concentração plasmática máxima em 1 a 2 horas após a administração oral alcançando a biodisponibilidade média 84% - parte não metabolizada (LIMA, 2009).

O lorazepam atinge a biodisponibilidade absoluta, após administração oral (maior que 90%). A concentração plasmática máxima ocorre aproximadamente 2 horas após a administração oral a indivíduos saudáveis (LIMA, 2009).

A carbamazepina é absorvida lentamente e o pico de concentração plasmática é observado de 4 a 8 horas após a ingestão (GOODMAN & GILMAN, 2010).

## **Distribuição**

Os benzodiazepínicos são fármacos marcadamente lipossolúveis e, desta forma, atravessam facilmente, por difusão simples, as barreiras biológicas. Entretanto, alguns fármacos psicoativos são mais hidrossolúveis, sendo assim seguros para uma administração intravenosa. Uma vez na corrente sanguínea, atravessam a barreira cerebral para entrar no SNC (OGA, 2003; FERRAZ, 2010). Os benzodiazepínicos ligam-se às proteínas plasmáticas, em particular a albumina (entre 60-95%). Para determinar a dose correta de fármaco a administrar num determinado caso clínico, deve-se analisar a ligação de benzodiazepínicos às proteínas, uma vez que somente a forma livre atinge o SNC (FERRAZ, 2010).

Estes fármacos atravessam também a barreira placentária e, quando utilizados durante a gravidez, aumentam a probabilidade de anomalias congênitas como fenda palatina e lábio leporino, além de complicações neonatais. Os benzodiazepínicos devem ser evitados por tempo prolongado durante a lactação, pois são eliminados no leite materno, podendo causar letargia e perda de peso do bebê (PEDROSO, 2007).

O diazepam é absorvido e, após, liberado para os tecidos altamente vascularizados, incluindo o cérebro, onde um rápido efeito psicológico é produzido. Em seguida é redistribuído para outros tecidos, apresentando, assim, um rápido início de ação, com uma duração relativamente curta após a dose única, ainda que a meia vida de eliminação seja longa (GOODMAN & GILMAN, 2010).

O lorazepam não-ligado atravessa facilmente a barreira hemato-encefálica por difusão passiva. Sua taxa de ligação à proteínas plasmáticas humanas é de aproximadamente 92% na concentração de  $160 \text{ ng mL}^{-1}$  (LIMA, 2009).

A carbamazepina é absorvida lentamente e de forma variável sendo seu pico de concentração plasmática observado de 4 a 8 horas após a ingestão, mas pode demorar até 24 h. Aproximadamente 75% da droga se liga com proteínas plasmáticas, distribuindo-se rapidamente pelos tecidos (MOSTARDEIRO, 2001; GOODMAN & GILMAN, 2010).

## **Metabolismo**

Os benzodiazepínicos são biotransformados a nível hepático, envolvendo as vias oxidativas (N-desmetilação, hidroxilação ou ambas) e não oxidativas (nitroredução, conjugação glucorônica, etc..). Os produtos formados podem ter atividade farmacológica similar àquela do composto original (LARINI, 1997; GOODMAN & GILMAN, 2010).

Durante o metabolismo, muitos ansiolíticos e antiepiléticos originam metabólitos que frequentemente têm atividade farmacológica comparável ao fármaco de origem, mas com uma meia vida mais prolongada. Normalmente aqueles que seguem a via oxidativa têm tempos de semi-vida biológica elevados e metabólitos ativos, enquanto aqueles que são conjugados apresentam tempos de semi-vida biológica pequenos e metabólitos inativos (FERREIRA, 1992).

Os principais metabólitos ativos do diazepam são mostrados na Figura 5 (OGA, 2003, GOODMAN & GILMAN, 2010; ROUINI, 2008):

- O nordiazepam ou N-desmetildiazepam: é um metabólito ativo e tem meia vida de eliminação de até 50 h;
- Oxazepam sofre conjugação a nível hepático, sendo excretado pela bile, após sofre uma hidrólise no intestino, com liberação do composto ativo que é reabsorvido;
- Temazepam é um metabólito que sofre conjugação e excretado principalmente como glucuronídeos na urina.

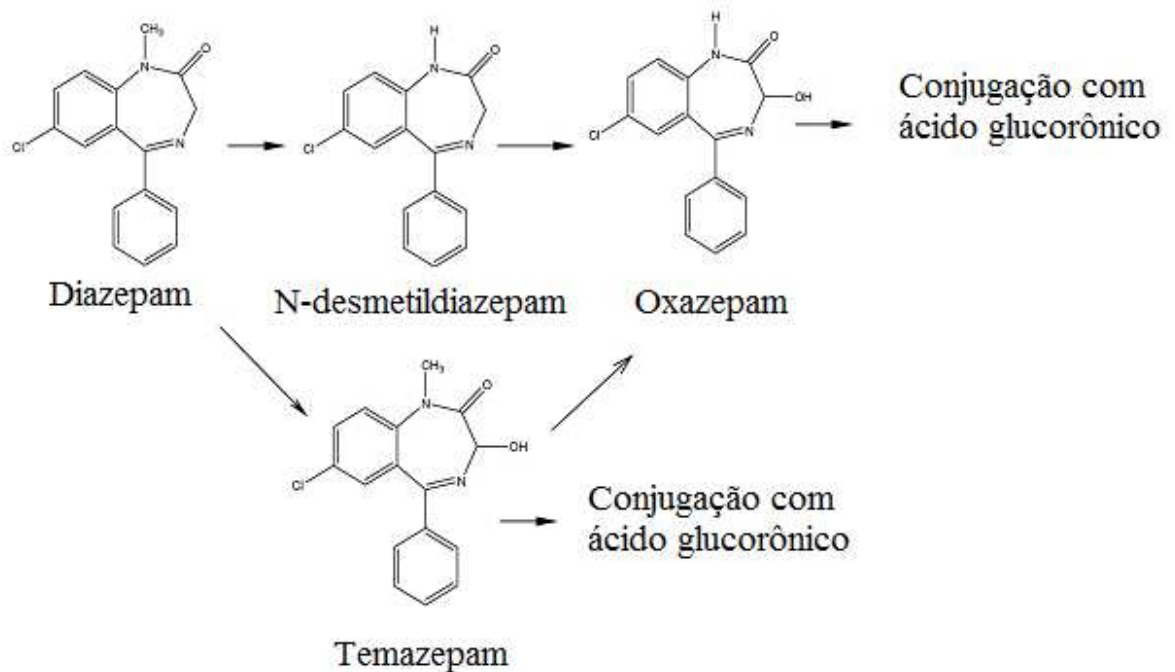


Figura 5 - Rota metabólica do diazepam e estrutura química de seus metabólitos. (Fonte: Adaptado de Rouini *et al.*, 2005).

A circulação êntero-hepática pode ser parcialmente responsável pelos efeitos prolongados do composto. O diazepam atua como indutor enzimático a nível microsomal, estimulando a sua própria biotransformação (LARINI, 1997).

Geralmente o primeiro passo no metabolismo dos benzodiazepínicos é a remoção do substituinte N-1-alkil, se estiver presente. Os metabólitos 3-hidroxil sofrem reação de glucuronização. Estes glucoronídeos conjugados são farmacologicamente inativos (KAPLAN & JACK, 1983).

O metabolismo da carbamazepina ocorre, predominantemente, no fígado, em duas fases (MOSTARDEIRO, 2001; GOODMAN & GILMAN, 2010). A fase I é representada pelo início da biotransformação através de reações de oxidação, redução ou hidrólise, liberando grupos funcionais reativos. A fase II (glucuronização, sulfonação, metilação ou acetilação) envolve conjugação da droga no sítio do grupo reativo criado na fase I, permitindo a excreção pelos rins (MOSTARDEIRO, 2001).

A maioria dos antiepilépticos são metabolizados pela via do Citocromo P450 ou da UDP-glucoronil-transferase. As enzimas do Citocromo P450 com maior significado clínico são CYP1A2, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19 e CYP3A4 (SILVADO, 2008; CORDEIRO *et al.*, 2009).

Três principais vias metabólicas têm sido descritas para a biotransformação da carbamazepina (Figura 6) (MOSTARDEIRO, 2001; MIAO & METCALFE, 2003; BRETON *et al.*, 2005; FAGIOLINO *et al.*, 2006; SILVADO, 2008, Mac LEOD, 2008; GOODMAN & GILMAN, 2010).

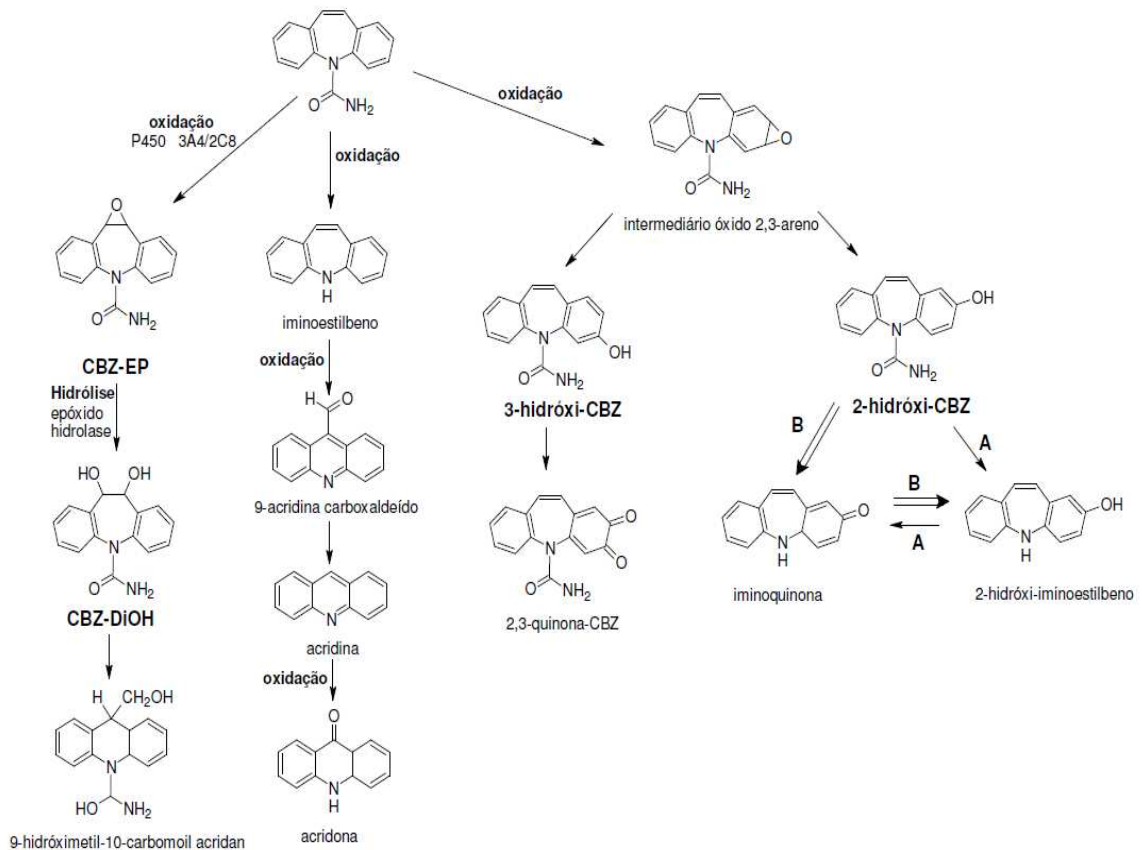


Figura 6 - Metabolismo da carbamazepina.  
(Fonte: Adaptado de Mac Leod, 2008)

A via metabólica de maior importância é através da reação de epoxidação com a formação de um metabólito ativo: a carbamazepina 10,11-epóxido (CBZ-EP), e também forma outros glicuronídeos que são metabólitos inativos (Figura 7) (ARAÚJO *et al.*, 2010). Já foram identificados 33 metabólitos da carbamazepina em urina de humanos e ratos (PIENIMÄKI *et al.*, 1995; MIAO & METCALFE, 2003).



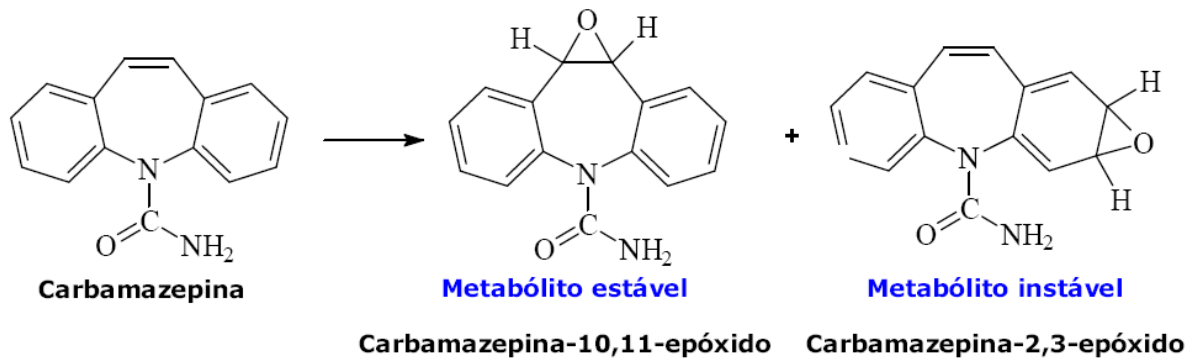


Figura 7 - Reação de biotransformação pela via de epoxidação da carbamazepina. (Fonte: Adaptado de Araújo *et al.*, 2010).

O metabólito ativo carbamazepina 10,11-epóxido sofre uma nova biotransformação pela ação da enzima epóxido hidrolase convertendo-se em derivado trans-10,11-dihidroxi-10,11-dihidrocarbamazepina (trans-carbamazepina-10,11-diol) e em metabólitos inativos por sua conjugação com ácido glicurônico (O- e N-glicuronídeos) (Figura 8) (SILVADO, 2008; ARAÚJO *et al.*, 2010).

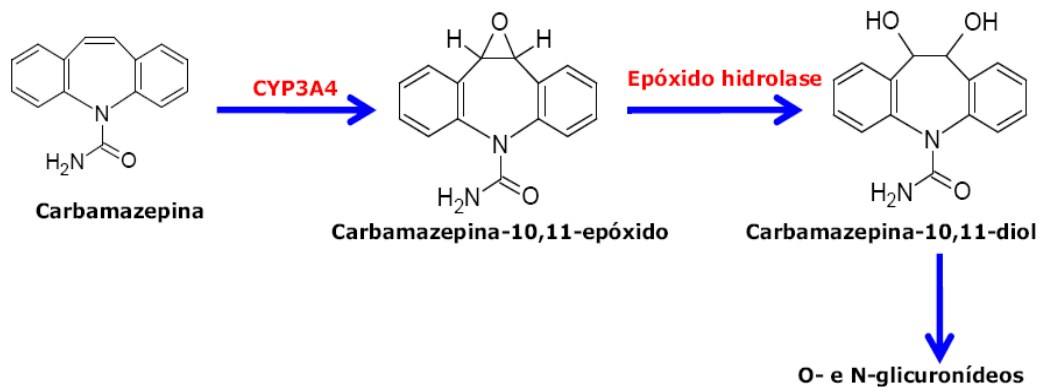


Figura 8 - Principais vias metabólicas de biotransformação da carbamazepina. (Fonte: Adaptado de Araújo *et al.*, 2010)

A segunda via do metabolismo da carbamazepina forma compostos hidroxilados. A terceira via dá origem a formação de iminostilbeno (MOSTARDEIRO, 2001, MIAO & METCALFE, 2003, BRETON *et al.*, 2005; GOODMAN & GILMAN, 2010).

Os metabólitos mais importantes são 10,11-dihidro-10,11-dihidroxicarbamazepina e, em menor grau, 10,11-dihidro-10,11 – epoxicarbamazepina. Estas substâncias têm mostrado possuírem propriedades semelhantes à carbamazepina e podem causar efeitos neurotóxicos (MIAO & METCALFE, 2003).

O lorazepam é essencialmente eliminado através de metabolismo de fase II por conjugação com ácido glucorônico, sendo extensivamente metabolizado no seu glucoronídeo inativo conjugado; portanto, apenas quantidades insignificantes de lorazepam livre estarão presentes no sangue e excretados na urina (GHASEMI & NIAZI, 2005; PAPINI *et al.*, 2006).

O clonazepam sofre metabolização hepática e já foram identificados cinco metabólitos na rota bioquímica de sua transformação que ocorre em duas etapas. Na primeira, o grupo nitro sofre redução, produzindo o metabólito ativo principal o 7-aminoclonazepam. Na segunda fase, o metabólito é acetilado a quatro outros metabólitos que estão presentes em proporções muito pequenas (STEENTOF *et al.*, 2009).

O bromazepam sofre metabolização hepática através da 3-hidroxilação e clivagem do anel de sete lados, seguido de uma conjugação glucorônica dos metabólitos hidrolisados. Seu principal metabólito ativo é o 3-hidróxi-bromazepam e o metabólito inativo (3-hidroxibenzoilpiridina), e posteriormente sofre reações de conjugação com ácido glucorônico (metabólitos inativos) que são excretados por via renal (CHÉZE *et al.*, 2004).

## **Eliminação**

Os benzodiazepínicos e os seus metabólitos hidrossolúveis são excretados principalmente na urina, sob forma de glucuronídeos. Entretanto, podem ser também ser eliminados pelo suor, saliva e leite materno (KATZUNG, 1998).

O principal metabólito presente na bilis é o N-desmetildiazepam (nordiazepam). A circulação entero hepática do diazepam e dos seus metabólitos é responsável por prolongar o efeito destes compostos terapêuticos (LARINI, 2008)

Aproximadamente 75% da dose lorazepam é excretada na urina até 72 h, conjugado ao ácido glucurônico (GHASEMI & NIAZI, 2005; PAPINI *et al.*, 2006).

A meia-vida de eliminação da carbamazepina inalterada é de aproximadamente 36 horas após uma dose única, sendo que após a administração oral repetida, a média é 16-24 horas, dependendo da duração do tratamento. A meia-vida de eliminação do metabólito carbamazepina 10,11-epóxido no plasma é cerca de 6 horas, após dose única oral do próprio epóxido. Após a administração de uma dose oral única de 400 mg de carbamazepina, 72% é excretada na urina e 28% nas fezes (ARAÚJO *et al.*, 2010).

### 3.5.3 Efeitos adversos e toxicidade dos ansiolíticos e antiepiléticos

Os benzodiazepínicos têm efeitos cardiovasculares brandos podendo provocar discreta diminuição da frequência respiratória, na pressão arterial e no trabalho sistólico ventricular esquerdo. Os efeitos colaterais esperados são constituídos de sonolência e ataxia (BALDESSARINI, 1996; GEHLEN, 2003). Em humanos é improvável que os benzodiazepínicos fornecidos em doses terapêuticas usuais, por via oral, deprimam significativamente a função cardiovascular (BALDESSARINI, 1996).

Atualmente os benzodiazepínicos têm sido muito utilizados sem prescrição médica, com a finalidade de buscar prazer e alívio de sintomas decorrentes do uso drogas. Isto tem sido evidenciado através de estudos epidemiológicos. A dose diária e o uso contínuo de benzodiazepínicos são fatores importantes que podem ocasionar um quadro de dependência (AUCHEWSKI *et al.*, 2004).

Os sintomas de superdosagem dos benzodiazepínicos abrangem sonolência, perda da consciência, depressão respiratória, coma e morte (GEHLEN, 2003). A sintomatologia da síndrome de abstinência inclui disforia, ansiedade, agitação, insônia, vertigens, anorexia, náuseas ou vômitos e convulsões (AUCHEWSKI *et al.*, 2004).

Os principais efeitos colaterais, relacionados com o uso dos benzodiazepínicos, são sedação e letargia. Doses de 20 a 40 vezes maiores que as habituais podem determinar hipotonia muscular, dificuldade para ficar em pé, hipotensão e desmaios (ALMEIDA & SILVA 2008).

O bromazepam se for ingerido uma superdosagem, pode ocasionar um estado confusional, sono profundo, relaxamento muscular, hiporreflexia e amnésia (LIMA, 2009).

Massoco & Palermo-Neto (1999) mostraram que a administração de diazepam na dose de  $1,5 \text{ mg kg}^{-1}$  diminui atividade de macrófagos de camundongos.

Musavi & Kakkar (1998) realizaram estudos para verificar o envolvimento de radicais livres: os resultados indicaram que uma única dose provoca alterações mediadas por radicais livres.

O clonazepam em concentrações plasmáticas maiores que  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  produz sintomas tóxicos, como sonolência e ataxia; em concentrações de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  leva ao estado de coma e pode ser letal (STEENTOF *et al.*, 2009; LIMA, 2009).

A carbamazepina pode apresentar toxicidade aguda mesmo em doses terapêuticas, afetando o SNC e sistema gastrointestinal, causando sedação, ataxia,

tonturas, náuseas, vômitos, constipação, diarreia, podem também causar alopecia, fotossensibilidade, hepatite, *rash* cutâneo e discrasia no sangue (MOSTARDEIRO, 2001; AMBROZIO *et al.*, 2002; MEDINA, 2008).

Os efeitos adversos observados na intoxicação crônica com carbamazepina são: vertigens, sonolência e distúrbios da função cerebelar e oculomotora (ataxia, nistagmo e diplopia), arritmias cardíacas, insuficiência cardíaca congestiva (raro), depleção da medula óssea incluindo anemia aplástica, icterícia, colestática e hepatocelular, reações dermatológicas, nefrite túbulo-intersticial, edema e hiponatremia (ARAUJO, 2010).

O metabólito carbamazepina 10,11-epóxido tem sido incriminado como tendo um papel-chave na indução aos efeitos colaterais, especialmente severas reações cutâneas. A 9-acridina carboxialdeído e a iminoquinona são metabólitos reativos, enquanto 9-hidroximetil-10-carbamoil-acridan (Acridan 9) é somente suspeita, devido à semelhança estrutural (BRETON *et al.*, 2005)

O lorazepam pode causar, entre outros sintomas, vertigem, distúrbios visuais, convulsões/crises convulsivas, amnésia, alucinações, depressão respiratória (LIMA, 2009).

#### **3.5.4 Ecotoxicidade dos ansiolíticos e antiepilépticos**

Segundo Boyd & Furlong (2002), muitos compostos farmacêuticos podem ser bioacumuláveis e afetar organismos aquáticos através da alteração de processos fisiológicos e funções reprodutivas. Estudos demonstraram que muitos fármacos além de causarem efeitos à nível de células embrionárias humanas também podem ser especialmente perigosos para organismos aquáticos tanto em águas doces como em ambientes marinhos, podendo ainda serem persistentes em solos e/ou sedimentos (JONES *et al.*, 2004; ROQUE, 2009).

A ecotoxicologia aquática é uma área especializada da toxicologia ambiental que concentra seus estudos nos efeitos ocasionados por agentes físicos e químicos sobre a dinâmica das populações e comunidades integrantes dos ecossistemas existentes (COSTA *et al.*, 2008).

Desta forma, estudos ecotoxicológicos permitem avaliar os danos ocorridos nos diversos ecossistemas pós-contaminação e, também, prever impactos futuros, quando da comercialização de produtos químicos e/ou lançamentos de despejos (ZAGATTO, 2006).

Através de testes de toxicidade, realizados sob condições experimentais específicas e controladas, pode-se estimar a toxicidade de substâncias em efluentes industriais e amostras ambientais (águas ou sedimentos). Os estudos de toxicidade não permitem obter uma resposta absoluta sobre o risco que uma determinada substância apresenta para a população humana, uma vez que é muito difícil extrapolar para os seres humanos os resultados de toxicidade obtidos para os organismos em laboratório e até mesmo correlacionar os resultados de toxicidade entre organismos de diferentes espécies (COSTA *et al.*, 2008).

A utilização de bioindicadores contribui bastante para estudos quanto à toxicidade de efluentes industriais, principalmente os gerados nas indústrias têxteis; papel e celulose. Para estes estudos são utilizados microcrustáceos, rotíferos, algas, bactérias e peixes como bioindicadores, bem como parâmetros físicos e químicos como Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), Demanda Química de Oxigênio (DQO), Oxigênio Dissolvido (OD), Carbono Orgânico Total (COT), pH e Condutividade são relevantes para o monitoramento da qualidade e toxicidade de efluentes gerados pelas indústrias. Portanto, servem como critério para determinar a eficiência dos tratamentos de efluentes e estabelecer concentrações permissíveis para seu descarte (BAPTISTA *et al.*, 2000).

Diversos pesquisadores identificaram a presença de fármacos e seus metabólitos em ambientes aquáticos em várias partes do mundo, como Alemanha, Brasil, Canadá, Holanda, Inglaterra, Itália, Suécia, Estados Unidos e Reino Unido (BILA & DEZOTTI, 2003; DBSKA *et al.*, 2004).

A carbamazepina é um dos fármacos mais frequentemente detectados em águas residuais, em estação de tratamento de efluentes e em águas de rio; porém, não existem dados sobre o destino de seus metabólitos no meio ambiente. Por causa da alta proporção de seus metabólitos em fluidos biológicos, existem razões para se suspeitar que estarão presentes em esgotos domésticos e no ambiente aquático (MIAO & METCALFE, 2003). Heberer (2002) identificou resíduos de carbamazepina em águas superficiais ( $1,07 \mu\text{g L}^{-1}$ ) em Berlim.

Embora existam relatos que indicam que a carbamazepina cause alterações sobre rins, fígado e brânquias de peixes, não foram verificados riscos toxicológicos em nenhum dos microorganismos estudados por Ramaswamy *et al.* (2011) em águas superficiais e sedimentos dos rios Kaveri, Vellar e Tamiraparani, e no mangue Pichavaram na Índia.

Na revisão feita por Fent *et al.* (2006) foi relatado que o diazepam e a carbamazepina podem ser potencialmente perigosos para os organismos aquáticos sendo que a *Daphnia magna* foi mais afetada do que outras espécies, e a toxicidade aguda da carbamazepina foi atingida utilizando uma concentração de 17,2 mg L<sup>-1</sup>, não sendo conhecidas as razões para a maior susceptibilidade.

Ferrari *et al.* (2003) relataram que dentre todos os fármacos detectados na maior parte dos efluentes, a carbamazepina parece ser um dos compostos mais perigoso para o ecossistema aquático. Nos testes realizados em dáfias, *zebrafish* e anfíbios constataram que a carbamazepina apresentou toxicidade moderada na faixa de 74-138 mg L<sup>-1</sup>.

Andreozzi *et al.* (2002) avaliaram a capacidade da carbamazepina de se acumular em algas, realizando ensaios biológicos com *Ankistrodesmus braunii* e *Selenastrum capricornutum* provenientes de culturas de *Cumbria* no Reino Unido e na Universidade do Texas (EUA), respectivamente. Foi constatado que o composto não apresenta efeitos tóxicos sobre as algas estudadas, porém salientam a necessidade de serem avaliados os efeitos em outros organismos aquáticos.

Quinn *et al.* (2008) realizaram um ensaio de regeneração com a *Hydra attenuata* para identificar o potencial teratogênico de 10 produtos farmacêuticos encontrados em efluentes de uma grande estação de tratamento de águas residuais. Foi constatado que com a presença da carbamazepina ocasiona um aumento da regeneração indicando um fraco poder teratogênico.

Nunes *et al.* (2006) investigaram os efeitos tóxicos agudos do diazepam sobre a *Artemia parthenogenetica* onde verificaram sua interferência nos neurotransmissores causando a inibição da enzima colinesterase.

Santos *et al.* (2010), realizaram uma revisão da literatura e encontraram relatos de que a carbamazepina é letal para *Zebrafish* na concentração de 43 µg L<sup>-1</sup> e produz alterações sub-letais em *Daphnia sp* em 92 µg L<sup>-1</sup>. Numa concentração acima de 12,7 mg L<sup>-1</sup> acarreta a inibição do crescimento da *D. magna*. O valor de EC<sub>50</sub> foi aproximadamente 13,8 mg L<sup>-1</sup> após 48 h de exposição. As fêmeas da *D. pulex* expostas a 1 µg L<sup>-1</sup> mostraram uma tendência para amadurecer e se reproduzir mais cedo. Também houve alterações em tecidos de rim, fígado e nas brânquias de carpas induzidas por este fármaco.

### 3.6 Metodologias para a análise de Fármacos

Muitos contaminantes estão presentes no meio ambiente ao nível de traços (na faixa de  $\text{ng L}^{-1}$  a  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Este fato, associado à complexidade da matriz (efluentes e afluentes de esgoto, água de superfície, sedimento), demanda gastos e investimentos elevados em trabalho analítico. Outra dificuldade é que muitos fármacos são parcialmente metabolizados no organismo e os metabólitos também podem ser perigosos quando lançados no meio ambiente. O desafio, portanto é desenvolver e validar métodos analíticos que possam determinar baixas concentrações de fármacos e seus metabólitos em matrizes ambientais (SUCHARA, 2007).

#### 3.6.1 Preparação, extração e pré-concentração da amostra

Devido à complexidade das matrizes ambientais, faz-se necessária a utilização de técnicas que possibilitem um tratamento prévio das amostras, que abrange as etapas de extração, pré-concentração e *clean-up*, para eliminação de interferentes (separação), aumentando a sensibilidade e seletividade analítica da detecção e quantificação dos analitos (SUCHARA, 2007).

Várias técnicas têm sido utilizadas para diminuição dos interferentes como: extração líquido-líquido através do uso de solventes orgânicos, porém apresentam alguns inconvenientes, como a formação de emulsão, utilização de grandes volumes de solventes e geração de grande quantidade de resíduos. Outra técnica muito utilizada é a extração em fase sólida (SPE) que utiliza uma quantidade menor de solvente, porém requer uma etapa de concentração do extrato, isto não é aplicável a substâncias com volatilidade alta (GOMEZ *et al.*, 2006; SUCHARA, 2007; UNCETA *et al.*, 2010; MARTINS, 2010).

Recentemente, as microtécnicas têm sido utilizadas para análise de amostras ambientais tais como: a microextração em fase sólida (SPME) que pode ser utilizada em analitos de baixa e média polaridade, em amostras aquosas ou gasosas em uma fibra polimérica sólida. A extração ocorre por difusão passiva e determinada pelo coeficiente de partição do analito entre a fibra e a amostra. Outra técnica bastante utilizada é a extração por sorção em barra de agitação (SBSE) (GOMEZ *et al.*, 2006; SUCHARA, 2007; UNCETA *et al.*, 2010; MARTINS, 2010).

Novas tecnologias têm sido empregadas para o preparo de amostras baseadas na minimização do uso de solventes orgânicos para a extração de compostos orgânicos como, por exemplo, o método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*), cuja tradução significa rápido, fácil, barato, efetivo, robusto e seguro. Tem sido largamente empregado para determinação de resíduos em matrizes complexas. O método baseia-se no uso de sulfato de magnésio e cloreto de sódio para extração/separação por *salting out* dos compostos de interesses e utilização de extração em fase sólida dispersiva para a limpeza das amostras (PRESTES *et al.*, 2009; MARTINS, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2011; MOREIRA *et al.*, 2012).

A microextração em fase líquida (LPME, do inglês *Liquid Phase Micro Extraction*) é outra alternativa para miniaturização do procedimento de extração requerendo somente 1 microlitro para extração dos analitos de amostras aquosas. A microextração em gota única ou micro extração em gota suspensa (SDME, do inglês *single drop micro extraction*) foi desenvolvida como um procedimento miniaturizado de pré tratamento de amostra utilizando solvente (MARTINS, 2010).

A microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME, do inglês *Dispersive liquid-liquid micro extraction*) utiliza um solvente dispersivo, miscível no solvente extrator (fase orgânica) e na amostra (fase aquosa) (MARTINS, 2010).

### 3.6.1.1 Extração em fase sólida

A extração em fase sólida é uma das ferramentas mais empregadas, para extração e/ou pré-concentração de analitos presentes em matrizes complexas (QUEIROZ *et al.*, 2001; SUCHARA, 2007).

A SPE emprega sorventes recheados em cartuchos (formado por um tubo de polipropileno) contendo cerca de 50 a 500 mg de sorvente, com 40-60  $\mu\text{m}$  de tamanho de partícula, fixado no tubo através de dois filtros, estes são constituídos de politetrafluoretileno (teflon) ou fibras de vidro, flexíveis, embebidas ou impregnadas com a fase estacionária (QUEIROZ *et al.*, 2001).

Em geral, os procedimentos de SPE contêm 5 etapas:

- I) Ativação do sorvente para deixar os sítios ativos disponíveis;
- II) Condicionamento do sorvente com solvente adequado para ajustar as forças do solvente de eluição com o solvente da amostra;



- III) Introdução da amostra, quando ocorre a retenção do analito e, às vezes, de alguns interferentes;
- IV) Limpeza da coluna para retirar os interferentes menos retidos que o analito;
- V) Eluição e coleta do analito.

Os mecanismos de separação usados em SPE são os mesmos da cromatografia líquida: adsorção, partição (fase normal e reversa), troca iônica e exclusão por tamanho (SUCHARA, 2007; CARDOSO, 2011).

A adsorção é muito utilizada na separação de compostos polares. Dentre os adsorventes mais usados estão a sílica ((SiO<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-OH), alumina ((Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)<sub>n</sub>) e o silicato de magnésio - florissil® (Mg.Al(SiO<sub>4</sub>)<sub>n</sub>) sendo muito empregado em análise de resíduos de fármacos. No entanto, o florissil, por ser mais polar, pode provocar adsorção irreversível do analito de interesse em sua superfície (SUCHARA, 2007).

Os sorventes que empregam o mecanismo de partição são preparados a partir da sílica utilizada em processos de adsorção, onde geralmente ela reage com um derivado clorado do grupo siloxano, ligando o grupo alquílico (R) do reagente à estrutura básica da sílica. A escolha do grupo R definirá se a fase preparada será polar ou fase normal (R= OH, CN, NH<sub>2</sub>) ou apolar, e assim fase reversa (R= C<sub>18</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>2</sub>) (SUCHARA, 2007).

A extração em fase sólida apresenta uma grande variedade de fases extratoras, resultando em diferentes tipos de interações com os analitos favorecendo, desta forma, a seletividade analítica; possibilita a automação das análises e o acoplamento com técnicas cromatográficas. Entretanto, tem apresentado algumas limitações como o bloqueio dos poros da fase extratora pelos componentes da matriz, utilização de solventes orgânicos para a eluição, variações analíticas entre cartuchos extratores e várias etapas operacionais para sua execução (ALVES, 2006)

Estudos visando desenvolver fases extratoras de SPE com aplicações mais específicas constantemente são desenvolvidos. Um exemplo são as fases poliméricas, baseadas em polímeros tipicamente compostos de ligações altamente entrecruzadas de poliestireno-divinilbenzeno (PSDVB ou SDB). Os solventes poliméricos são recomendados para substâncias de média à alta polaridade, nos quais eles podem apresentar recuperação maior que em sorventes de alquil sílica de fase reversa (SUCHARA, 2007).

Kasprzyk-Hordern *et al.* (2007) desenvolveram um método para determinação de 28 compostos farmacêuticos e drogas ilícitas em águas superficiais. A maior dificuldade

com a análise multi-resíduo de produtos farmacêuticos são as diferentes classes terapêuticas. Desta forma foram avaliados diferentes sorventes:

- Oasis HLB, 60 mg - constituído por dois monômeros, um hidrofílico (N-vinilpirrolidona) e um lipofílico (divinilbenzeno) - aplicação para compostos ácidos, neutros e básicos;

- Oasis MCX, 60 mg – composto por um sorvente polimérico de troca catiónica forte construído sobre o compolímero HLB - aplicação para compostos básicos;

- Oasis MAX, 60 mg - composto por um sorvente polimérico de troca aniônica forte forte construído sobre o compolímero HLB aplicação – aplicação para compostos ácidos;

- Oasis WCX, 60 mg - composto por um sorvente polimérico de troca catiónica fraco construído sobre o compolímero HLB - aplicação para compostos básicos fortes;

- Oasis WAX, 60 mg - composto por um sorvente polimérico de troca aniônica forte fracos construído sobre o compolímero HLB aplicação – aplicação para compostos ácidos fortes;

- Chromabond C18ec, 200 mg – sorvente de sílica encapada de fase reversa-aplicação para compostos não polares;

- Isolute, ENV+, 100 mg – resina apolar construída em sorvente de divinilbenzeno e poliestireno hidroxilado - aplicação de largo alcance;

- Isolute, HCX, 200 mg – à base de sílicas de sorvente misto contendo cadeias octil (C<sub>8</sub> não encapada) e sorvente de troca catiónica forte (SO<sub>3</sub>) – aplicação compostos apolares e básicos;

O sorvente Oasis MCX demonstrou ser o mais eficaz para estudar produtos farmacêuticos em pH ácido (pH 2,5) (KASPRZYK-HORDERN *et al.*, 2007).

Grujić *et al.* (2009) realizaram a análise de dezenove fármacos, de classes terapêuticas diferentes, em águas superficiais e subterrâneas. Para a extração dos compostos avaliaram dez cartuchos de SPE diferentes. Sendo que os melhores resultados foram obtidos com sorvente Oasis HLB. Outros parâmetros foram avaliados e otimizados como o pH da amostra de água, o volume de solvente de eluição e o volume da amostra. As melhores condições para o procedimento de SPE foram a pH ~7,5, ou seja, sem ajuste de pH, e em pH 3, dependendo do analito.

Wu *et al.* (2008) avaliaram uma metodologia para multiresíduos de diversas classes de fármacos através da utilização de diferentes sorventes poliméricos. Os sorventes utilizados foram: Oasis HLB, Strata-X (uma resina de polidivinilbenzeno

modificado com grupos piperidona) e Bond Elut Plexa (resina polimérica com exterior hidroxilado e estrutura de poros). Foram avaliados em 3 diferentes pH 3, 5 e 7. Os melhores resultados foram obtidos utilizando Oasis HLB (em pH 3 e 5) e Strata X (em pH 5) com recuperações maiores que 70%.

### **3.6.2 Técnicas cromatográficas**

A análise de fármacos requer ferramentas analíticas sensíveis e eficientes para providenciar dados de confiança na separação, identificação e quantificação de várias moléculas. As técnicas cromatográficas mais utilizadas para análise de fármacos em amostra ambiental e biológica são: a cromatografia líquida (LC) e a cromatografia gasosa (GC), sendo que a decisão entre usar LC ou GC é usualmente baseada nas características físico-químicas do analito (ROQUE, 2009).

As duas técnicas oferecem detectores bastante eficientes para uma detecção adequada dos analitos. Para análises por Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) os detectores mais comuns são o detector espectrofotométrico de absorção no Ultravioleta-visível (UV-VIS), detector de Arranjos de Diodos (DAD) e detector de Fluorescência (FLD). Na GC tem-se o detector por ionização em chama (FID) e o detector de captura de elétrons (ECD). Além desses detectores pode-se destacar o uso de espectrômetro de massas (MS) e espectrômetro de massa em série (MS/MS) (SUCHARA, 2007).

#### **3.6.2.1 Cromatografia Líquida**

A necessidade de técnicas com a habilidade de separar e analisar amostras complexas. É um método físico-químico de separação, no qual a separação de um equilíbrio de distribuição do soluto entre duas fases: uma fase fixa (estacionária) e uma fase móvel. Assim, a fase móvel é bombeada constantemente através da coluna cromatográfica, onde ocorrerá a separação. A cromatografia líquida é utilizada na análise de fármacos pelo fato de não necessitar volatilizar o composto, não correndo, assim, o risco de perder o analito e também pelo fato de não necessitar o uso de soluções derivatizantes, as quais geralmente são substâncias de alta toxicidade (SUCHARA, 2007).

A instabilidade térmica da carbamazepina faz a utilização do HPLC mais atraente do que a cromatografia gasosa, que, além disto, exige um procedimento de derivatização complicado. Alguns métodos de HPLC com ultra-violeta ou espectrometria de massa, para a determinação de carbamazepina em fluidos biológicos (plasma, urina) foram publicados. Envolveram a quantificação da carbamazepina e de seus principais metabólitos (CBZ-EP, 10-OH-CBZ, DIOH-CBZ) (BRETON *et al.*, 2005; ZHU *et al.*, 2005).

### **a) Cromatografia líquida com detecção por UV**

A determinação de ansiolíticos e antiepilépticos por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta é uma metodologia amplamente utilizada, por ser um ensaio barato e fácil.

Borges *et al.* (2009) determinaram simultaneamente 7 benzodiazepínicos (flunitrazepam, clonazepam, oxazepam, lorazepam, clordiazepóxido, nordiazepam e diazepam) em plasma humano, usando SPE e detecção por HPLC-UV em 245 nm. O LOQ foi de 30  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Os autores Muchohi *et al.* (2005) determinaram lorazepam em plasma humano utilizando HPLC-UV e o LOQ foi de 10  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Mostardeiro (2001) desenvolveu uma metodologia para identificação e quantificação de carbamazepina e carbamazepina-10,11- epóxido em plasma humano utilizando SPE e HPLC-UV. O LOQ foi de 0,25  $\mu\text{g L}^{-1}$  para carbamazepina e de 0,50  $\mu\text{g L}^{-1}$  para carbamazepina 10,11-epóxido. Yoshida *et al.* (2006) determinaram simultaneamente carbamazepina e seu metabólito carbamazepina-10,11-epóxido utilizando HPLC-UV em 215 nm.

Jinno *et al.* (1998) investigaram a determinação de benzodiazepínicos em urina humana através da quantificação em HPLC-UV e comprimento de onda de 220 nm. Enquanto Solleu *et al.* (1993) e Heizmann *et al.* (1984) e Al-Hawasli *et al.* (2012) desenvolveram uma metodologia por HPLC-UV para determinar bromazepam em plasma em 240 nm.

Nos experimentos realizados com ratos por Mercolini *et al.* (2009) para investigar a eficácia do tratamento com diazepam, os pesquisadores determinaram diazepam e seus metabólitos no tecido cerebral e plasma utilizando HPLC-UV. Azzan *et al.* (1998) também utilizaram HPLC-UV para analisar clonazepam, diazepam e seus metabólitos em amostras de urina e plasma.

## b) Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) representa uma importante ferramenta analítica para a determinação de fármacos, seus metabólitos e os produtos de degradação. Considerada atualmente como melhor técnica de detecção para cromatografia, devido à alta sensibilidade em pequenas concentrações, bem como pelo fornecimento de informações quantitativas e qualitativas dos compostos separados no cromatógrafo, a espectrometria de massas também permite a distinção de diferentes substâncias com o mesmo tempo de retenção (ALVES, 2006; OLIVEIRA, 2010).

O ponto crítico da técnica LC-MS seria a incompatibilidade relacionada à vazão do eluente do sistema cromatográfico com relação à velocidade de bombeamento do sistema de vácuo. As vazões utilizadas para o HPLC são relativamente grandes, sendo impossível bombear o eluente para dentro do detector de massas. Desta forma, para o acoplamento do cromatógrafo à espectrometria de massas foi necessário o desenvolvimento de interfaces e de formas de ionização alternativas (HARRIS, 2003; CHIARADIA, 2008).

O espectrômetro de massas é composto por uma fonte de íons, no qual ocorre a ionização dos analitos; o analisador, que faz a separação dos íons; e o detector, que faz a geração de sinais elétricos que são mensuráveis (HARRIS, 2003; OLIVEIRA, 2010).

As moléculas da amostra são analisadas através de dois modos de ionização: eletronebulização (ESI, do inglês *Electrospray Ionization*) ou ionização química por pressão atmosférica (APCI, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) (HARRIS, 2003).

Foram determinados a carbamazepina e oito metabólitos simultaneamente por cromatografia líquida-espectrometria de massas tandem com ionização por eletronebulização: carbamazepina-10,11-epóxido, 10,11-diidro-10,11-trans-hidroxi-carbamazepina (DIOH-CBZ), 10-hidroxi-10,11-dihidro-CBZ (10-OH-CBZ), 2-hidroxi-carbamazepina (2-OH-CBZ), 3-hidroxi-carbamazepina (3-OH-CBZ), iminostilbeno (IM), acridona (AO), acridina (AI), iminoquinona em plasma humano (BRETON *et al.*, 2005; ZHU, *et al.*, 2005).

### **c) Ionização por eletronebulização**

É uma técnica apropriada para determinação da massa molar e da estrutura. É preferencialmente aplicada para análise de moléculas iônicas grandes ou íons pequenos com uma única carga, podendo ser usada no modo positivo ou negativo. Esta técnica gera, em solução, íons dos analitos antes que eles cheguem ao espectrômetro de massas (HARRIS, 2003; CHIARADIA, 2008).

A ionização por eletronebulização envolve a formação de um *spray* eletrostático, a partir do qual são geradas pequenas gotas carregadas e destas são liberados os íons. A implementação de uma fonte de ESI é relativamente simples, comparando-se com outras fontes para espectrometria de massas. É necessária uma fonte de alta tensão (1000 a 7000 V) que esteja em contato com a solução contendo eletrólitos (MORAES & LAGO, 2003).

O eluato é pulverizado (nebulizado) dentro de uma câmara que está sob pressão atmosférica. Na presença de um forte campo eletrostático e de um gás aquecido, promove a aglomeração do solvente dentro da gota para a evaporação. Os íons são transportados ao analisador de massas através de uma série de estágios de vácuo e elementos iônicos que focam o caminho (HARRIS, 2003).

O sistema de ionização por eletronebulização pode ser definido com um circuito elétrico que encaminha os íons formados em solução para a fase gasosa. Nesse processo, o analito, inicialmente em solução, forma íons carregados em solução que posteriormente serão analisados de acordo com suas respectivas razões massa/carga no espectrômetro de massas (OLIVEIRA, 2010).

### **d) Ionização química sob pressão atmosférica (APCI)**

É uma técnica apropriada para determinação de massas molares menores do que 2000 unidades bem como a determinação da estrutura molecular. É aplicada para análise de moléculas iônicas, polares e apolares, podendo ser usado no modo positivo e negativo.

No modo APCI, o eluato é vaporizado através de um vaporizador aquecido (normalmente de 250 a 400 °C), sob pressão atmosférica. O aquecimento vaporiza o líquido, e as moléculas do solvente na fase gasosa são ionizadas por descarga de elétrons a partir uma agulha condutora. Então, os íons do solvente transferem cargas

para as moléculas do analito através de reações químicas (HARRIS, 2003 APPLIED, 2003).

### **Analísadores triplo quadrupolo**

Consiste de dois analisadores quadrupolo que tem entre eles uma cela de colisão. O quadrupolo é constituído de 4 hastes. Os pares opostos das hastes estão conectados eletricamente e uma voltagem com radiofrequência de 180° fora da fase é aplicada entre eles (CHIARADIA *et al.*, 2008).

A principal vantagem para o seu emprego está na alta sensibilidade e seletividade. Pode operar em modos diferentes que são *scan* do íon-produto, *scan* do íon-precursor, perda neutra, além do modo MRM (monitoramento de reações múltiplas). O MRM é sem dúvida o mais conveniente para os fármacos em estudo e o modo mais usado de operação para análise de contaminantes (HARRIS, 2003).

### **Analísadores quadrupolo-trap (Q-Trap)**

O “*ion-trap*” (armadilha de íons) é um quadrupolo tridimensional que “captura” todos os íons que são introduzidos em seu interior e os mantém “aprisionados” até que uma determinada radiofrequência seja aplicada e torna os íons de certa razão *m/z* instáveis, de forma que são libertados do “*trap*” (ALVES, 2006; CHIARADIA *et al.*, 2008).

A seleção, a decomposição e a subsequente análise dos íons são realizadas na mesma parte do instrumento, de maneira que estes processos ocorrem separados apenas pelo tempo. Para isso, o armadilha de íons é ajustado para capturar todos os íons que entram no espectrômetro de massas e os íons de *m/z* que não interessam são levados à instabilidade para ocasionar sua ejeção do “*trap*”. Enquanto que os íons remanescentes são dissociados. Os íons produzidos na dissociação do íon de *m/z* selecionado tornam-se sequencialmente instáveis e são liberados do *trap* para gerar o espectro de massas (CHIARADIA *et al.*, 2008).

O princípio do armadilha de íons consiste de dois eletrodos hiperbólicos fechados, que normalmente estão sob potencial zero e duas seções hiperbólicas fechadas centradas em direção ao anel do filamento do eletrodo no qual é aplicado um potencial para gerar o campo eletrostático do quadrupolo. Todos os íons formados pelo pulso de elétrons, ou outro método de ionização, são aprisionados dentro do eletrodo

pela aplicação de uma tensão durante a ionização. Uma mudança nas tensões aplicadas no anel do eletrodo faz com que os íons passem a adotar uma trajetória instável e saiam do “*ion trap*” na ordem crescente da razão  $m/z$  quando podem ser detectados (ALVES, 2006).

### **Monitoramento de Reações Múltiplas**

No modo de operação de monitoramento de reações múltiplas (MRM, do inglês *Multiple Reactions Monitoring*) o espectrômetro é programado de forma que dois ou mais íons são separados e fragmentados novamente. É possível analisar multianalitos dentro de uma análise, uma vez que, permite a identificação e separação de cada transição monitorada. O MRM aumenta a seletividade da espectrometria de massas para determinados analitos e melhora a sensibilidade, diminuindo a resposta dos interferentes a tudo o que interfira na medida, reduzindo o ruído de fundo (HARRIS, 2003).

### **Varredura dos íons produzidos (do inglês “*product-ion scan*”)**

Nesta varredura, considerando-se um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo, no primeiro estágio (EM1) é isolado o íon de interesse que, em seguida, é fragmentado na cela de colisão. No segundo estágio do espectrômetro de massas (EM2) é feita a varredura dos íons produzidos a partir da fragmentação do íon de interesse isolado em EM1 para obtenção do espectro de massas. Esta técnica também pode ser realizada no “ion-trap”.

## **3.7 Técnicas hífenadas para determinação de fármacos psicoativos e seus metabólitos**

### **3.7.1 Determinação em amostras biológicas**

Inúmeros trabalhos encontrados na literatura relatam a determinação de ansiolíticos, antiepiléticos e seus metabólitos em amostras biológicas (Tabela 3). Atualmente o uso do LC-MS/MS com ionização ESI no modo positivo e MRM para a determinação destes fármacos vem aumentando consideravelmente.



Abbara *et al.* (2008) analisaram diazepam em plasma humano, Zhu *et al.* (2005) determinaram carbamazepina e seu metabólito carbamazepina 10,11-epóxido em plasma de ratos.

Villain *et al.* (2005) e Kim *et al.* (2011) determinaram benzodiazepínicos e seus metabólitos em cabelo humano. Smyth *et al.* (2000) analisaram por ESI dezesseis fármacos derivados dos 1,4-benzodiazepínicos e suas fragmentações subsequentes foram investigadas usando um espectrômetro de massa armadilha de íons. O produto sequencial dos experimentos de íons de fragmentação foi realizado com a finalidade de elucidar as vias de degradação destes compostos.

Chèze *et al.* (2004) analisaram bromazepam e seu metabólito o 3-hidroxi-bromazepam, e também clonazepam e o seu metabólito o 7-aminoclonazepam em amostras de urina. Determinaram também bromazepam e 7-aminoclonazepam, em amostras de cabelo enquanto o clonazepam não foi detectado.

Ishida *et al.* (2009) desenvolveram um método rápido para fazer um "screening" de 43 benzodiazepínicos e seus metabólitos em plasma humano utilizando a Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a espectrometria de massas (do inglês - high pressure liquid chromatography - UPLC-MS). Xiang *et al.* (2011) analisaram benzodiazepínicos e seus metabólitos em amostras de cabelo e sangue.

Breton *et al.* (2005) determinaram carbamazepina e seus metabólitos: carbamazepina 10,11-epóxido, iminostilbeno, acridona, e acridina em plasma humano. Também foram determinados em amostras de cabelo o bromazepam e 7-aminoclonazepam, enquanto o clonazepam não foi detectado.

Queiroz *et al.* (2008) realizaram uma comparação entre a extração sortiva em barras de agitação e extração líquido-líquido, para a determinação de carbamazepina, carbamazepina-10,11-epóxido em amostras de plasma. As análises foram realizadas em pacientes que utilizavam medicamentos antiepilépticos. Os resultados encontrados foram de 10400 ng L<sup>-1</sup> para a carbamazepina, 10600 ng L<sup>-1</sup> para a carbamazepina-10,11-epóxido.

Irving & Dickson (2007) investigaram drogas sedativas através de um método de triagem em amostras de cabelo humano e unha empregando LC-MS/MS. Kintz *et al.* (2005) utilizaram a técnica por espectrometria de massas para a triagem de 17 benzodiazepínicos e hipnóticos em saliva (7-aminoclonazepam, 7-aminoflunitrazepam, bromazepam, clobazam, diazepam, lorazepam, lormetazepam, midazolam,

nordiazepam, oxazepam, temazepam, tetrazepam, triazolam zaleplon, zopiclone e zolpidem), os limites de quantificação ficaram entre 100-200 ng L<sup>-1</sup>.

Steentoft & Linnet (2009) realizaram pesquisas para a determinação de clonazepam e 7-aminoclonazepam, em amostras de sangue de 297 pessoas que se envolveram em casos de trânsito, 92 casos criminais (autores ou vítimas de um crime) e em 140 casos “*postmortem*”.

Rooyen *et al.* (2002) determinaram carbamazepina e seu metabólito carbamazepina 10,11-epóxido em amostras de plasma de 22 voluntários através de LC-MS/MS com ionização por eletronebulização, combinado com extração em fase sólida. Os resultados encontrados para carbamazepina ficaram entre 1000-1200 µg L<sup>-1</sup> e para o metabólito entre 75-85 µg L<sup>-1</sup>.

Freire *et al.* (2005) fizeram uma comparação entre a extração líquido-líquido (ELL) e a extração em fase sólida, utilizando um HPLC-UV e comprimento de onda de 228 nm, em plasma. Concluíram que as técnicas apresentaram características que permitem suas aplicações na determinação simultânea do diazepam e seu principal metabólito ativo o nordiazepam.

Papini *et al.* (2006) utilizaram LC-MS/MS para determinação de lorazepam em plasma e urina. O lorazepam é vendido comercialmente como uma mistura racêmica de enantiômeros S e R. Desta forma, os autores analisaram separadamente seus enantiômeros. Maggs *et al.* (1996) investigaram a presença de metabólitos urinários da carbamazepina em pacientes epiléticos, após um tratamento a longo prazo, e obtiveram os seguintes metabólitos não conjugados: carbamazepina-10,11-epóxido e trans-10,11-dihidrodiol-carbamazepina.

Tabela 3 – Íon precursor (M+H<sup>+</sup>) e íon produto (m/z) de ansiolíticos, antiepilépticos e seus metabólitos reportados na literatura.

Composto	Íon Precursor (M+H <sup>+</sup> )	Íon produto (m/z)	Metabólitos	M+H <sup>+</sup>	Íons (m/z)	Autores					
Bromazepam	316	288/261/209	3-OH bromazepam	332	314/303/287	Chèze <i>et al.</i> , 2004 Villain <i>et al.</i> , 2005 Kim <i>et al.</i> , 2011 Mueller <i>et al.</i> , 2005 Grujić <i>et al.</i> , 2006 Ishida <i>et al.</i> , 2009 Hummel <i>et al.</i> , 2006					
		182/209	NA								
		-----	NA								
		182	NA								
		288	NA								
Lorazepam	321	318	NA	282	236	Villain <i>et al.</i> , 2005 Kim <i>et al.</i> , 2011 Ishida <i>et al.</i> , 2009 Mueller <i>et al.</i> , 2005, Unceta <i>et al.</i> , 2010; Grujić <i>et al.</i> , 2006 Irving & Dickson., 2007					
		317	NA								
		229/275	NA								
		275/303	NA								
		-----	NA								
Diazepam	285	275	NA	269 287 286,9 287 301	163/241 241/269 269 240,9/103,9 241 283/255 255	Grujić <i>et al.</i> , 2006; Unceta <i>et al.</i> , 2010; Gebhardt & Schroder, 2007 Villain <i>et al.</i> , 2005 Kim <i>et al.</i> , 2011; Mueller, <i>et al.</i> , 2005 Unceta <i>et al.</i> , 2010 Hummel <i>et al.</i> , 2006 Irving & Dickson, 2007 Villain <i>et al.</i> , 2005; Kim <i>et al.</i> , 2011 Mueller <i>et al.</i> , 2005; Irving & Dickson., 2007 Ishida <i>et al.</i> , 2009 Hummel <i>et al.</i> , 2006 Kim <i>et al.</i> , 2011; Villain <i>et al.</i> , 2005 Ishida <i>et al.</i> , 2009 Mueller <i>et al.</i> , 2005 Hummel <i>et al.</i> , 2006 Irving & Dickson., 2007					
		154/193	Oxazepam								
		-----	NA								
		154	Nordiazepam (N-desmetildiazepam)								
		222	NA								
		284,9	Nordiazepam (N-desmetildiazepam)								
		285	NA								
		285	NA								
		Clonazepam	316				193/221	7- aminoclonazepam	286,1	222/250 121/222 250/222/195	Villain <i>et al.</i> , 2005 Kim <i>et al.</i> , 2011 Chèze <i>et al.</i> , 2004 Ishida <i>et al.</i> , 2009; Unceta <i>et al.</i> , 2009; Mueller <i>et al.</i> , 2005 Irving & Dickson., 2007
							193	NA			
270/241	NA										
-----	NA										
270	NA										
Carbamazepina	237	270	NA	253	236/210 180 180 194 180 180 210 152 167 210 252,9/236	Gebhardt & Schroder 2007 Unceta <i>et al.</i> , 2009; Zhu <i>et al.</i> , 2005 Mueller <i>et al.</i> , 2005; Grujić <i>et al.</i> , 2006; Kasprzyk-Hordern 2007; Zhu <i>et al.</i> , 2005 Rooyen. <i>et al.</i> , 2002 Breton <i>et al.</i> , 2008 Breton <i>et al.</i> , 2008 Breton <i>et al.</i> , 2008 Breton <i>et al.</i> , 2008 Breton <i>et al.</i> , 2008 Breton <i>et al.</i> , 2008 Breton <i>et al.</i> , 2008 Breton <i>et al.</i> , 2008 Breton <i>et al.</i> , 2008 Breton <i>et al.</i> , 2008					
		214	NA								
		220/194	NA								
		194	NA								
		270	Carbamazepina 10-11 epóxido								
		-----	NA								
		270	Iminostilbeno								
		214	9 – acridan								
		-----	NA								
		270	Iminoquinona								
		214	2 OH carbamazepina								
		-----	NA								
		270	Acridina (AI)								
214	Acridona (AO)										
-----	NA										
270	3 OH carbamazepina										
214	10,11-Dihidro-10,11 dihidroxicarbamazepina (10,11.CBZ Diol)										
-----	NA										
270	10,11 Dihidro-carbamazepina (DiOH-CBZ)										
214	NA										

NA = Não analisado

### 3.7.2 Determinação em amostras ambientais

A literatura atualmente relata a ocorrência de resíduos de fármacos psicoativos em amostras ambientais conforme pode-se constatar na Tabela 4. Dentre estes compostos, o de maior ocorrência é a carbamazepina como podemos comprovar através do monitoramento realizado em efluentes na Itália, França, Grécia e Suécia (ANDREOZZI *et al.*, 2003).

Foram feitas determinações deste composto em águas subterrâneas e superficiais, bem como em afluentes, efluentes, em estações de tratamento e rios da Finlândia. Devido à alta atividade biológica deste fármaco pode-se considerar como sendo um composto prejudicial ao meio ambiente (VIENO *et al.* 2006). Em 80% das amostras de águas superficiais e subterrâneas analisadas na Sérvia foram detectadas sua presença (GRUJIĆ *et al.*, 2009).

Unceta *et al.* (2010) desenvolveram uma metodologia para a determinação simultânea de 16 compostos farmacêuticos com características ácidas e básicas em águas residuais urbanas, utilizando microextração em fase sólida. Dos fármacos psicoativos pesquisados, apenas carbamazepina foi identificada, não sendo detectados lorazepam e diazepam.

Foi realizado o monitoramento de carbamazepina e diazepam (Tabela 4), através de LC-MS/MS com eletronebulização por Gebhardt & Schröder (2007) em águas superficiais de Aachen-Soers - Alemanha e por Buseti *et al.* (2009) na Austrália Ocidental em águas residuais.

Huerta-Fontela *et al.* (2006) detectaram em amostras de afluente e efluente bromazepam, carbamazepina, diazepam e lorazepam, também foram encontrados alguns metabólitos como a carbamazepina 10,11 epóxido e oxazepam.

Foi monitorada durante um ano a ocorrência e a persistência de carbamazepina e a carbamazepina 10,11-epóxido numa estação de tratamento de esgoto no sul da Espanha (GÓMEZ *et al.*, 2007).

Tabela 4 - Concentrações de ansiolíticos e antiepilépticos detectados no meio ambiente, reportadas na literatura.

Fármacos - concentração (ng L <sup>-1</sup> )					Matriz/amostra	Autores
BRZ*	CBZ	CLZ	DZP	LRZ		
NA**	1400	NA	80-110	NA	Águas superficiais	Gebhardt & Schröder, 2007
NA	910-1000	NA	< 30	NA	Águas residuais	Busetti <i>et al.</i> , 2009
NA	300-1200 307	NA	NA	NA	Efluente	Andreozzi <i>et al.</i> , 2003
NA	430 7	NA	NA	NA	Afluente	Miao & Metcalfe, 2003
NA	120-310 110-230	NA	NA	NA	Águas superficiais	
NA	290-400 380-470	NA	NA	NA	Afluente	Gómez <i>et al.</i> , 2007
NA	6-130	NA	NA	NA	Efluente	
ND	6-130	ND	ND	ND	Águas subterrâneas	Grujić <i>et al.</i> , 2006
ND-3662	ND-113	NA	ND-49	ND-502	Afluente	Huerta-Fontela <i>et al.</i> , 2006
ND-1554	ND-175	NA	ND	ND-532	Efluente	
NA	16-40 10-51	NA	ND ND	ND ND	Afluente	Unceta <i>et al.</i> , 2010
ND	ND-2000	NA	ND	NA	Efluente	
ND	ND-1900	NA	320-630	NA	Afluente	Hummel <i>et al.</i> , 2006
ND	25-80	NA	90-400	NA	Águas superficiais	
NA	94-152	NA	ND	ND-46	Efluentes	Aukidy <i>et al.</i> , 2012
NA	460-1700	NA	NA	NA	Efluente	Gasser <i>et al.</i> , 2011

\*BRZ=Bromazepam; CBZ=Carbamazepina; CLZ=Clonazepam; DZP=Diazepam; LRZ=Lorazepam

\*\*NA= Não analisado; \*\*\*ND= Não detectado.

Existe uma escassez de relatos sobre os metabólitos de ansiolíticos e antiepilépticos destes resíduos. Muitas vezes, estes metabólitos podem ser potencialmente tóxicos. Para avaliar o risco ambiental destes resíduos, há a necessidade de identificação sensível destes compostos. Na Tabela 5 estão demonstrados os dados sobre a presença de metabólitos em amostras ambientais

Miao & Metcalfe (2003) utilizaram uma metodologia com SPE, seguida por LC-MS/MS para a análise simultânea de carbamazepina e cinco metabólitos. A determinação foi em águas coletadas de estações de tratamento de esgoto, águas residuais, águas subterrâneas e superficiais. Foi detectada a presença do metabólito CBZ-DiOH em níveis três vezes mais elevado do que a carbamazepina, em todas as amostras.

Hummel *et al.* (2006) determinaram resíduos de carbamazepina e diazepam, bem como de alguns de seus metabólitos, em amostras de águas residuais, superficiais, subterrâneas, e potável. Utilizaram a SPE e a detecção por LC-MS/MS ESI no modo íon positivo.

Tabela 5 - Concentrações de metabólitos de ansiolíticos e antiepilépticos detectados no meio ambiente, reportadas na literatura.

Fármacos	Metabólitos	Concentrações (ng L <sup>-1</sup> )	Matriz/amostra	Local	Autores
Carbamazepina	Carbamazepina 10,11-epóxido (CBZ-EP)	4,1	Afluente	Canadá	Gebhardt & Schröder, 2007
		880-4026		Espanha	
		52,0	Efluente	Canadá	Gebhardt & Schröder, 2007
		69-2377		Espanha	
		ND	Águas superficiais	Canadá	Gebhardt & Schröder, 2007
	300-500	Espanha		Gómez <i>et al.</i> , 2007	
	10,11-dihidro-10,11- dihidroxiCarbamazepina (CBZ-DiOH)	1570	Afluente		
		1325	Efluente		
	2-hidroxi-carbamazepina (CBZ-2OH)	2,0	Águas superficiais	Canadá	Gebhardt & Schröder, 2007
		120	Afluente		
		130	Efluente		
		ND	Águas superficiais		
	3-hidroxi-carbamazepina (CBZ-3OH)	94,0	Afluente		
		100,0	Efluente		
		ND	Águas superficiais		
10,11-diidro-10-hidroxi-carbamazepina (CBZ-10OH)	8,5	Afluente	Canadá	Gebhardt & Schröder, 2007	
	2000-3700		Alemanha		Hummel <i>et al.</i> , 2006
	9,3	Efluente	Canadá	Gebhardt & Schröder, 2007	
	2000-3600		Alemanha		Hummel <i>et al.</i> , 2006
	ND	Águas superficiais	Canadá	Gebhardt & Schröder, 2007	
58-140	Alemanha		Hummel <i>et al.</i> , 2006		
Dihidro-carbamazepina (DiH-CBZ)	ND-92,0	Afluente	Alemanha	Hummel <i>et al.</i> , 2006	
	ND-90,0	Efluente			
	2,0-4,0	Água superficiais			
	20,0	Água potável			
Diazepam	Oxazepam	860	Afluente	Alemanha	Hummel <i>et al.</i> , 2006
		21-1218		Espanha	Huerta-Fontela <i>et al.</i> , 2010
		630	Efluente	Alemanha	Hummel <i>et al.</i> , 2006
	27-320	Espanha		Huerta-Fontela <i>et al.</i> , 2010	
	400	Águas superficiais	Alemanha	Hummel <i>et al.</i> , 2006	
Temazepam	230	Afluente	Alemanha	Hummel <i>et al.</i> , 2006	
	180	Efluente			
	58	Águas superficiais			

ND: Não detectado

### 3.8 Validação do método

Verificações precisam ser realizadas para garantir que as características de desempenho de um método sejam entendidas e para demonstrar que o método seja cientificamente coerente, sob as condições nas quais ele deve ser aplicado. Essas verificações são conhecidas como validação (ANVISA, 2005).

É fundamental que os laboratórios disponham de meios e objetivos criteriosos para demonstrar, através da validação, que os métodos de ensaio que executam conduzam a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida. Se um método for modificado para atender aos requisitos específicos ou um método novo for desenvolvido, o laboratório deve se assegurar de que as características de desempenho do método atendam aos requisitos para as operações analíticas pretendidas (LEITE, 2002; LANÇAS, 2004).

O procedimento de validação de métodos deve incluir todas as etapas necessárias para demonstrar que os resultados obtidos são confiáveis e reprodutíveis (PASCHOAL & RATH, 2008).

Os parâmetros básicos de desempenho do método a serem aplicadas são: seletividade; faixa de trabalho; linearidade; limite de detecção; limite de quantificação; exatidão; precisão; robustez e incerteza da medição (LEITE, 2002; LANÇAS, 2004; ALBANO & RAYA-RODRIGUEZ, 2009; INMETRO, 2011).

O efeito matriz é uma preocupação constante principalmente quando é utilizada a análise por espectrometria de massas, devido a influência da supressão de íons (BUSETTI *et al.*, 2009). Por ser uma matriz de composição muito complexa o efluente hospitalar pode apresentar efeito matriz, quando são comparados com as soluções padrão em solventes puros, isto pode resultar em valores inexatos (VIENO *et al.*, 2006; WILDE, 2011). Uma das alternativas para resolver este problema seria a utilização de padrões deuterados homólogos, porém devido a algumas dificuldades de disponibilidade ou em função do custo isto torna muitas vezes inviável (BUSETTI *et al.*, 2009). Outra maneira de se fazer a avaliação do efeito matriz é através da intensidade do sinal do analito.

### 3.9 Planejamento fatorial

Nos últimos anos, ferramentas quimiométricas têm sido frequentemente aplicadas à otimização de métodos analíticos, considerando suas vantagens como a redução do número de experimentos, que precisam ser executadas, podendo resultar num menor consumo de reagentes e diminuição do trabalho de laboratorial (PERALTA-ZAMORA *et al.*, 2004). Estes métodos permitem o desenvolvimento de modelos matemáticos que permitem a avaliação da pertinência, bem como a significância estatística efeitos a serem estudados e a avaliação dos efeitos de interação entre estes fatores. Quanto maior os efeitos de interação, maior a diferença que será encontrada, utilizando estratégias de otimização univariada e multivariada. Assim, o procedimento univariado pode falhar, pois o efeito de uma variável pode ser dependente do nível dos outros envolvidos na otimização (FERREIRA *et al.*, 2007).

É por isso que os regimes de otimização multivariada envolvem projetos para que os níveis de todas as variáveis sejam alteradas simultaneamente. O primeiro passo da otimização multivariada é realizada triagem dos fatores estudados (fatorial completo ou fracção fatorial), a fim de obter efeitos significativos da sistema de análise. Depois de determinar os fatores relevantes, as condições ótimas de operação são obtidas usando como matriz Doehlert, delineamentos compostos centrais (CCD) e os projetos em três níveis, tais como a concepção de Box-Behnken (BBD) (FERREIRA *et al.*, 2007).



## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Materiais**

A parte experimental deste trabalho foi realizada no LATER (Laboratório de Pesquisa em Tratamento de Efluentes e Resíduos) e no LAMIC (Laboratório de Análises Micotoxicológicas), ambos da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM.

#### **4.1.1 Aparelhos e acessórios**

- Bomba de infusão Harvard Apparatus (Holliston, MA, USA);
- Cromatógrafo a Líquido Agilent Série 1100 equipado com bomba binária, degaseificador, injetor automático e forno para coluna (Agilent, Palo Alto, CA, USA);
- Cromatógrafo Agilent Série 1200, equipado com bomba binária G1311 A (nº de série DE63061722), degaseificador G1322 A (nº de série JP82011406), injetor automático G1313 A (nº de série DE64558038), forno para coluna G1322 A (nº de série DE90376923, detector de Ultra violeta, Agilent (Agilent, Palo Alto, CA, USA);
- Espectrômetro de massas LC-MSD – 1100 (LC-MS), Agilent (Agilent, Palo Alto, CA, USA);
- Cromatógrafo Agilent Série 1200, equipado com bomba binária G1311 A (nº de série DE63061722), degaseificador G1322 A (nº de série JP82011406), injetor automático G1313 A (nº de série DE64558038), forno para coluna G1322 A (nº de série DE90376923, Agilent (Agilent, Palo Alto, CA, USA), Espectrômetro de massas Applied Biosystems MDS Sciex API 4000\_Qtrap MS/MS equipado com fonte de ionização eletrospray (Foster City, CA, Canadá).

#### 4.1.2 Reagentes e Soluções

Os reagentes e solventes utilizados no preparo das soluções e da fase móvel foram:

- Acetato de Amônio, grau p.a., JT Baker – Mallinckrodt Baker (Mallinckrodt Baker, Xalostoc, México);
- Água ultrapura (18,2  $\mu\Omega\text{cm}$ ) obtida de um sistema Milli-Q de purificação (Millipore, Bedford, MA, USA).
- Metanol, acetonitrila e ácido fórmico, todos grau HPLC, da JT Baker (Mallinckrodt Baker, Xalostoc, México);
- Acetato de etila grau p.a. (Tedia, USA);
- Ácido acético p.a. (Tedia, USA);
- Hidróxido de sódio p.a. (Merck, Alemanha).

#### 4.1.3 Padrões

Os padrões (liofilizados) bromazepam, carbamazepina, clonazepam, lorazepam e diazepam foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA), com pureza de 99,0%.

#### 4.1.4 Colunas cromatográficas

- Para HPLC-UV e LC-MS: Coluna cromatográfica Zorbax SB C<sub>18</sub> 5  $\mu\text{m}$  de 4,6 x 250 mm (Agilent, Palo Alto, CA, USA);

- Para LC-MS/MS: Coluna cromatográfica Zorbax SB C<sub>18</sub> 5  $\mu\text{m}$  de 4,6 x 150 mm (Agilent, Palo Alto, CA, USA).

#### 4.1.5 Membranas de filtração

Para amostras de efluentes foram utilizados na etapa de filtração em papel filtro qualitativo nº 4 (Quimibras Indústrias Químicas S/A, RJ, Brasil) e membranas de poliéster – Chromafil PET 45/15 MS (Macherey-Nagel, Düren, Germany) com diâmetro de 15 mm e poro de 0,45  $\mu\text{m}$ .

#### 4.1.6 Sorventes para extração em fase sólida

- Cartucho comercial Chromabond C<sub>18</sub> tamanho da partícula 45 µm, 500 mg (3 mL) (Macherey-Nagel, Duren, Alemanha).

Foram preparados os cartuchos de extração em fase sólida utilizando diferentes sorventes (*home made*):

- Bond Elut C<sub>18</sub>, tamanho da partícula 50-150 µm, 300 mg (Varian, Harbor City, USA);
- Sílica Gel (C<sub>18</sub>) tamanho da partícula 32-63 µm, 300 mg, e Sílica Gel (C<sub>18</sub>) Premium grade, tamanho da partícula 40-63 µm, 300 mg Sorbent Technologies (Merck Brasil, Jacarepaguá, RJ, Brasil);
- Strata Florisil (FL – PR) tamanho da partícula 75-150 µm, 300mg (Phenomenex, California, USA);

#### 4.1.7 Amostragem

##### Amostragem do efluente para determinação por HPLC-UV e LC-MS

- Foram coletadas amostras de efluente do pronto atendimento do HUSM durante 3 dias de 4 em 4 horas das 8:00-20:00 h.

##### Amostragem do efluente para determinação por LC-MS/MS

- Foram coletadas amostras de efluente do pronto atendimento do HUSM e do efluente geral durante 7 dias de 4 em 4 horas das 8:00-20:00 h.

#### 4.2 Métodos

##### 4.2.1 Preparo das soluções padrão

- Para o preparo da solução estoque foi pesado cada fármaco, e foram dissolvidos individualmente em metanol em balão volumétrico de 10 mL (1000 µg L<sup>-1</sup>) e mantidas sob refrigeração à 2-5° C.

- A solução intermediária foi preparada através da diluição da solução estoque ( $100 \mu\text{g L}^{-1}$ , em metanol). Esta solução foi usada para a fortificação das amostras e preparo das diluições para as curvas analíticas.

#### **4.2.2 Determinação de ansiolíticos e antiepilépticos utilizando cromatografia líquida com detecção por UV**

##### **4.2.2.1 Avaliação de sorventes confeccionados *home-made* para extração em fase sólida**

Para a confecção dos cartuchos de extração em fase sólida utilizou-se um tubo de polipropileno onde foi colocado um filtro de polietileno dentro do cartucho vazio e a seguir foram pesados 300 mg de sorvente (conforme item 4.1.6), entre dois filtros de polietileno, também foi utilizado uma coluna de SPE  $\text{C}_{18}$  (Chromabond  $\text{C}_{18}$ ) contendo 500 mg de sorvente. O experimento foi realizado com três repetições para cada tipo de sorvente, sendo escolhidos aqueles que apresentaram melhor recuperação, para a realização do experimento de otimização da metodologia.

Para avaliação preliminar utilizou-se uma alíquota de 100 mL de água Milli-Q e uma amostra de efluente hospitalar (coletado na canalização do esgoto do PA-HUSM), sendo fortificadas com solução padrão na concentração de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  (para todos os compostos). O procedimento de extração foi baseado no que foi preconizado por Shucara (2007), as amostras foram analisadas em triplicata.

##### **4.2.2.2 Otimização da metodologia**

A otimização foi realizada através de um planejamento fatorial com a seleção de quatro parâmetros, em diferentes níveis (Tabela 6), que poderiam afetar a eficiência na extração e pré-concentração da amostra. Os parâmetros e níveis avaliados foram: pH da amostra; sorvente de extração; volume de solvente para eluição da amostra e volume de capacidade do sorvente. Para otimização da metodologia foi utilizado como matriz “Branco” de água fortificada artificialmente na concentração de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  (para todos os compostos).

Tabela 6 – Variáveis e níveis estudados para a otimização da metodologia para a determinação dos fármacos psicoativos por SPE e HPLC-UV.

Variáveis	Níveis avaliados		
	-1	Ponto Central (0)	+1
pH da amostra	5,0	7,0	9,0
Volume de solvente (mL)	2,0	3,0	5,0
Sorvente	Sílica Gel (C18) Premium grade	Sílica Gel (C <sub>18</sub> )	Bond Elut C <sub>18</sub>
Capacidade de sorção (mL)	50,0	100,0	250,0

#### 4.2.2.3 Quantificação de fármacos psicoativos utilizando HPLC-UV

Foram preparadas soluções padrão dos ansiolíticos e antiepilépticos, na concentração de  $50 \mu\text{g L}^{-1}$ , a partir da solução padrão intermediária (conforme item 4.2.1) e procedeu-se a análise cromatográfica para avaliar as condições ideais de trabalho.

##### a) Escolha da fase móvel, da vazão e do comprimento de onda

Para a escolha da fase móvel avaliou-se diferentes composições e também foram avaliadas as seguintes vazões 0,5; 0,6; 0,7 e  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ .

- **Fase móvel A** – Modo isocrático - Ácido acético 1%: MeOH (50:50, v/v) por 30 minutos.

- **Fase móvel B** – Modo gradiente: Ácido acético 1%:metanol (50:50, v/v), durante 11 minutos, após passa para ácido acético 1%:MeOH (20:80, v/v) até 15 minutos; retorno proporção ácido acético 1%: MeOH (50:50, v/v) por 4 minutos (para equilíbrio e estabilização do sistema), totalizando um tempo de análise de 19 minutos.

- **Fase móvel C** - Modo isocrático - Ácido acético 1%:acetonitrila (50:50, v/v) por 17 minutos.

Foram avaliados diferentes comprimentos de onda para estabelecer qual oferecia melhor detectabilidade para a determinação de fármacos psicoativos, através do espectro UV-Vis. Empregou-se uma solução padrão de ansiolíticos e antiepilépticos, na concentração de  $150 \mu\text{g L}^{-1}$  (para todos os compostos) a partir da solução padrão estoque (conforme item 4.2.1).

## **b) Escolha do solvente de eluição**

Utilizou-se uma amostra de água ultrapura e uma amostra de efluente hospitalar (coletado na canalização do esgoto do PA-HUSM), sendo fortificadas com solução padrão na concentração de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ . As amostras foram analisadas em triplicata.

As seguintes composições de solventes foram avaliadas:

- Metanol:acetato de etila (50:50, v/v);
- Acetonitrila:acetato de etila (50:50, v/v);
- Metanol;
- Acetonitrila;
- Metanol:ácido acético (0,1%) (80:20, v/v);
- Metanol:hidróxido de sódio (0,1%) (80:20, v/v).

## **c) Procedimentos de extração, purificação e análise utilizando HPLC-UV para ansiolíticos e antiepilépticos**

Para a etapa de extração e limpeza dos extratos contendo a mistura de ansiolíticos e antiepilépticos utilizou-se uma adaptação da metodologia preconizada por Schucara (2007). Para a adequação da metodologia foi utilizada uma amostra de água ultrapura e uma amostra de efluente hospitalar (coletado na canalização do esgoto do PA-HUSM), sendo fortificada com solução padrão na concentração de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ . Para ajuste do pH foi utilizado ácido acético (0,1%) ou hidróxido de sódio (0,1%).

As amostras foram filtradas em papel filtro qualitativo nº 4 e após foram submetidas a filtração à vácuo em membranas de poliéster Chromafil de porosidade  $0,45 \mu\text{m}$ , as amostras foram analisadas em triplicata. Na Figura 9 está o fluxograma da extração em fase sólida dos ansiolíticos e antiepilépticos para a determinação por HPLC-UV, LC-MS e LC-MS/MS.

### **Procedimento:**

- 1) Utilizou-se 300 mL de efluente hospitalar do PA-HUSM mantendo-se o pH em 7,0;

- 2) Para o condicionamento do cartucho de extração em fase sólida (C<sub>18</sub> Premium) eluiu-se 10 mL de metanol e após 10 mL de água Milli-Q (pH = 2,0);
- 3) As amostras foram eluídas lentamente pelo sistema *Manifold*;
- 4) Lavagem do cartucho com 10 mL de água:metanol (95:5, v/v);
- 5) A secagem do sorvente foi realizada à vácuo;
- 6) A eluição dos compostos foi feita com 5 mL de metanol:ácido acético (0,1%) (80:20, v/v), repetiu-se novamente esta etapa (2 vezes);
- 7) Juntaram-se os eluatos e evaporou-se com o auxílio de uma chapa de aquecimento (50 °C) e fluxo de nitrogênio.
- 8) A reconstituição do extrato foi feita com 500 µL de metanol.

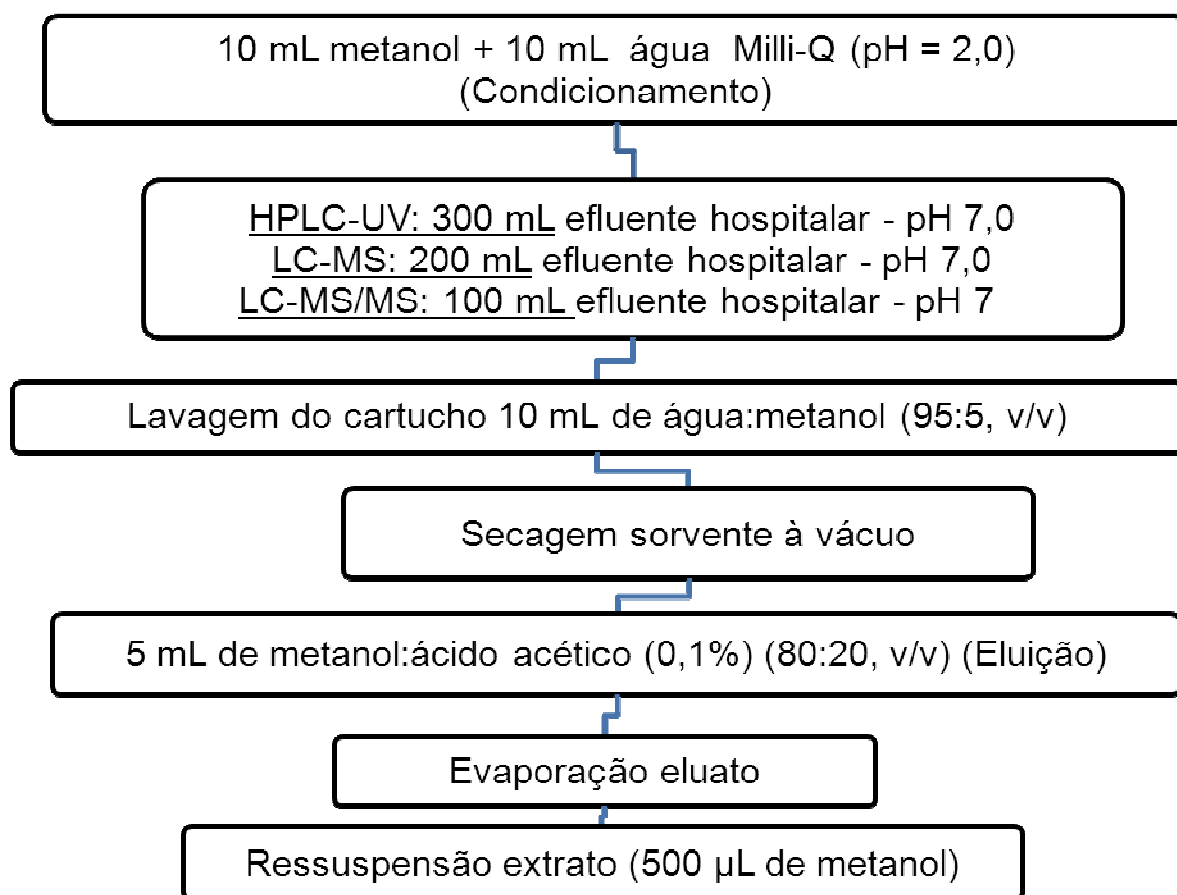


Figura 9 – Fluxograma da extração em fase sólida dos ansiolíticos e antiepilépticos para a determinação por HPLC-UV, LC-MS e LC-MS/MS.

Obs.: Volume de efluente utilizado:

- para determinação por HPLC-UV = 300 mL; fator de concentração 600 vezes;
- para determinação por LC-MS = 200 mL; fator de concentração 400 vezes;
- para determinação por LC-MS/MS = 300 mL; fator de concentração 200 vezes.

#### **d) Determinação da concentração de bromazepam, carbamazepina, clonazepam, lorazepam e diazepam no efluente PA-HUSM por HPLC-UV**

Os experimentos foram realizados utilizando-se amostras do efluente lançado pelo Hospital Universitário da Universidade de Santa Maria (HUSM) coletadas no Ponto A – Efluente do Pronto Atendimento (PA-HUSM) de 23 a 25 de abril de 2010.

Nas determinações cromatográficas utilizou-se cromatógrafo Agilent Série 1100, equipado com bomba quaternária, degaseificador, injetor automático e forno para coluna.

As condições cromatográficas (conforme item 4.2.2.2) utilizadas para a determinação analítica das concentrações dos ansiolíticos e antiepilépticos citados foram as seguintes: coluna cromatográfica Zorbax SB C18 5  $\mu\text{m}$  (4.6 x 250 mm) e fase móvel acetonitrila:ácido acético 0,1%, na proporção 50:50 v/v, conforme Shucara (2007).

Operando-se com vazão de 700  $\mu\text{L min}^{-1}$ , com tempo de corrida de 17 min. O forno da coluna foi mantido na temperatura de 40  $^{\circ}\text{C}$ , o volume de injeção utilizado foi de 20  $\mu\text{L}$ . Os analitos foram detectados no comprimento de onda de 220 nm.

#### **4.2.3 Determinação de ansiolíticos e antiepilépticos utilizando Cromatografia Líquida com espectrometria de massas – LC-MS**

Foram preparadas soluções padrões dos ansiolíticos e antiepilépticos, na concentração de 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  (diluição da solução estoque), os procedimentos de extração e purificação foram os mesmos descritos no item 4.2.2.2, porém o volume de efluente utilizado foi de 200 mL (Figura 9). Os parâmetros do espectrômetro de massas foram obtidos através de infusão da solução padrão dos compostos na concentração de 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

##### **4.2.3.1 Adequação dos parâmetros do espectrômetro de massas para a análise de ansiolíticos e antiepilépticos por LC-MS**

Para a adequação das condições do espectrômetro de massas (LC-MS) foram feitas infusões, ou seja, injeções diretas no espectrômetro de massas, com



soluções padrões dos ansiolíticos e antiepilépticos, na concentração de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ , de cada fármaco individualmente.

A partir das infusões foi escolhido o modo de ionização da fonte, voltagem do capilar, o fragmento, o ganho, o fluxo do gás de secagem, a pressão de nebulização e a temperatura do gás de secagem.

#### **4.2.3.2 Determinação da concentração de bromazepam, carbamazepina, clonazepam, lorazepam e diazepam no efluente PA-HUSM por LC-MS.**

Os experimentos foram realizados utilizando-se amostras do efluente lançado pelo Hospital Universitário da Universidade de Santa Maria (HUSM) coletadas no Ponto A – Efluente do Pronto Atendimento (PA-HUSM) de 09 a 11 de outubro de 2011.

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo Agilent Série 1100, equipado com bomba quaternária, degaseificador, injetor automático, forno para coluna e espectrômetro de massas (LC-MS).

Os parâmetros cromatográficos utilizados foram os seguintes: coluna cromatográfica Zorbax SB C<sub>18</sub> 5  $\mu\text{m}$  (4,6 x 250 mm) e fase móvel acetonitrila: acetato de amônio  $0,005 \text{ mol L}^{-1}$  (50:50, v/v), conforme adaptações do método preconizado por Marchi *et al.* (2009), operando-se com vazão de  $700 \mu\text{L min}^{-1}$ . O tempo total de análise foi de 15 minutos e o modo de eluição da fase móvel foi isocrático. O forno da coluna foi mantido na temperatura de  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ , e o volume de injeção utilizado foi de  $25 \mu\text{L}$ . Os parâmetros do espectrômetro de massas foram obtidos através de infusão da solução padrão dos compostos na concentração de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ .

#### **4.2.4 Determinação de ansiolíticos e antiepilépticos utilizando cromatografia líquida com espectrometria de massas – LC-MS/MS**

Foram preparadas soluções padrão dos ansiolíticos e antiepilépticos, na concentração de  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  em metanol. Os procedimentos de extração e limpeza dos extratos foram os mesmos descritos no item 4.2.2.2, e o volume de efluente utilizado foi de 100 mL (Figura 9).

#### 4.2.4.1 Adequação dos parâmetros do espectrômetro de massas e fonte de ionização

Para a adequação das condições do espectrômetro de massas (LC-MS/MS) foram feitas infusões no equipamento, com soluções padrão dos ansiolíticos e antiepilépticos, na concentração de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ , de cada fármaco individualmente.

As condições cromatográficas para a determinação analítica das concentrações dos ansiolíticos e antiepilépticos foram as seguintes: cromatógrafo Agilent Série 1200, equipado com bomba binária, degaseificador, injetor automático, forno para coluna, espectrômetro de massas API 4000\_QTrap e a coluna cromatográfica Zorbax SB C<sub>18</sub> 5  $\mu\text{m}$  e 4,6 x 150 mm.

Operou-se com vazão de  $700 \mu\text{L min}^{-1}$ , com tempo de corrida de 15 min. O forno da coluna foi mantido na temperatura de  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , conforme Ishida *et al.* (2009). O volume de injeção utilizado foi de 20  $\mu\text{L}$ .

Para a determinação dos compostos em estudo em efluente hospitalar foi utilizado espectrômetro de massas API 4000\_QTrap quadrupolo linear híbrido, equipado com fonte de ionização electrospray (ESI) operando em modo positivo

#### 4.2.4.2 Fase móvel

Foram avaliadas diferentes concentrações de ácido fórmico para composição da fase móvel (0,5; 1 e 2%), conforme adaptações preconizadas por Buseti *et al.* (2009) e Gebhardt & Schroder (2007).

A fase móvel utilizada foi: Fase móvel A: água:ácido fórmico 1% (99:1; v/v) e a fase móvel B: metanol:ácido fórmico 1% (99:1; v/v) sendo eluídas no modo gradiente por 15 minutos, temperatura da coluna:  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ , na Tabela 7 estão descritas a composição da fase móvel.

Tabela 7 - Composição da fase móvel para determinação de ansiolíticos e antiepilépticos

Tempo de retenção (min)	Fase A (mL)	Fase B (mL)	Vazão (mL min <sup>-1</sup> )
0,00-5,50	85,0	15,0	0,7
5,51-8,00	20,0	80,0	0,7
8,01-11,00	10,0	90,0	0,7
11,01-13,00	100,0	0,0	0,7
13,01-15,00	85,0	15,0	0,7

#### 4.2.4.3 Determinação da concentração de bromazepam, carbamazepina, clonazepam, lorazepam e diazepam no efluente do Hospital Universitário por LC-MS/MS

Os experimentos foram realizados utilizando-se amostras do efluente lançado pelo Hospital Universitário da Universidade de Santa Maria (HUSM) em dois pontos Ponto A – Efluente do Pronto Atendimento (PA-HUSM) e Ponto B – Efluente Geral. As coletas foram realizadas de 29 agosto a 4 de setembro de 2011, durante 7 dias, de segunda a domingo.

A seguir as amostras foram preparadas conforme descrito no item 4.2.2.2, o pH foi ajustado para pH 7 as amostras foram medidas em triplicata sem adição de padrão. Para ajuste do pH fui utilizado ácido acético (0,1%) ou hidróxido de sódio (0,1%).

#### 4.2.4.4 Identificação dos metabólitos de bromazepam, carbamazepina, clonazepam, lorazepam e diazepam

Para a identificação dos metabólitos no efluente PA-HUSM e no efluente geral desenvolveu-se experimentos de IDA (do inglês *Information-Dependent Acquisition* – informação dependente da aquisição); *Enhanced MS* (EMS), seguido de *Enhanced Product Ion* (EPI); monitoramento múltiplo de reações (MRM) seguido de EPI com 3 energias de colisões (20, 40 e 60 V); seguido de EPI e íon precursor (PI) seguido de EPI; o volume de injeção utilizado foi de 25 µL.

A coleta está descrita nos itens 4.1.7.3 e o preparo das amostras (no item 4.2.4). As condições cromatográficas utilizadas na identificação dos metabólitos estão descritas no item (4.2.4.4).

### **4.3 Validação do método de determinação de ansiolíticos e antiepilépticos**

Os testes foram desenvolvidos conforme a recomendações da ANVISA (2005), Albano & Raya-Rodriguez (2009) e INMETRO (2011).

#### **4.3.1 Seletividade**

A seletividade foi avaliada pelas análises dos cromatogramas de padrões, e comparação com uma amostra de efluente fortificado com padrão, para verificação da presença ou não de interferentes. Foi feita também a comparação da curva na matriz (efluente) e sem a matriz.

#### **4.3.2 Sensibilidade e linearidade**

Para avaliar a sensibilidade foram elaboradas curvas analíticas de uma solução de padrões de fármacos psicoativos preparados conforme descrito no item 4.2.1 em metanol e outra curva preparada na matriz (efluente). As concentrações utilizadas para a confecção das curvas analíticas estão descritas na Tabela 8, e foram feitas em triplicatas.

A linearidade foi avaliada através do cálculo do modelo da regressão linear e para verificar a ausência de valores discrepantes e a homocedasticidade da variância foi feito por meio do teste de Cochran (ALBANO & RAYA-RODRIGUEZ, 2009).

Tabela 8 - Concentrações de padrões de ansiolíticos e antiepilépticos utilizados na curva ( $\text{ng L}^{-1}$ ).

Metodologia	Nível	Bromazepam ( $\text{ng L}^{-1}$ )	Carbamazepina ( $\text{ng L}^{-1}$ )	Clonazepam ( $\text{ng L}^{-1}$ )	Diazepam ( $\text{ng L}^{-1}$ )	Lorazepam ( $\text{ng L}^{-1}$ )
HPLC-UV	6	2000-50000	5000-60000	2000-50000	10000-60000	2000-50000
LC-MS	7	400-12500	400-12500	400-12500	400-12500	400-12500
LC-MS/MS	7	30-1500	50-2500	30-2500	40-2500	30-2000

Obs.: As concentrações dos padrões utilizadas para a curva pela metodologia HPLC-UV não foram a mesma para todos os compostos devido a detectabilidade do equipamento.

#### 4.3.3 Faixa de trabalho e faixa linear de trabalho

A 1ª etapa foi feita através das análises independentes da curva sem matriz com adição de sete concentrações e a 2ª etapa todas estas análises foram feitas em triplicatas de sete concentrações.

#### 4.3.4 Limite de detecção e limite de quantificação

Para a determinação dos limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) utilizou-se como parâmetro de avaliação a relação sinal-ruído, pela injeção dos padrões analíticos em triplicata, visando 3 vezes o sinal/ruído para o LOD e 10 vezes o sinal/ruído para o LOQ.

Para confirmação dos limites de detecção e de quantificação, foram feitas sete análises independentes para atender um nível de confiança de 99% da amostra sem o analito e com o analito, na menor concentração.

Foram realizadas análises independentes de sete replicatas para atender a um nível de confiança de 99%.

#### 4.3.5 Exatidão (Ensaio de recuperação)

Para avaliar a exatidão do método fortificaram-se as amostras de efluente hospitalar na faixa de concentração descrita na Tabela 9, e analisadas em triplicata

Tabela 9 - Concentrações de padrões de ansiolíticos e antiepilépticos utilizados na avaliação dos ensaios de recuperação ( $\text{ng L}^{-1}$ ).

Metodologia	Nível	Bromazepam	Carbamazepina	Clonazepam	Diazepam	Lorazepam
HPLC-UV	6	2500-50000	5000-50000	2500-50000	10000-50000	2500-50000
LC-MS	7	600-10000	600-10000	600-10000	600-10000	600-10000
LC-MS/MS	7	40-1200	50-2000	40-1600	50-2000	40-2000

#### 4.3.6 Precisão (repetitividade e precisão intermediária)

O estudo da precisão do instrumento foi realizado efetuando-se 6 injeções de cada concentração das soluções analíticas no sistema HPLC-UV, LC-MS e LC-MS/MS.

Para avaliar a precisão intermediária, as amostras foram analisadas em dias diferentes. Para determinar a repetitividade ( $\text{RSD}_r$ ) e a Precisão intermediária ( $\text{RSD}_{pi}$ ), foram analisadas um conjunto de amostras fortificadas em 3 níveis, cada nível foi analisado em sete réplicas independentes.

#### 4.3.7 Efeito matriz

As amostras de efluente foram coletadas e filtradas (conforme item 4.1.7). Em seguida foi realizada a técnica de SPE (conforme item 4.2.2). O cálculo do efeito de matriz sobre a determinação dos fármacos psicoativos foi feito conforme a Equação 3 (VIENO *et al.*, 2006).

$$ME(\%) = \frac{A_{std} - (A_a - A_b)}{A_{std}} \cdot 100 \quad (3)$$

Onde: - ME(%) é o efeito de matriz em percentagem;

- $A_{std}$  é a área do pico do analito em solvente puro;
- $A_a$  é a área do pico da matriz enriquecida com o analito;
- $A_b$  é a área do pico da matriz sem enriquecimento.

#### 4.4 Avaliação de risco preliminar da exposição de ansiolíticos e antiepilépticos no meio ambiente – caso HUSM

Nesse estudo uma maior atenção foi dada aos cálculos para a estimativa de ansiolíticos e antiepilépticos lançados pelo HUSM para o sistema de esgotos e em águas superficiais. O consumo de água do HUSM é em torno de 1,3 m<sup>3</sup> por paciente por dia e, segundo Vasconcelos *et al.* (2009), o lançamento de esgoto do HUSM possui um fluxo médio de aproximadamente 190 m<sup>3</sup> dia<sup>-1</sup>. Os fármacos escolhidos para esse estudo, bromazepam, carbamazepina, clonazepam, diazepam e lorazepam são os ansiolíticos e antiepilépticos mais usados pelo HUSM.

Para a predição foram considerados alguns critérios, tal como o “pior caso” (Carlsson *et al.*, 2006). Para os cálculos de PEC as seguintes situações foram admitidas: (1) todo o fármaco receitado foi usado para o tratamento no hospital; (2) a fração de fármacos excretada foi lançada no sistema de esgotos; (3) sem transformações dos fármacos após a excreção no sistema de esgotos e (4) o padrão de uso foi distribuído uniformemente temporal e espacialmente.

Para a predição em águas superficiais, riacho ou córrego, onde os esgotos do HUSM são lançados após passar pela fossa séptica com filtro anaeróbico, o fator de diluição (10) foi inserido na Equação 2, resultando então na Equação 4.

$$PEC_{corr.} = \frac{A \cdot E}{V_{EFL} \cdot 365 \cdot D} \quad (4)$$

O quociente de risco de cada fármaco foi calculado dividindo PEC por PNEC.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Determinação de ansiolíticos e antiepilépticos utilizando HPLC-UV

#### 5.1.1 Ensaios Preliminares

##### 5.1.1.1 Avaliação dos sorvente e a da influência do pH, utilizando a extração em fase sólida

Uma das maiores dificuldades em desenvolver um método de análise multi-resíduo empregando extração em fase sólida é encontrar o sorvente adequado, que apresente condições ideais de extração dos compostos, de modo a promover uma recuperação aceitável para a maioria dos analitos. Neste estudo, cinco sorventes foram avaliados (conforme item 4.2.2.1).

Na Figura 10, pode-se observar que taxas de recuperação dos analitos (superiores a 80%) não foram afetadas drasticamente pela variação do pH, o que confirma os resultados encontrados por Shucara (2007). Comprova-se, também, que o melhor desempenho foi obtido em pH 7,0, o qual apresentou uma recuperação de 101% ( $\pm 5\%$ ).

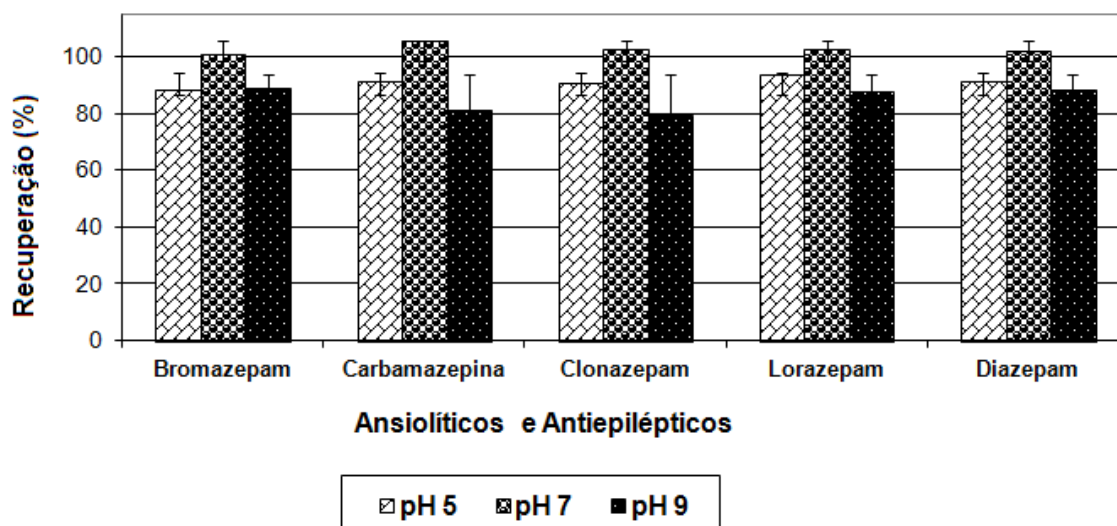


Figura 10 - Avaliação da variação do pH para a determinação de ansiolíticos e antiepilépticos. Condições: solução aquosa fortificadas com  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de padrão (metanol).



Com base nos resultados expostos acima, foram feitos experimentos preliminares em que foram utilizadas como variáveis fixas: o pH 7, uso de metanol como solvente de eluição, volume de amostra de 100 mL, volume de solvente de eluição de 5 mL.

Segundo Queiroz et al. (2001), os compostos com grupos hidrofóbicos que possuem anéis aromáticos, como os fármacos psicoativos, são melhores extraídos através do uso de sorventes de fase reversa e solventes polares. Outro fator determinante é que a matriz (efluente), na qual encontram-se os fármacos, é aquosa. Isto foi comprovado pelas melhores recuperações nestas condições, justificando os resultados determinados na Figura 11, em que os sorventes apolares Bond Elut, C<sub>18</sub> Premiun Grade e C<sub>18</sub> apresentaram recuperações maiores que 75%, destacando-se que o sorvente C<sub>18</sub> Premiun Grade apresentou o melhor desempenho.

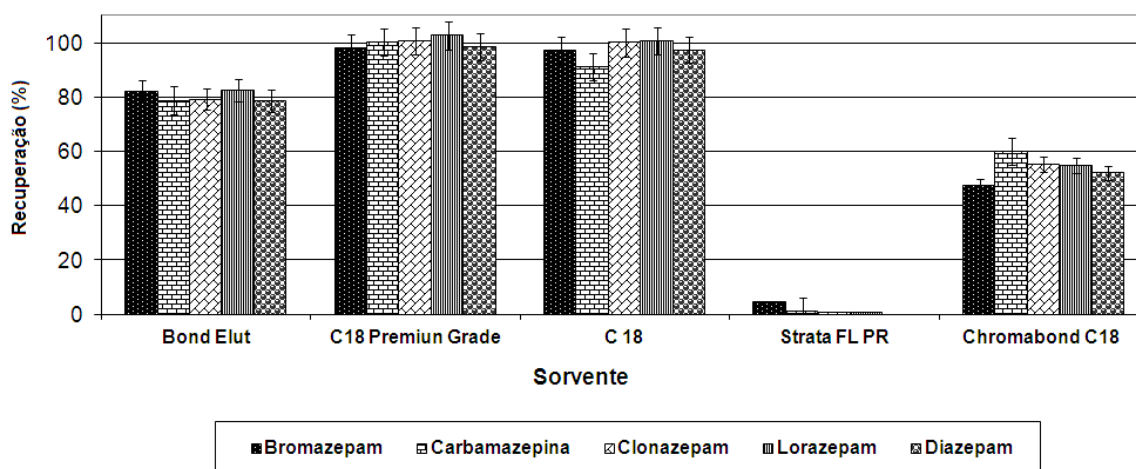


Figura 11 - Avaliação de diferentes sorventes para determinação de ansiolíticos eantiepilépticos. Condições: solução aquosa fortificada com  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de padrão (metanol).

Dessa forma constatou-se que o sorvente Strata FL PR (polar) apresentou uma recuperação inferior a 15%, de modo que a oferecer, portanto uma baixa eficiência, provavelmente, devido à ocorrência da maior interação dos compostos com este sorvente dificultando sua eluição.

O sorvente Bond Elud é uma resina polimérica com exterior hidroxilado e estrutura de poros. Os sorventes que obtiveram recuperação acima de 75% foram utilizados para o planejamento fatorial.

### 5.1.1.2 Avaliação da fase móvel e comprimento de onda

Conforme descrito no item 4.2.2.2, foram avaliadas três fases móveis para determinação em HPLC-UV.

Na composição da fase móvel A, foi empregado o ácido acético 1%:metanol (50:50, v/v) utilizando o modo isocrático, o que demonstrou a ocorrência de uma boa separação entre os compostos. Porém o tempo de análise foi maior (30 minutos).

Na fase móvel B, utilizou-se ácido acético 1%:metanol (50:50, v/v), com a eluição por gradiente, não foi adequada, pois promoveu o alargamento e a sobreposição de picos, impossibilitando sua separação.

Já na fase móvel C, foi utilizado o ácido acético 1%:acetonitrila (50:50, v/v), apresentando ótima resolução, não só em relação aos picos que estão simétricos, mas também ao tempo de eluição de 17 minutos. A vazão que apresentou melhor desempenho foi  $0,7 \text{ mL min}^{-1}$ .

O melhor resultado obtido ocorreu ao se utilizar o comprimento de onda 220 nm para todos os fármacos, semelhante ao utilizado por Jinno et al. (1998). Já para Yoshida et al. (2006), os melhores resultados foram obtidos em 215 nm e para Borges et al. (2009) 245 nm.

### 5.1.1.3 Condicionamento do sorvente e escolha do solvente utilizado na eluição da SPE

O condicionamento do cartucho tem por objetivo preparar o sorvente para interagir com os analitos. O solvente de condicionamento serve, portanto, para ordenar a cadeia hidrocarbonada, aumentando a superfície disponível para a interação com o analito. Além disso, o condicionamento deve manter o adsorvente úmido durante e após esta etapa, de modo a evitar, assim a formação de canais preferenciais que conduzam ao insucesso da extração (PEDROSO, 2007).

Conforme Araujo (2004), a ativação do sorvente com o metanol permite que as cadeias alquílicas, da sílica C<sub>18</sub>, quimicamente ligadas à sílica, sejam solvatadas e assim se estendam formando uma cerda. Ao aumentar a área superficial do sorvente, é possível obter um bom contato entre os analitos, pois os poros estão localizados na parte interna e é imprescindível que a fase líquida penetre neles. A permeação é assegurada pela molhabilidade do polímero, primeiro com um solvente

orgânico, miscível em água. A adição da água, em maior quantidade, desloca o solvente orgânico da ativação o que possibilita a ocupação entre as moléculas orgânicas da fase sólida solvatada, permitindo o contato dos analitos com a fase sólida.

A escolha do solvente de eluição é importante, pois se deve eluir somente os analitos de interesse, eliminando os interferentes que não tenham sido retirados na etapa anterior.

Analisando a Figura 12, pode-se observar que os melhores resultados foram obtidos com metanol:ácido acético 0,1%, (80:20 v/v), diferentemente dos experimentos realizados por Shucara (2007), que obtiveram as melhores recuperações para carbamazepina ao utilizar a composição B (acetonitrila:acetato de etila, 50:50, v/v).

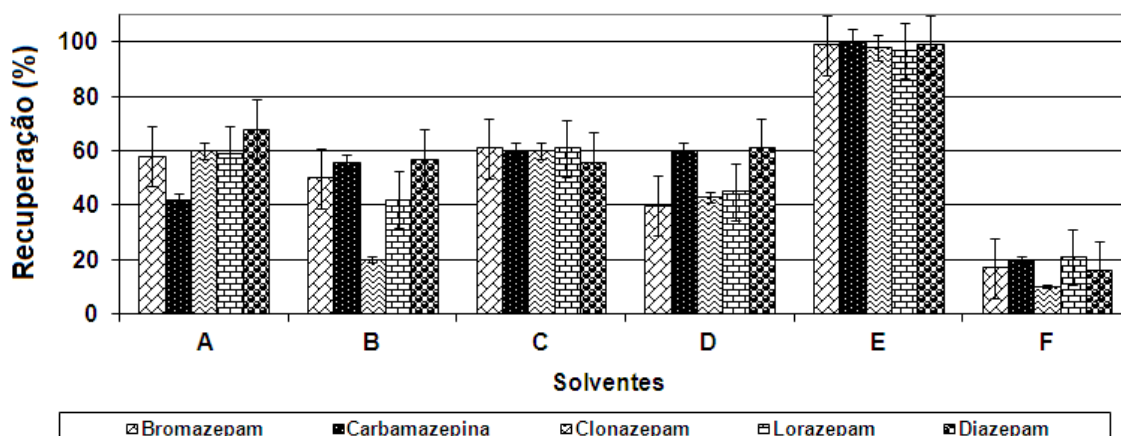


Figura 12 - Resultados obtidos para a avaliação da variável solvente de eluição do analito. Sendo (A) metanol:acetato de etila (50:50 v/v); (B) acetonitrila:acetato de etila (50:50 v/v); (C) metanol; (D) acetonitrila; (E) metanol:ácido acético (0,1%) 80:20 v/v; (F) metanol:hidróxido de sódio (0,1%) 80:20 v/v

Nos testes preliminares que foram realizados obtiveram-se os seguintes resultados: quando se utiliza a eluição somente com acetonitrila, sem o meio ácido, as taxas de recuperação ficaram entre 40-60% ( $\pm 5\%$ ), com o uso somente de metanol a recuperação aumentou para aproximadamente 60%. Quando o metanol foi acidificado a taxa de recuperação ficou entre 98-100%.

O uso do metanol como eluente foi em função de sua alta força eluotrópica, a qual promove a desestabilização das interações entre a amostra e o sorvente

(WILDE, 2011). As melhores recuperações obtidas com a acidificação do metanol são explicadas porque o pka dos benzodiazepínicos fica entre 1,3-3,3 e a carbamazepina possui dois pkas um devido ao grupamento cetônico de 2,45 e o outro de 13,9 do grupamento amina. Assim, o uso de um eluente com pH ácido intensifica a dissociação dos compostos facilitando sua eluição, porque o pH apresenta influência sobre a estrutura dos analitos e dos sítios de ligação dentro das nanocavidades, formando moléculas que estão protonadas (FREITAS *et al.*, 2009).

### 5.1.2 Otimização multivariada feita através de planejamento fatorial

O planejamento fatorial foi realizado utilizando-se o programa *Statistic*. A matriz (efluente) obtida através dos experimentos, realizados de maneira aleatória, a fim de garantir os resultados, está apresentada na Tabela 6.

Observando-se a Figura 13, pode-se perceber que a única variável que apresentou influência significativa no processo foi o sorvente, uma vez que o comportamento de todos os composto foi semelhante.

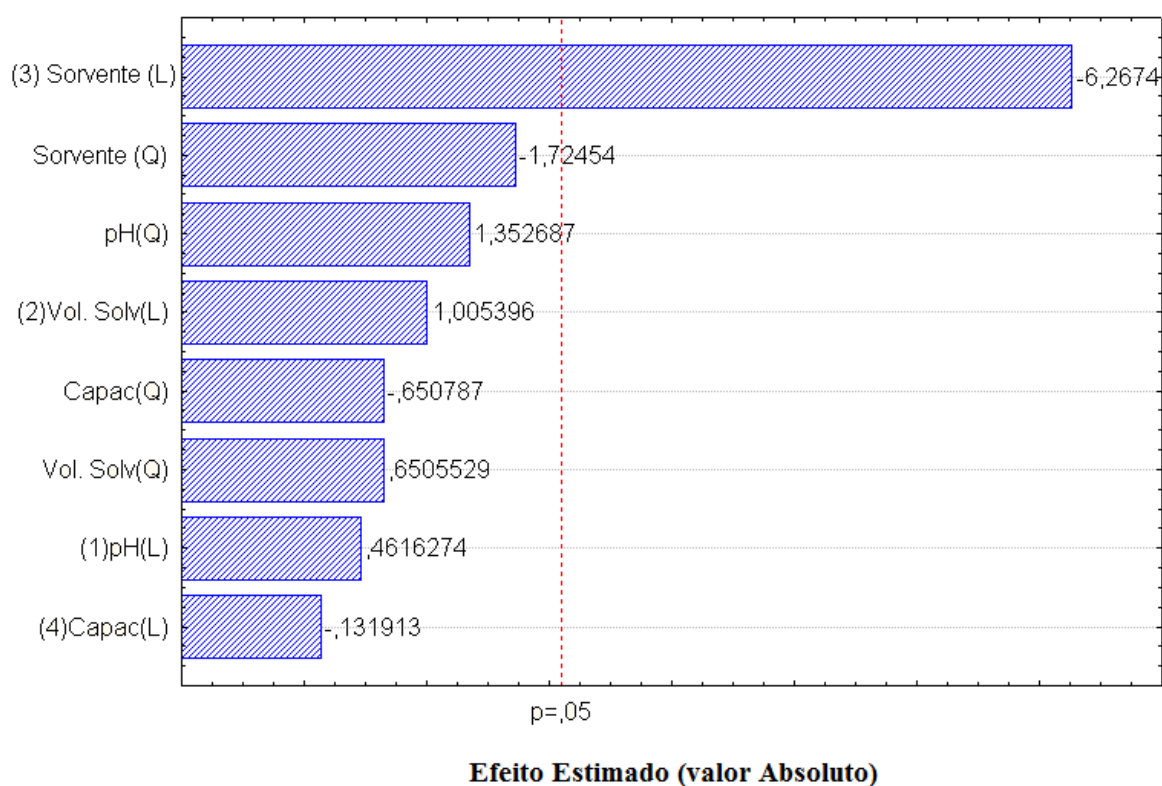


Figura 13 - Gráfico de Pareto apresenta as variáveis e suas influências no processo. Linha vertical no diagrama define o nível de 95% de confiança, (L) significa variável linear e (Q) significa variável Quadrática.

As demais variáveis e suas correlações não apresentaram uma significativa influência nos valores obtidos. Estes dados são condizentes com o que relata Shucara (2007), o qual afirma que o sorvente apresenta influência sobre os resultados.

### **5.1.3 Superfície de Resposta para a SPE de bromazepam, carbamazepina, clonazepam, diazepam e lorazepam**

Por meio da análise de superfícies de resposta (representados na forma de diagrama de contornos) na Figura 14, observa-se os resultados obtidos para bromazepam. Esses resultados foram semelhantes para os demais compostos (ver Apêndice de 1 a 4). A variável sorvente atua de maneira negativa (conforme diagrama de paretos – Figura 13) o que se comprova mediante a comparação do sorvente com as outras variáveis.

Pode-se afirmar que o parâmetro mais crítico foi obtido ao se utilizar o sorvente 1 (Sílica C<sub>18</sub> Premium), pois, em todas as comparações feitas com esta variável, observou-se os melhores resultados de recuperação.

O comportamento de um composto químico no meio ambiente pode ser fortemente influenciado pelas suas propriedades físico-químicas, como a solubilidade em água, a polaridade e o coeficiente de partição octanol-água ( $K_{ow}$ ). Isso se deve ao fato de  $K_{ow}$  estar relacionado com a interação do composto em estudo com o meio, no que diz respeito à absorção e ao transporte (CUNHA, 2005). Conforme podem ser observados na Tabela 2, os ansiolíticos e antiepiléticos estudados são compostos medianamente polares por apresentarem valores de log  $K_{ow}$  entre 1,7 e 3, apresentando, portanto, uma melhor interação com os sorventes apolares onde se obteve a maior recuperação.

Estes resultados comprovam os relatos de Wu *et al.* (2008), os quais enfatizam que os compostos (benzodiazepínicos), nas condições ácidas e neutras são melhores eluídos com esses sorventes. Geralmente, o pH controla a ionização de compostos polares e, dessa forma, afeta a sua hidrofobicidade e interação com o sorvente. A interação por força de van der Waals é o principal mecanismo em sorventes apolares, como o C<sub>18</sub>. Porém, também ocorrem interações secundárias

como ligações dipolo-dipolo e ligações de hidrogênio. Dessa forma, os compostos devem estar principalmente na forma não ionizada (HENNION, 1999).

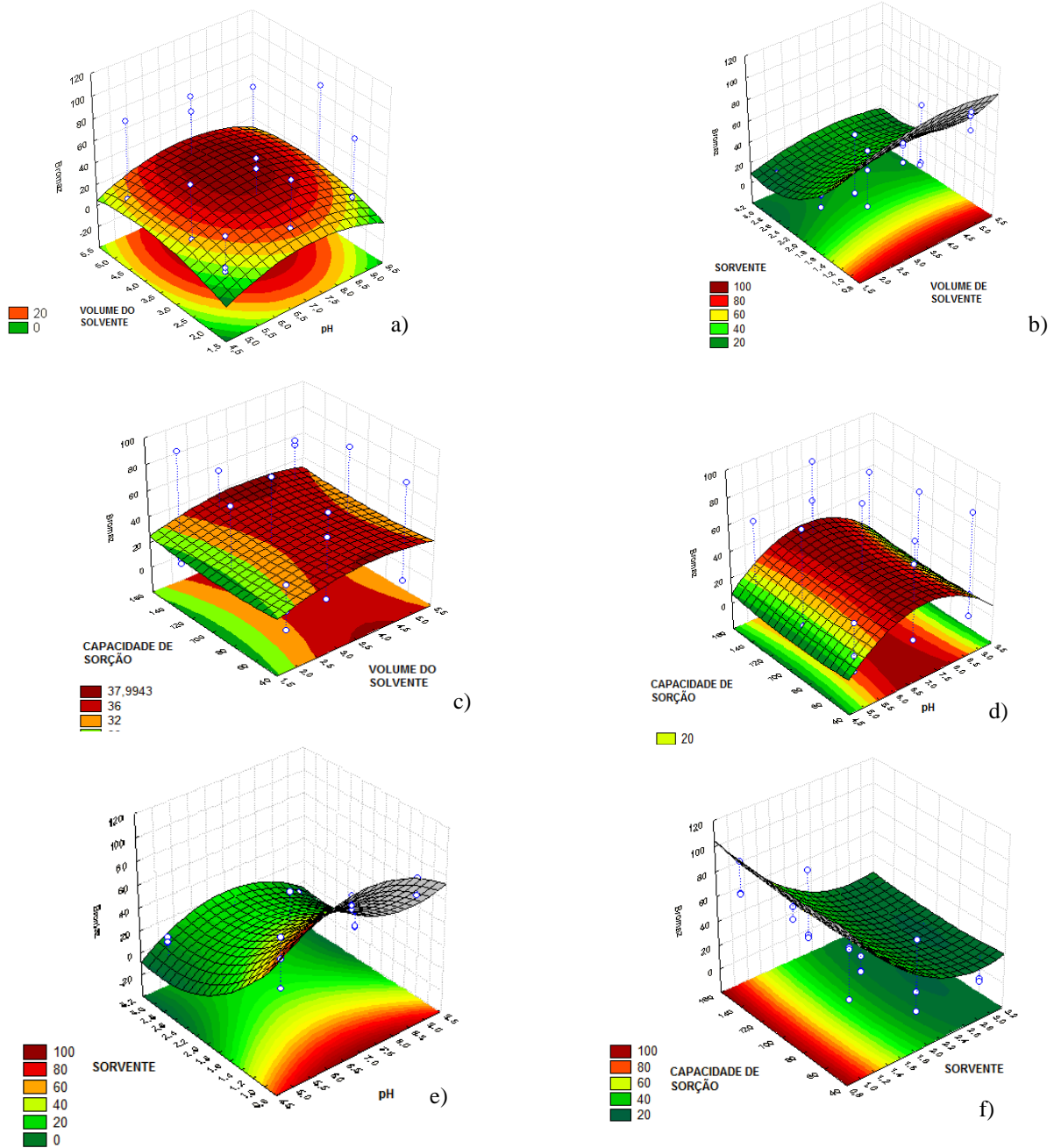


Figura 14 - Superfície de resposta obtida através de análise de bromazepam por HPLC-UV a) volume de solvente e pH; b) sorvente e volume de solvente; c) capacidade de sorção e volume de solvente, d) capacidade de sorção e pH; e) sorvente e pH e f) capacidade de sorção e sorvente.

## **5.2 Validação do método analítico**

O objetivo da validação foi demonstrar e assegurar a qualidade do processo analítico quanto ao atendimento de normatização.

### **5.2.1 Seletividade**

Na Figura 15 está demonstrada a avaliação preliminar da seletividade determinada em HPLC-UV a partir do ensaio de uma matriz de efluente isenta dos analitos, ou seja, uma “amostra branco” (Figura 15a), comparando-se com um padrão de ansiolíticos e antiepilépticos (Figura 15b) e uma amostra de efluente fortificada com os compostos (Figura 15c), em que se pode verificar que nenhum interferente eluiu no tempo de retenção dos analitos.

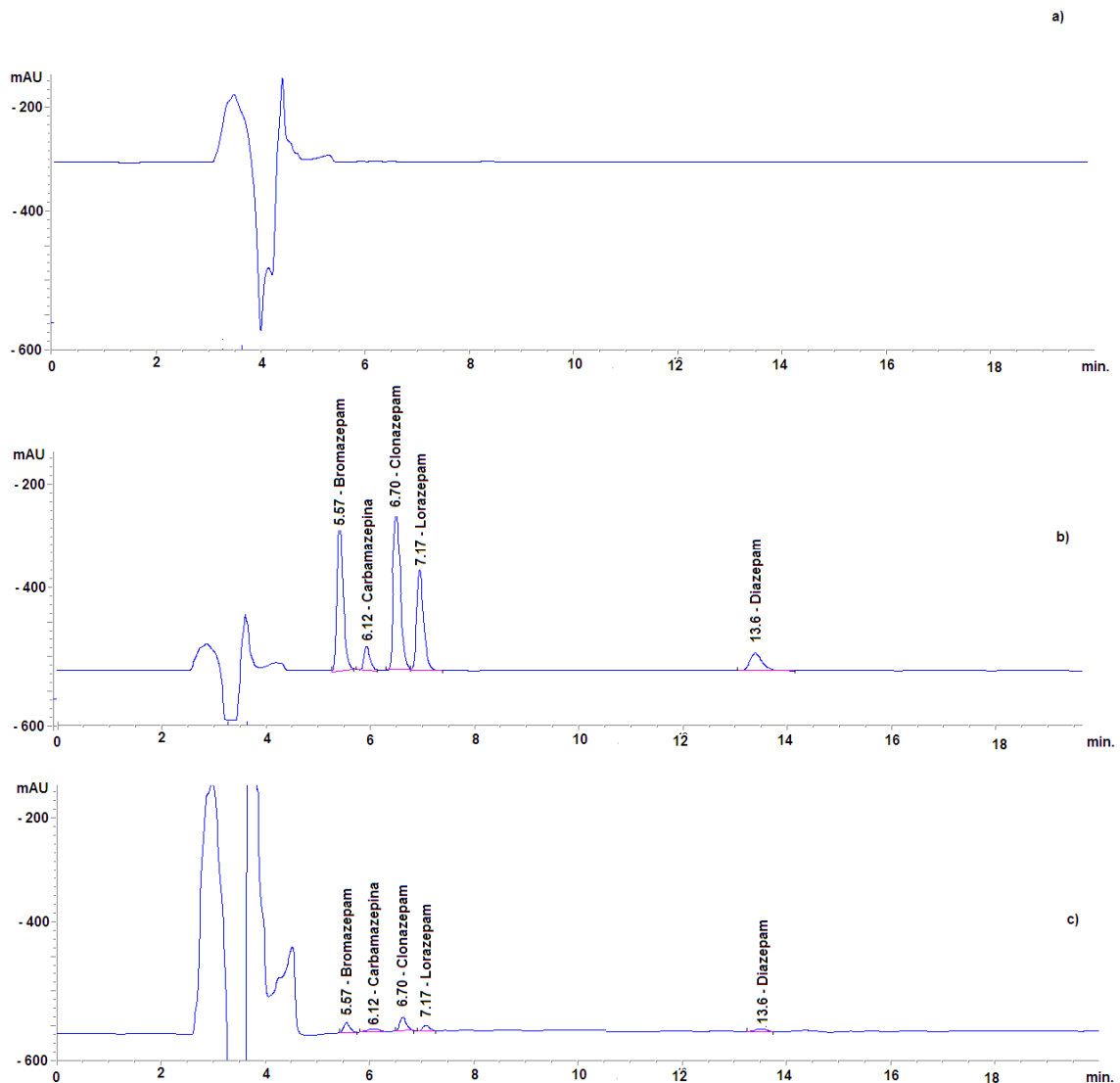


Figura 15 – Cromatogramas de bromazepam, carbamazepina, lorazepam, clonazepam e diazepam determinados em HPLC-UV: (a) Amostra de efluente do PA-HUSM isenta dos compostos; (b) Padrão de 3000 ng L<sup>-1</sup> em metanol e (c) Amostra de efluente fortificado com padrões de ansiolíticos e antiepilépticos na concentração de 8000 ng L<sup>-1</sup>.

A avaliação da seletividade determinada por LC-MS foi feita pela comparação uma amostra de efluente coletada do PA-HUSM “branco” demonstrada no cromatograma da Figura 16 com um cromatograma de uma amostra fortificada com estes compostos (Figura 17), no qual é possível verificar que nenhum interferente eluiu no tempo de retenção dos analitos com uma amostra. Na Figura 18 tem-se um cromatograma de um padrão de ansiolíticos e antiepilépticos.



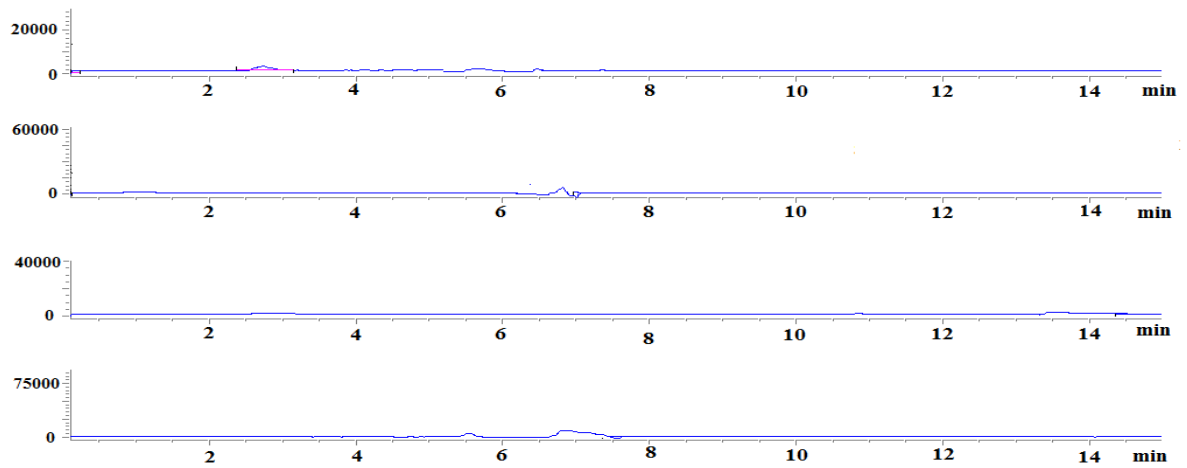


Figura 16 - Amostra de efluente do PA-HUSM isenta dos compostos.

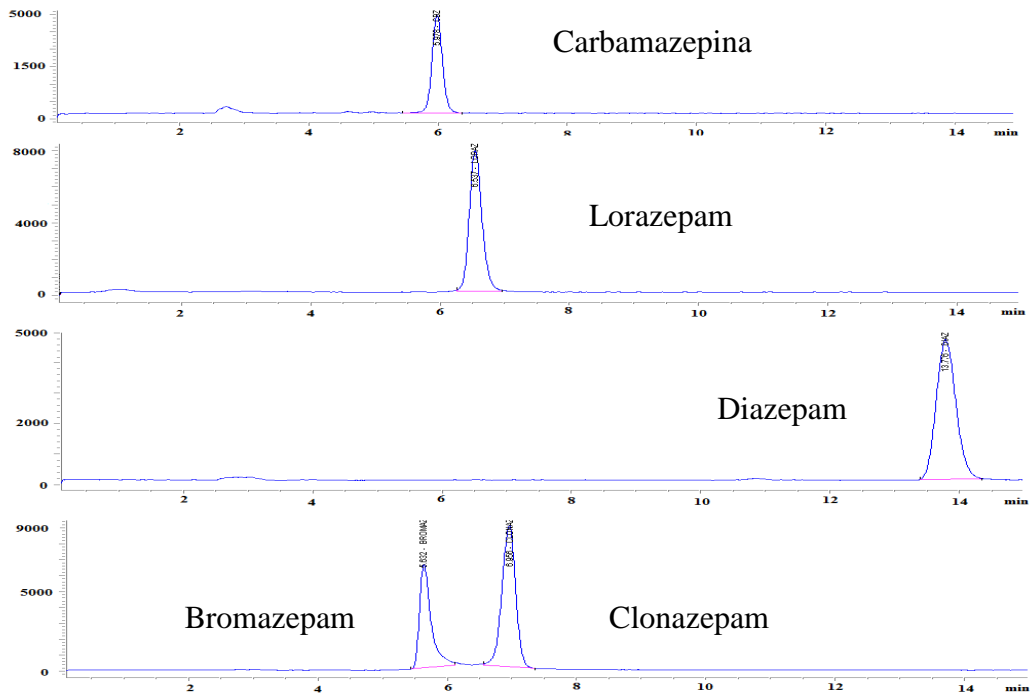


Figura 17 - Amostra de efluente do PA-HUSM fortificado com um padrão de 5000 ng L<sup>-1</sup> de bromazepam, carbamazepina, clonazepam, lorazepam e diazepam.

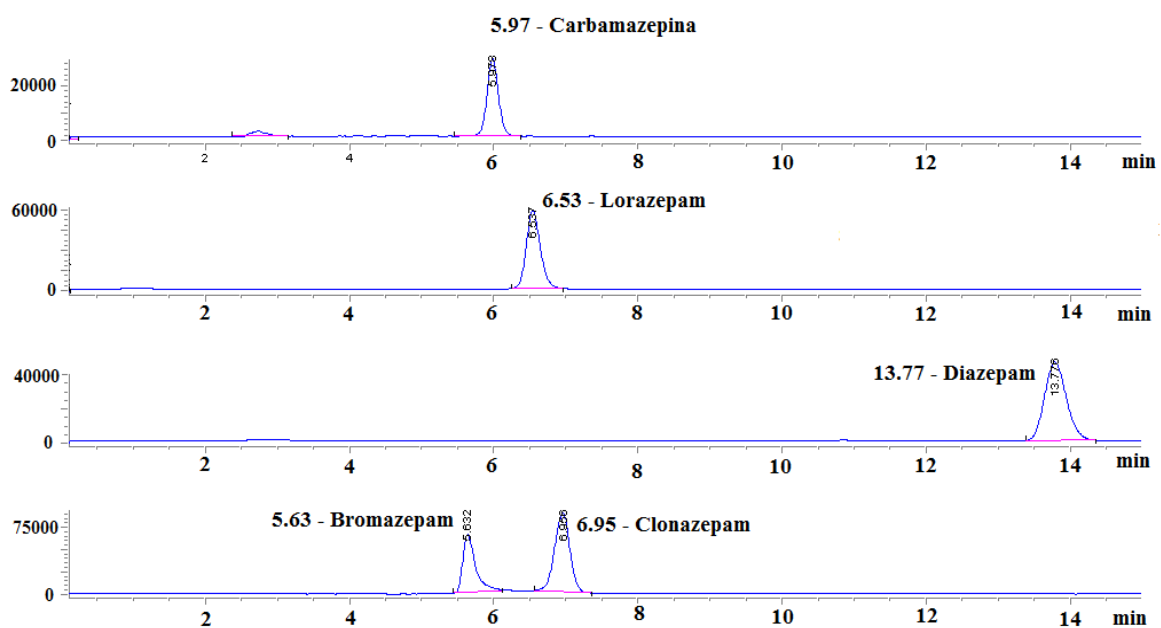


Figura 18 - Padrão de bromazepam, carbamazepina, clonazepam, lorazepam e diazepam ( $5000 \text{ ng L}^{-1}$ ) em metanol.

Foi realizada avaliação preliminar da seletividade LC-MS/MS, a partir do ensaio de uma matriz de efluente “branco” (Figura 19) comparada com uma amostra de efluente fortificada com padrões de ansiolíticos e antiepilépticos (Figura 20) e uma padrão (Figura 21), em que se pode verificar que nenhum interferente eluiu no tempo de retenção dos analitos.

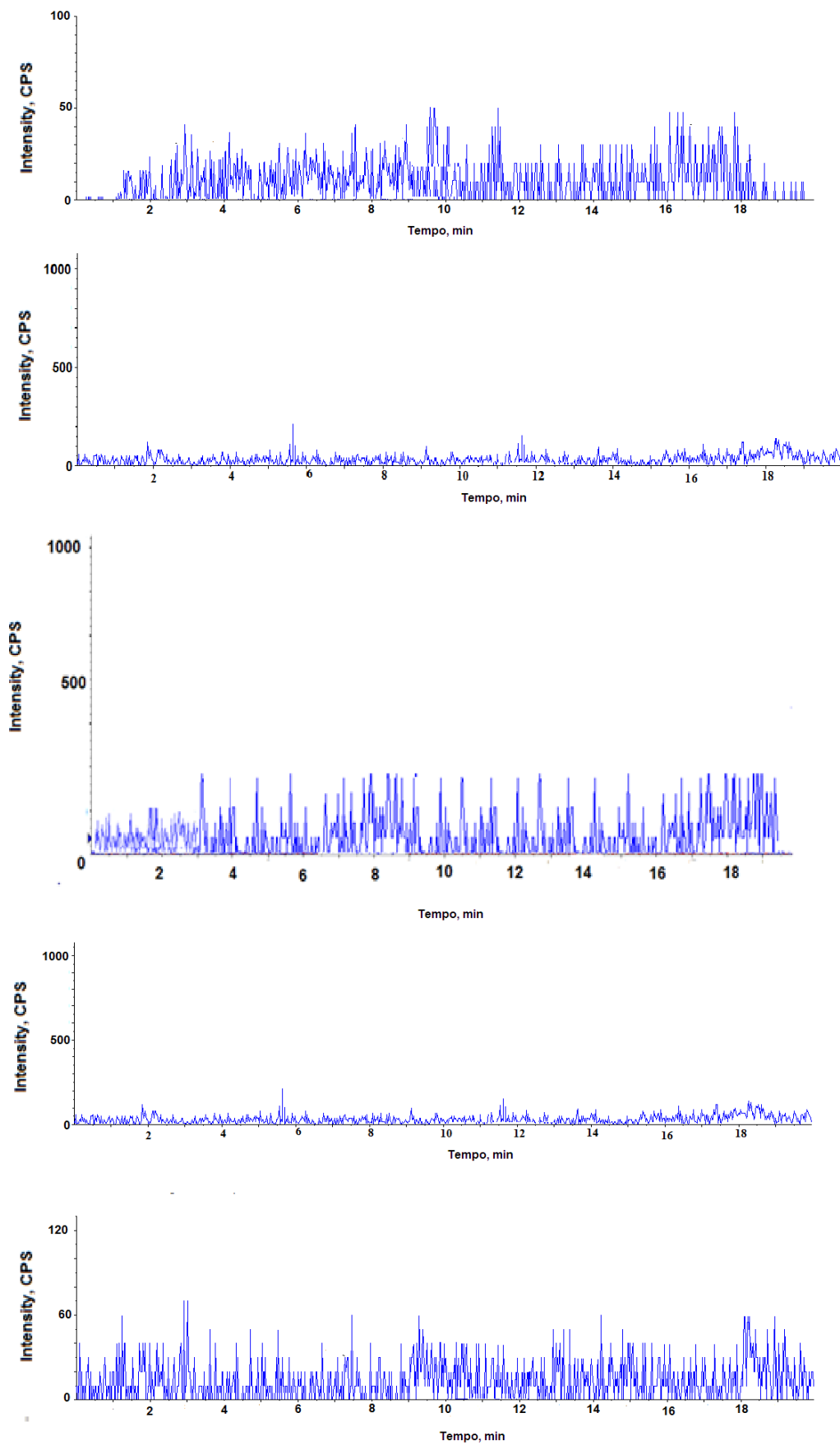


Figura 19 - Amostra de efluente do PA-HUSM isenta dos compostos determinadas por LC-MS/MS.

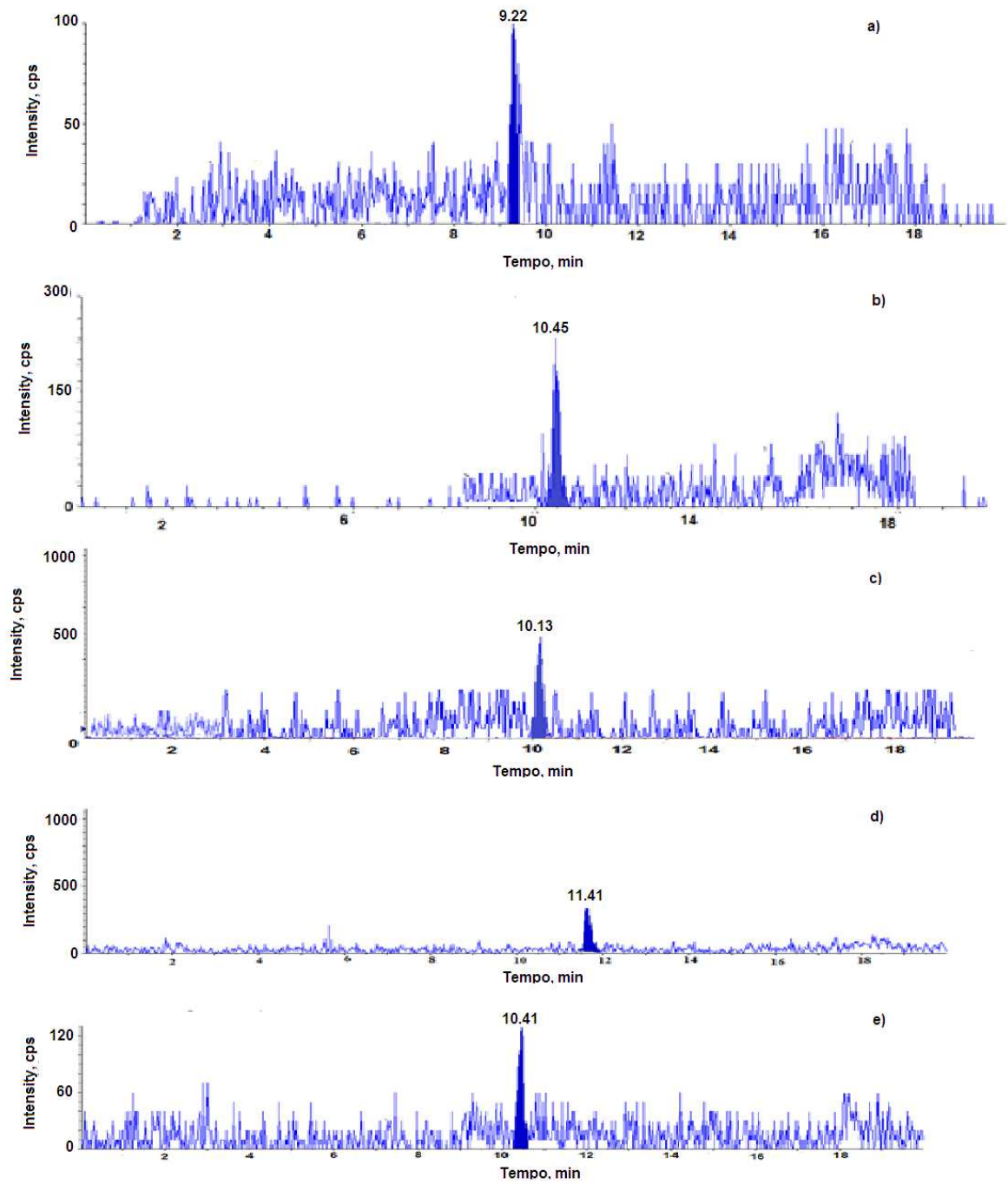


Figura 20 - Amostra de efluente do PA-HUSM fortificado com um padrão de 800 ng L<sup>-1</sup> de bromazepam, carbamazepina, clonazepam, lorazepam e diazepam diluído em metanol.

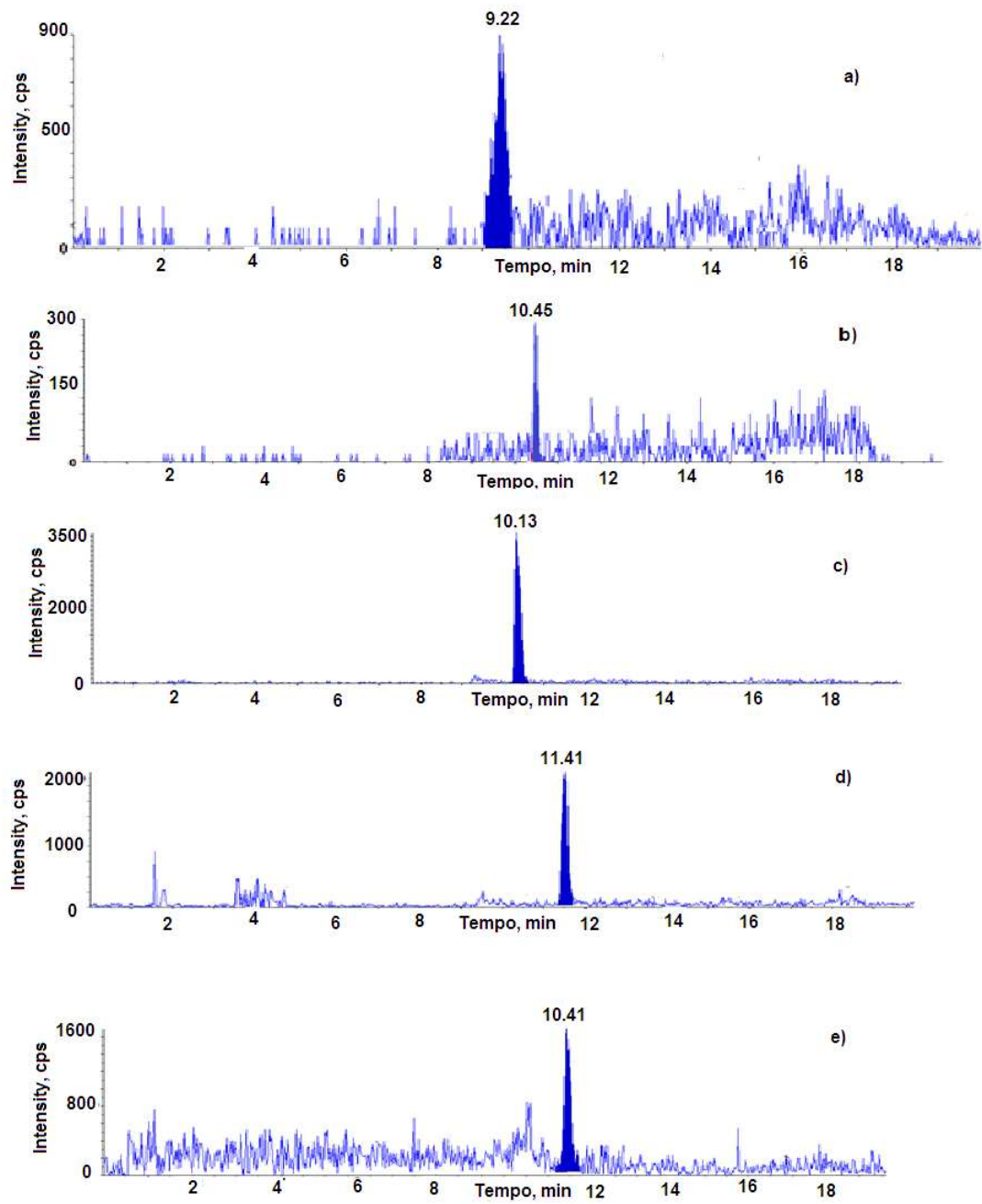


Figura 21 - Padrão de: (a) bromazepam, (b) carbamazepina, (c) clonazepam, (d) lorazepam e (e) diazepam ( $1000 \text{ ng L}^{-1}$ ) em metanol.

### 5.2.2 Figuras-de-mérito

O método de separação foi validado para a quantificação de ansiolíticos e antiepilépticos de acordo com *International Conference on Harmonization* (ICH 2005). Na Tabela 10, estão demonstradas as principais figuras-de-mérito de ansiolíticos e antiepilépticos determinadas por HPLC-UV.

Tabela 10 – Figuras-de-mérito para a validação de ansiolíticos e antiepilépticos no efluente do HUSM, através da determinação por HPLC-UV.

Figuras de mérito	Bromazepam	Carbamazepina	Clonazepam	Diazepam	Lorazepam
Faixa linear (ng L <sup>-1</sup> )	2000-50000	5000-60000	2000-50000	10000-60000	2000-50000
Coefficiente de regressão (r) na matriz	0,9999	0,9999	0,9996	0,9996	0,9998
Equação da reta (na matriz)	0,9962x +121,52	0,9712x - 193,85	0,9649x – 79,367	0,9713x – 133,83	0,9654x + 18,339
Coefficiente de regressão (r) sem matriz	0,9999	0,9997	0,9997	0,9999	0,9999
Equação da reta (sem matriz)	0,9914x +44,444	0,9782x + 61,006	0,9799x + 9,3387	0,9827x – 20,033	0,9879x - 85,488
Limite de detecção equipamento (ng L <sup>-1</sup> )	300 (± 5,5)	400 (± 4,7)	300 (± 5,4)	400 (± 3,5)	300 (± 4,1)
Limite de detecção método (ng L <sup>-1</sup> )	400 (± 9,7)	600 (± 4,7)	400 (±5,7)	600 (± 7,1)	400 (± 6,4)
Limite de quantificação (ng L <sup>-1</sup> )	2000 (± 6,57)	5000 (± 8,8)	2000 (± 7,0)	10000 (± 7,2)	2000 (± 9,5)
Ensaio de recuperação (%)	92,7 (± 5,9)	92,6 (± 5,2)	92,2(± 5,8)	92,2 (± 5,8)	93,0 (± 5,2)
Repetibilidade* RSD (%)	2,2	3,9	3,5	4,0	4,0
Precisão intermediária** RSD (%)	3,1	3,6	3,4	4,5	3,4

\*intra-dias (n=7); \*\*inter-dias, 3 dias

A avaliação da seletividade foi feita através do cálculo de regressão linear das curvas com e sem matriz, no qual foi constatado que não houve diferença significativa entre as duas curvas. A linearidade das curvas analíticas (área vs concentração) foi estabelecida em 6 níveis para o intervalo de 2000-50000 ng L<sup>-1</sup> para bromazepam, clonazepam e lorazepam; de 5000-60000 ng L<sup>-1</sup> para carbamazepina e de 10000 a 60000 ng L<sup>-1</sup> para diazepam. Analisando as equações

das curvas obtidas, pode-se concluir que o método foi linear para todos os compostos, já que os coeficientes de correlação ( $R^2$ ) foram todos acima de 0,99, o que, segundo as recomendações teóricas, é satisfatório (INMETRO, 2011). Nos apêndices de 1-8, estão demonstradas as curvas analíticas preparadas com *spike* com matriz e sem matriz.

Tais resultados condizem com diversos relatos encontrados na literatura: Tanaka et al. (1996) obtiveram resultados de  $R^2$  acima de 0,99 para bromazepam, clonazepam, diazepam e lorazepam. Foram encontrados, ainda, valores de  $R^2 > 0,99$  nos trabalhos de Azam et al. (1998) e Mercolini et al. (2009) para diazepam.

Os valores de LOD e LOQ obtidos para o instrumento e para método podem ser considerados aceitáveis e estão dentro dos limites encontrados por Schucara (2007). No entanto estes valores são influenciados pelo tipo de detector adotado, assim provavelmente, seriam menores se fossem obtidos em detectores mais específicos como, por exemplo, os detectores DAD e MS. Esses resultados mostram que o equipamento é sensível o suficiente para a detecção e quantificação desses analitos, sendo perfeitamente aplicável para a avaliação dos mesmos.

A eficiência da recuperação foi avaliada em amostras de efluente hospitalar, em três níveis de fortificação, em triplicata, para os cinco fármacos estudados. Para o bromazepam encontrou-se uma recuperação média de 92,7%  $\pm$ 5,9; para carbamazepina, foi de 92,6%  $\pm$ 5,2; para clonazepam e lorazepam a recuperação foi 92,2%  $\pm$ 5,8 e para diazepam 93,0%  $\pm$ 5,2. Os resultados de exatidão são semelhantes aos obtidos por Heizmann et al. (1984) ao determinarem bromazepam e obtiveram valores entre 87-95% e um RSD entre 3,2-10,5%. Azzam et al. (1998) obtiveram para diazepam resultados entre 80,3-98,3%.

Para avaliar a precisão intra-dia do método foi feita a fortificação em triplicata em amostras de efluente, sendo que cada nível foi medido com sete replicatas independentes, utilizando o desvio padrão relativo (RSD). Pode-se observar que os valores encontrados para bromazepam o RSD foi de 2,2%, para carbamazepina de 3,9%; clonazepam de 3,5%; lorazepam e diazepam foi de 4,0%.

De acordo com a teoria, a precisão intra-dia sob condições de repetibilidade são semelhantes às obtidas para diazepam por Azzam et al. (1998) que ficou entre 5,1-7,3%. Mercolini et al. (2009) encontraram valores entre 3,1-3,7%, e, Muchohi et al. (2005) encontraram, para lorazepam, valores entre 7,8-9,8%.

Para avaliar a precisão inter-dia do método (precisão intermediária), pode-se observar que os valores do coeficiente de variação encontrados foram, para bromazepam, de 3,1%, para carbamazepina, de 3,6%; para clonazepam e lorazepam, de 3,4%; e, para diazepam, de 4,5%. Os resultados de precisão inter-dia exatidão para diazepam são menores que os encontrados por Azzam et al. (1998) que obtiveram valores entre 5,1-7,5% e Muchohi et al. (2005) que encontraram um RSD entre 7,8-9,8%. Já os pesquisadores Solleu et al. (1993) quando determinaram bromazepam obtiveram um RSD entre 0,68-4,07%.

Na Tabela 11 estão demonstradas as principais figuras-de-mérito de ansiolíticos e antiepilépticos determinadas por LC-MS. Foi feito o cálculo de regressão linear das curvas com e sem matriz, onde foi constatado que não houve diferença significativa entre as duas curvas. Para determinar a linearidade a curva analítica foi feita em 6 níveis para o intervalo de 400-12500 ng L<sup>-1</sup> para todos os compostos. Ao observar as equações das curvas obtidas pode-se concluir que o método foi linear para todos os compostos, sendo que o  $R^2 > 0,99$ , isto segundo as recomendações da literatura está satisfatório (INMETRO 2011).

Os resultados de LOD e LOQ obtidos para o instrumento e para método mostram que o equipamento é sensível o suficiente para a detecção e quantificação destes compostos e estão dentro dos limites encontrados por Schucara (2007).

A eficiência da metodologia foi avaliada através da taxa de recuperação em 3 níveis de amostras de efluente hospitalar. Para o bromazepam, carbamazepina e lorazepam encontrou-se uma recuperação média de 91,0%  $\pm 6,0$ ; para clonazepam e diazepam foi de 90,8%  $\pm 6$ .

A precisão intra-dia do método foi feita a partir da fortificação em triplicata de amostras de efluente (cada nível com sete replicatas independentes). Com base nos resultados obtidos, foi encontrado, para bromazepam o RSD de 3,7%, para a carbamazepina 4,1%; para clonazepam 4,3%, para lorazepam e diazepam foi de 3,8%. Esses resultados de precisão intra-dia são considerados aceitáveis sob condições de repetibilidade de acordo com INMETRO, que sugere resultados abaixo de 20%.

Para avaliar a precisão intermediária (precisão inter-dia) pode-se observar que os valores do coeficiente de variação encontrados foram: para bromazepam, carbamazepina, lorazepam e diazepam de 3,9% e para clonazepam foi de 4,4%.



Estes resultados estão dentro do sugerido pelo INMETRO (abaixo de 20%), sob condições de precisão intermediária.

O efeito matriz encontrado ficou abaixo de 10% para os cinco compostos estudados no efluente do PA-HUSM. O efeito matriz sobre a carbamazepina foi maior do que o dos outros analitos, apresentando 6,2%, enquanto que, para os demais compostos, o efeito matriz apresentou média de 3,4%. É possível verificar que o efeito matriz foi muito baixo se comparado aos resultados de Hummel et al. (2006) que alcançaram a supressão de sinal próximo a 20% para diazepam e 40% para carbamazepina.

Tabela 11 – Figuras-de-mérito para a validação de ansiolíticos e antiepilépticos no efluente do HUSM, através da determinação por LC-MS.

Figuras de mérito	Bromazepam	Carbamazepina	Clonazepam	Diazepam	Lorazepam
Faixa linear (ng L <sup>-1</sup> )	400-12500	400-12500	400-12500	400-12500	400-12500
Coefficiente de regressão (r) na matriz	0,9987	0,9986	0,9990	0,9992	0,9988
Equação da reta (na matriz)	0,9816x +112,72	0,9835x – 119,56	0,9865x – 162,03	0,9964x – 175,58	0,9903x – 169,45
Coefficiente de regressão (r) sem matriz	0,9999	0,9999	0,9999	0,9997	0,9999
Equação da reta (sem matriz)	0,9939x – 72,428	0,9721x - 64,09	0,9909x – 74,904	1,0093x – 262,89	0,9906x – 67,55
Limite de detecção equipamento (ng L <sup>-1</sup> )	88 (± 5,3)	95 (± 4,4)	88 (±7,2)	97 (± 5,1)	85 (± 6,3)
Limite de detecção método (ng L <sup>-1</sup> )	100 (± 10,3)	120 (± 9,9)	105 (±9,5)	120 (± 8,8)	102 (± 7,4)
Limite de quantificação (ng L <sup>-1</sup> )	400 (± 6,57)	400 (± 8,8)	400 (± 7,0)	400 (± 7,2)	400 (± 9,5)
Ensaio de recuperação (%)	91,0 (±7,41)	91,0 (± 6,83)	90,8 (± 7,30)	91,1 (± 6,72)	90,8 (± 7,3)
Repetibilidade RSD (%)	3,7	4,1	4,3	3,8	3,8
Precisão intermediária RSD (%)	3,9	3,9	4,4	3,9	3,9

\*intra-dias (n=7); \*\*inter-dias, 3 dias

Na Tabela 12, estão as principais figuras-de-mérito de ansiolíticos e antiepilépticos determinadas por LC-MS/MS. Foi feito o cálculo de regressão linear das curvas com e sem matriz, onde foi constatado que não houve diferença significativa entre as duas curvas.

Para avaliar a sensibilidade foram elaboradas curvas analíticas com sete pontos e realizada a avaliação da inclinação da curva e a correlação linear. A avaliação da linearidade foi realizada através do cálculo do modelo através da regressão linear, sendo de  $R^2 > 0,99$  o parâmetro aceito de correlação. Conforme se pode verificar na Tabela 13, através da aplicação do teste de Cochran (foram comparadas a maior e a menor variância de cada concentração), não existem valores discrepantes, ou seja, os resultados obtidos apresentam homocedasticidade da variância, pois os valores estão abaixo do valor tabelado (0,939).

A faixa linear para bromazepam foi de 30-1500 ng L<sup>-1</sup>, para carbamazepina de 50-2500 ng L<sup>-1</sup>; para clonazepam de 30-2500 ng L<sup>-1</sup>, para diazepam 40-2500 ng L<sup>-1</sup> e lorazepam foi de 30-2000 ng L<sup>-1</sup>. Verifica-se que as equações das curvas são lineares para todos os compostos, sendo que o  $R^2 > 0,99$ , isto segundo as recomendações da literatura está satisfatório (INMETRO 2011). Estes resultados condizem com os valores encontrados por diversos pesquisadores, como Buseti et al. (1998), que obtiveram um  $R^2 = 0,9990$ ; para carbamazepina e diazepam ( $R^2 = 0,9999$ ); Cavedal *et al.* (2007) encontraram para clonazepam,  $R^2 = 0,9965$  e Villain et al. (2005)  $R^2 = 0,9977$  para bromazepam; diazepam  $R^2 = 0,9994$ , e lorazepam  $R^2 = 0,9996$ .

O limite de detecção foi estabelecido através da relação sinal/ruído (três vezes superior a média das oscilações produzidas pela linha de base). Enquanto que o limite de quantificação é igual ao valor mínimo, 10 vezes superior a média das oscilações produzidas pela linha de base. Os resultados de LOD e LOQ obtidos para o instrumento e para método mostram que o equipamento é sensível o suficiente para a detecção e quantificação desses compostos. Os resultados do limite de detecção foram consideravelmente mais baixos do que aqueles encontrados por Gujic et al. (2009), que obtiveram para bromazepam um LOD= 130 ng L<sup>-1</sup> e por Ternes et al. (1998) que obtiveram o LOD= 30 ng L<sup>-1</sup>, para diazepam foi de 30 ng L<sup>-1</sup> e para carbamazepina, 50 ng L<sup>-1</sup>. O mesmo ocorreu em relação ao limite de quantificação encontrado por Cavedal et al. (2006) para clonazepam LOQ = 500 ng L<sup>-1</sup> e Unceta *et al.* (2010) obtiveram um LOQ 100 ng L<sup>-1</sup> para carbamazepina, diazepam e lorazepam.

A eficiência da metodologia foi verificada através dos ensaios de recuperação com a fortificação em triplicata de amostras de efluente hospitalar em 3 níveis de concentração. Para o bromazepam, encontrou-se uma recuperação média de 93,9%

$\pm 2,1$ ; carbamazepina foi de 92,6%  $\pm 4,2$ ; de clonazepam 93,9%  $\pm 3,0$ ; para e diazepam foi de 91,8%  $\pm 6$  e lorazepam foi de 93,8%  $\pm 4,3$ .

Ao se comparar esses resultados com os referenciais teóricos, verifica-se que a taxa de recuperação para bromazepam foi mais elevada do que a encontrada por Kratzch et al. (2004) (44,6%); já para clonazepam, a recuperação ficou entre 97,9-106,7%, para diazepam entre 98,7 e 100,5% e, para, lorazepam (101,3-101,7%). Vieno et al. (2006) obtiveram para carbamazepina 66-105%, já Zhu et al (2006) obtiveram 90% de recuperação.

A precisão intra-dia do método foi medida a partir da fortificação em triplicata de amostras de efluente (cada nível com sete replicatas independentes). Foram encontrados para bromazepam um RSD de 5,8%, para carbamazepina foi de 4,3%; clonazepam (5,4%); diazepam (3,6%) e lorazepam (5,5%). Tais resultados de precisão intra-dia são considerados aceitáveis sob condições de repetibilidade de acordo com INMETRO, que sugerem resultados abaixo de 20%. Na literatura encontram-se resultados similares, Cheze et al. (2004) obtiveram para bromazepam (7,0-14,6%) e para clonazepam (3,4-5,6%). Na determinação de carbamazepina Gomez et al. (2007) obtiveram 10,0%, e Kim et al. (2011) encontraram para bromazepam (12,7-13,6%), para clonazepam (8,9-14,3%), para diazepam (3,5-9,9%) e lorazepam (11,3-14,8%).

Para avaliar a precisão intermediária (precisão inter-dia), observa-se que o RSD encontrado para bromazepam foi de 9,5%; para carbamazepina, 6,4%, clonazepam (8,8%); para diazepam (5,1%) e para lorazepam (8,2%). Tais valores foram menores que os valores encontrados para carbamazepina por Gomez et al. (2006) que obtiveram 11,3% e por Kim et al. (2011) quando determinaram bromazepam obtiveram (11-13,3%), clonazepam (9,6-10,9%), diazepam (5,9-17,3%) e lorazepam (10,5-13,1%); Xiang et al. (2011) encontraram para diazepam (7,6-12,4%) e para clonazepam (7,3 e 13,3%).

O efeito matriz encontrado ficou abaixo de 10% para os cinco compostos estudados. No efluente do PA-HUSM, a carbamazepina foi maior do que o dos outros analitos apresentando 8,5%, para bromazepam foi de 6,0%, clonazepam de 3,5%, para diazepam de 3,0% e lorazepam de 4,8%. No efluente geral os valores do efeito matriz foram bromazepam (5,5%), carbamazepina (2,8%), clonazepam (6,6%), diazepam (5,3%) e lorazepam (7,4%). Desse modo percebe-se que o efeito da matriz foi muito baixo se comparado com os resultados obtidos por Hummel et al.

(2006), que alcançaram a supressão de sinal próximo a 20% para diazepam e 40% para carbamazepina.

Tabela 12 – Figuras-de-mérito para a validação de ansiolíticos e antiepilépticos no efluente do HUSM, através da determinação por LC-MS/MS.

Figuras-de-mérito	Bromazepam	Carbamazepina	Clonazepam	Diazepam	Lorazepam
Faixa linear (ng L <sup>-1</sup> )	30-1500	50-2500	30-2500	40-2500	30-2000
Coeficiente de regressão (r) na matriz	0,9994	0,9994	0,9978	0,9993	0,9994
Equação da reta (na matriz)	0,9536x - 118,013	0,9432x - 34,606	0,9582x - 36,388	0,9969x - 28,314	0,9486x - 17,246
Coeficiente de regressão (r) sem matriz	0,9999	0,9999	0,9999	0,9997	0,9998
Equação da reta (sem matriz)	0,9824x - 5,6781	0,9635x - 11,253	0,9881x - 16,48	0,9839x - 11,967	0,9727x - 12,464
Limite de detecção equipamento (ng L <sup>-1</sup> )	3,0 (±2,3)	4,0 (±2,6)	3,0 (±3,2)	4,0 (±3,6)	3,0 (±2,3)
Limite de detecção método (ng L <sup>-1</sup> )	5,0 (±0,95)	6,0 (±1,5)	6,0 (±1,5)	6,0 (±1,5)	5,0 (±0,95)
Limite de quantificação (ng L <sup>-1</sup> )	30,0 (±1,10)	50,0 (±1,81)	30,0 (±1,10)	40,0 (±0,98)	30,0 (±1,81)
Ensaio de recuperação (%)	93,9 (±2,24)	93,1 (±4,2)	93,2 (±3,2)	94,1 (±3,6)	93,1 (±4,7)
Repetibilidade RSD (%)	5,8	4,3	5,4	3,6	5,5
Precisão intermediária RSD (%)	9,5	6,4	8,8	5,1	8,2

\*intra-dias (n=7); \*\*inter-dias, 3 dias

Tabela 13 – Avaliação da linearidade para as curvas na matriz e sem matriz.

p>0,05	Bromazepam	Carbamazepina	Clonazepam	Diazepam	Lorazepam
Concentração (ng L <sup>-1</sup> )	30-1500	50-2500	30-2500	40-2500	30-2000
Homocedasticidade da variância	0,500-0,910	0,500-0,928	0,500-0,928	0,500-0,916	0,500-0,928
Resíduos da curva (desvio padrão do resíduo)	20,79	12,52	18,37	9,43	17,77

### 5.2.3 Adequação dos parâmetros do espectrômetro de massas e fonte de ionização

Neste estudo foi feita a determinação por espectrometria de massas, com o propósito de identificar e quantificar os ansiolíticos e antiepilépticos de acordo com

sua elevada seletividade e sensibilidade. A seleção da polaridade dos íons é um fator importante que afeta a ionização e a eficiência quando LC-MS é aplicado, que se baseia nas propriedades dos analitos e em seus grupos funcionais.

Para a adequação dos parâmetros do LC-MS, foi feita a infusão dos analitos com uma solução padrão de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ . Os seguintes parâmetros foram adquiridos do espectrômetro de massas: temperatura de secagem ( $300 \text{ }^\circ\text{C}$ ); ganho (30 V); fluxo de secagem (12); pressão de nebulização (50); volume do capilar (1800 ev). Na Tabela 14 estão os íons e os fragmentos que foram monitorados.

Tabela 14 – Íons e fragmentos monitorados para a determinação dos fármacos psicoativos através de LC-MS.

Analitos	Íons monitorados	Fragmentos
Bromazepam	316	240
Carbamazepina	237	40
Clonazepam	321	60
Diazepam	316	160
Lorazepam	285	120

Para a adequação dos parâmetros do LC-MS/MS foi feita a infusão dos analitos com uma solução padrão de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ , tendo como finalidade identificar e quantificar os ansiolíticos e antiepilépticos devido à sua elevada seletividade e sensibilidade. Durante o método de desenvolvimento, foi avaliado o comportamento dos cinco fármacos e a seleção do modo de ionização através da infusão direta dos analitos em solução padrão de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  em modo positivo  $[\text{M}+\text{H}]^+$  utilizando uma fonte de ionização de eletronebulização. Após obtidos os espectros, realizou-se a adequação dos parâmetros do espectrômetro de massas cujos resultados estão demonstrados na Tabela 15.

Tabela 15 - Parâmetros da fonte de ionização utilizados para a determinação de ansiolíticos e antiepilépticos por LC-MS/MS.

Parâmetros	Valores otimizados
Gás de Colisão ( $\text{N}_2$ )	Médio
Gás de Contra Corrente ( $\text{N}_2$ )	20 psi
Gás da Fonte de Íons 1 ( $\text{N}_2$ )	40 psi
Gás da Fonte de Íons 2 ( $\text{N}_2$ )	40 psi
Voltagem do íon <i>spray</i>	4000 V
Temperatura	$750 \text{ }^\circ\text{C}$
Potencial de Entrada	10 V

Após a obtenção dos espectros foi realizada a adequação dos parâmetros do espectrômetro de massas e os resultados estão demonstrados na Tabela 16.

Tabela 16 - Parâmetros do espectrômetro de massas utilizados na determinação dos analitos.

Analitos	Íons precursores (Q <sub>1</sub> )	Fragmentos (Q <sub>3</sub> )	DP* (V)	CE** (%)	CXP*** (V)	Tempo de retenção (min)
Bromazepam	316,0	214,0 151,0	106	39 45	12 10	9,22
Carbamazepina	237,0	194,0 179,0	130	53 53	10 10	10,45
Clonazepam	316,0	270,0 181,0	101	35 67	14 8	10,13
Diazepam	285,0	193,0 154,0	56 130	53 53	10 10	11,41
Lorazepam	321,0	275,1 302,9	101 106	53 47	10 10	10,41

DP\* = Potencial de Entrada; CE\*\* = Energia de colisão, CXP\*\*\* = Potencial da saída da célula de colisão.

O espectro MS/MS, obtido pela infusão do padrão de bromazepam em modo positivo  $[M + H]^+$  forma o íon precursor de  $m/z$  316,0, que é proveniente da ionização da massa 315 Da, adicionada de hidrogênio ionizável  $[M + H]^+$ . Os fragmentos com maior intensidade  $m/z$  214,0 e  $m/z$  151,0 foram obtidos com energia de colisão de 39 e 45 V (Figura 22). As espécies protonadas são resultantes da perda da espécie neutra CO (formando o  $m/z$  288) resultando na contração do anel de sete membros para uma estrutura ressonante estabilizada de anel de seis membros. Essas quebras são confirmadas por Chèze et al. (2004). Outra quebra ocorre devido à perda da espécie neutra HCN, seguindo-se da perda do radical, resultando o cátion de  $m/z$  182. Essa via de fragmentação foi confirmada por Laurito et al. (2004); Villain et al. (2005); Muller et al. (2005) e Kim et al. (2011).

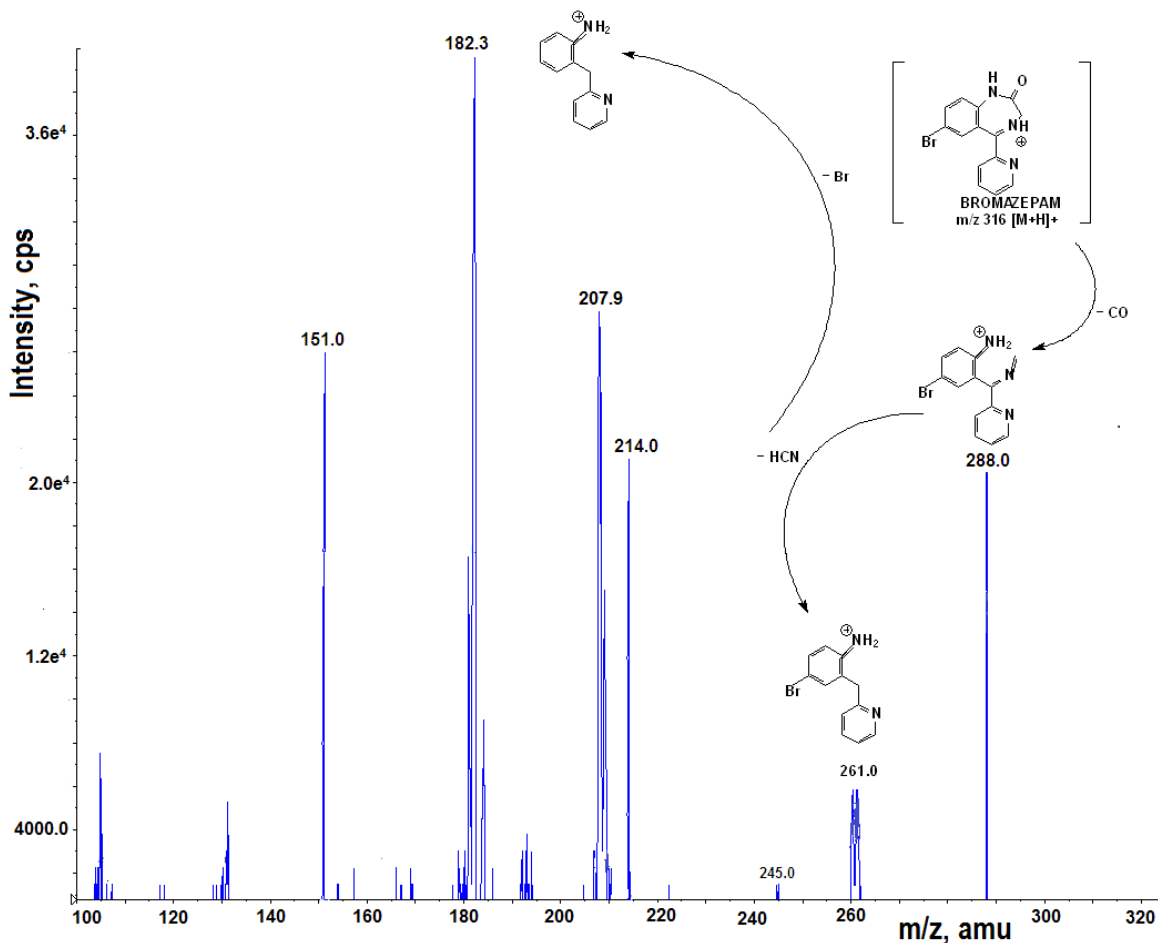


Figura 22 - Espectro de massas da fragmentação do bromazepam e rota de fragmentação proposta. Infusão do padrão com concentração de padrão de 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  em metanol.

Para a Carbamazepina, a melhor condição de ionização foi em modo positivo  $[M + H]^+$ , com CE 53 e 47 V, tendo como íon precursor  $m/z$  237. O espectro MS/MS foi obtido após a infusão do padrão de carbamazepina e a via de fragmentação proposta está demonstrada na Figura 23. Os íons-produto de maior abundância foram os de  $m/z$  194 e 179,0. A fragmentação envolve quebra na cadeia lateral (carboxamida), isto é, ocorre a perda de  $\text{NH}_3$  (íon  $m/z$  222,0) e dos grupamentos CO (íon  $m/z$  194,0) e  $\text{CH}_3$  (íon  $m/z$  179,0). Estas rotas foram comprovadas por Breton *et al.* (2005); Hummel *et al.* (2006) e Niessen (2011).

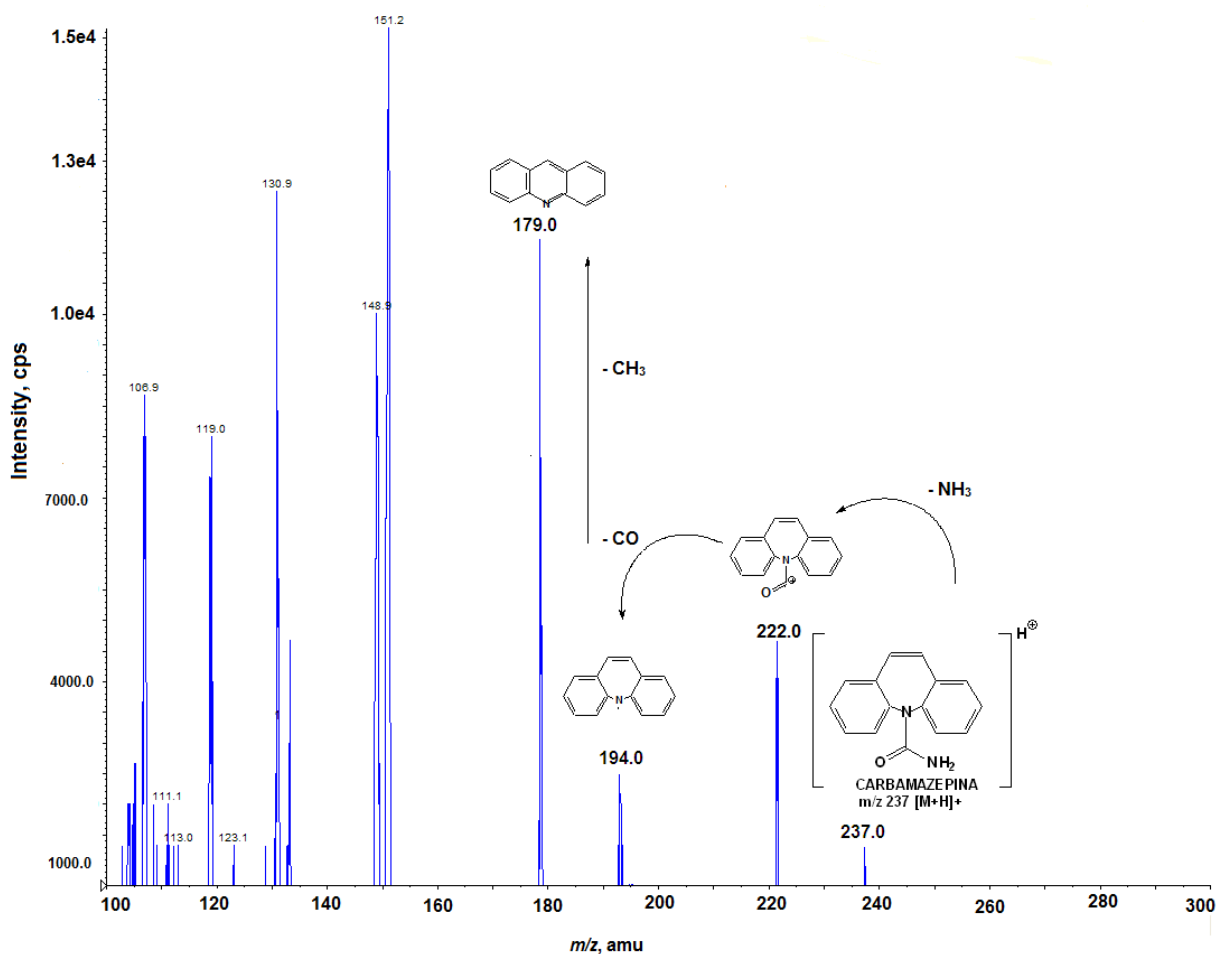


Figura 23 - Espectro de massas da fragmentação da carbamazepina e a rota de fragmentação proposta. Infusão do padrão com concentração de padrão de 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  em metanol.

Na determinação do clonazepam, utilizando-se CE 35 e 67 V, foi encontrado o íon precursor de  $m/z$  316,0, proveniente da ionização da massa 315,0 Da, adicionada de hidrogênio ionizável  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Na Figura 24, estão demonstrados os produtos da fragmentação do clonazepam com maior intensidade, que foram os íons de  $m/z$  270,0 e  $m/z$  181,0, bem como a rota proposta de fragmentação. As espécies protonadas são resultantes da perda das espécies neutras  $\text{NO}_2$  (íon  $m/z$  270) confirmada por Kim et al. (2011) e Chèze et al. (2004); CO (íon  $m/z$  242) encontrada por Chèze et al. (2004) e de um  $\text{H}^+$  resultando  $m/z$  de 241,2. Tal rota é semelhante à descrita por Cavedal et al. (2007). Outro fragmento encontrado foi o íon de  $m/z$  213,9 identificado por Kim et al. (2011).



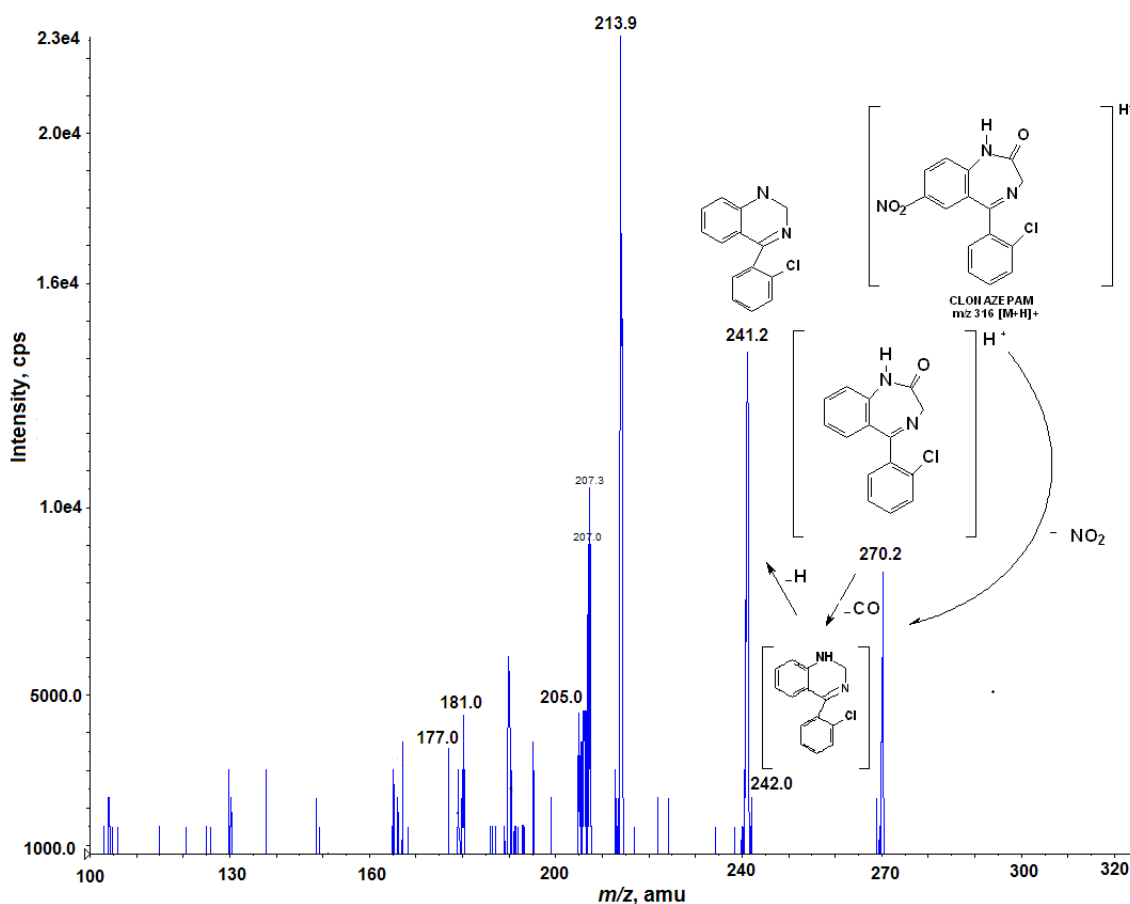


Figura 24 - Espectro de massas da fragmentação do clonazepam e a rota de fragmentação proposta. Infusão do padrão com concentração de padrão de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  em metanol.

Para o diazepam, a ionização também foi feita em modo positivo  $[M + H]^+$  com CE 53 V, obtendo-se o íon precursor  $m/z$  285, e sendo identificados os íons produtos de  $m/z$  257, 193 e 131 (Figura 25). As espécies protonadas são resultantes da fragmentação, utilizando  $MS^2$  no *íon trap*, onde ocorre a perda, inicialmente, de uma espécie neutra de CO (28 u). Isso resulta na contração do anel de sete membros, de modo a ocorrer a estabilização da ressonância do cátion, ficando este com um anel de seis membros de  $m/z$  257, comprovada por Gebhardt & Schroder (2007) e Unceta et al. (2010). Na sequência, pode perder 29 u para gerar a espécie em  $m/z$  228, que, então, perde Cloro (Cl) para formar o cátion de  $m/z$  193, conforme Kim et al. (2011). A perda de 29 u corresponde, provavelmente, à eliminação de  $\text{CH}_2=\text{NH}$ , rota de fragmentação que foi comprovada por Smyth et al. (2000) e Laurito et al. (2004). Outra via alternativa de fragmentação parte do cátion de  $m/z$  257 que, perdendo os grupamentos fenil e HCN, forma o cátion  $m/z$  154. Esta via foi confirmada por Smyth et al. (2000); Mueller et al. (2005) e Kim et al. (2011).

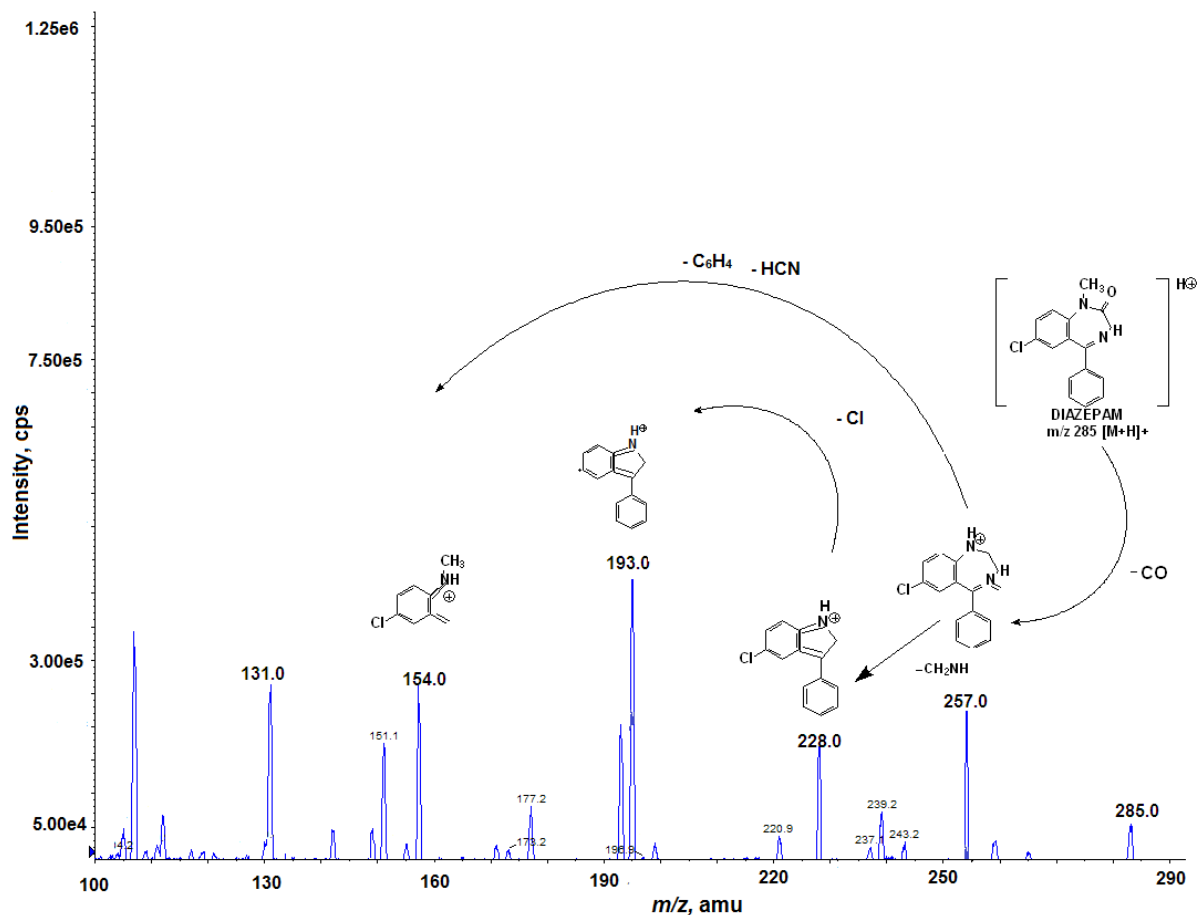


Figura 25 - Espectro de massas da fragmentação do diazepam e a rota de fragmentação proposta. Infusão do padrão com concentração de padrão de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  em metanol.

A ionização do lorazepam foi feita em modo positivo  $[M + H]^+$  com CE 53 e 47 V; o íon precursor  $m/z$  321 foi identificado, bem como seus íons produtos  $m/z$  275 e 302,9 (Figura 26). Utilizando-se  $\text{MS}^2$  no *ion-trap*, as espécies protonadas resultantes decorrem da perda da espécie neutra de  $\text{H}_2\text{O}$  (18 u), deixando um íon carbônio com sete membros intactos. Ocorre, então, a perda do grupamento CO (formando o fragmento  $m/z$  275) confirmada por Villain et al. (2005) e Kim et al. (2011). Outra perda que ocorre é do radical Cl ( $m/z$  239,5). Além disso, outras fragmentações são observáveis, tais como a perda de outro radical Cl (35 u) íon  $m/z$  205 e de um grupamento fenil ( $m/z$  163), tais vias de fragmentação propostas também foram encontradas por Smyth et al. (2000).

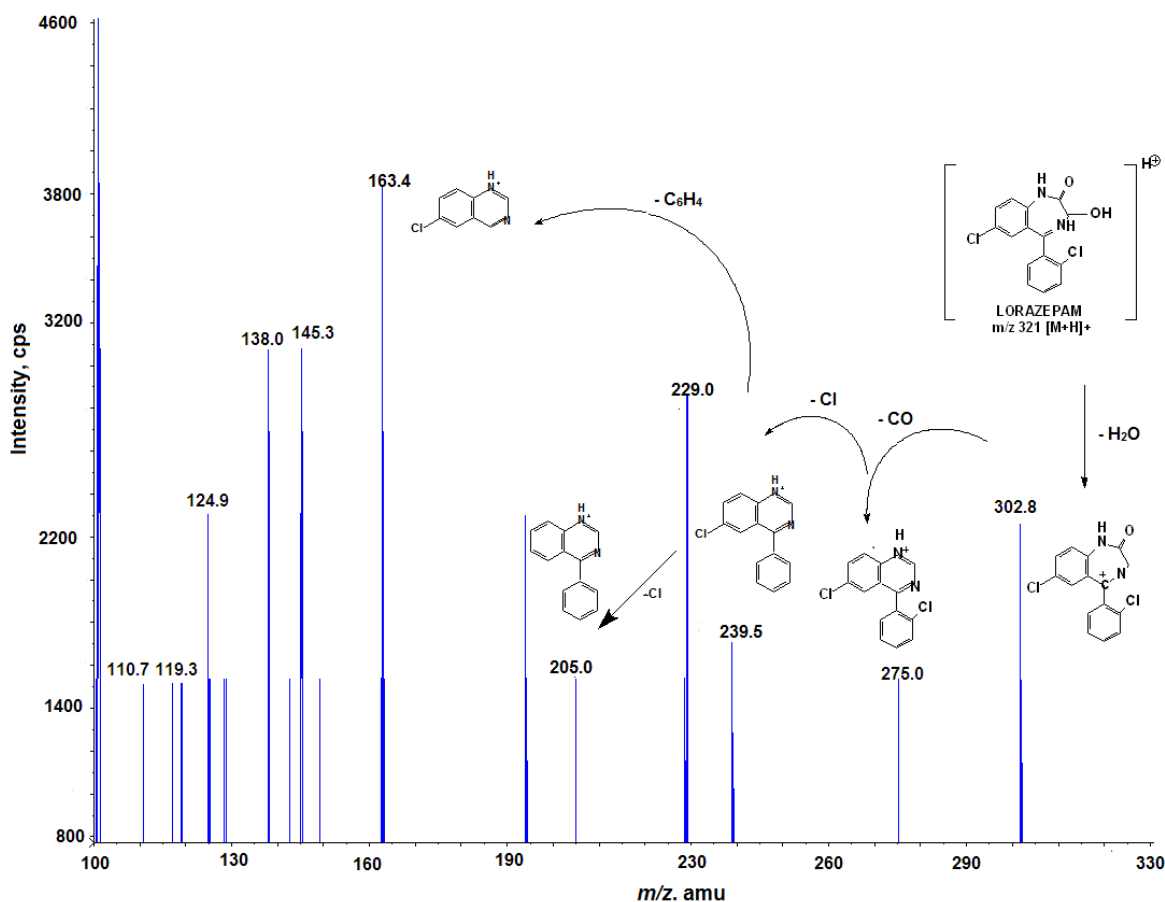


Figura 26 - Espectro de massas da fragmentação do lorazepam e a rota de fragmentação proposta.

### 5.3 Determinação da concentração de bromazepam, carbamazepina, clonazepam, diazepam e lorazepam

#### 5.3.1 Determinação no efluente PA-HUSM por HPLC-UV

Foram coletadas amostras do efluente hospitalar do pronto atendimento do HUSM durante três dias, de 4 em 4 horas das 8 às 20 horas. Logo em seguida, as coletas foram filtradas qualitativamente e feito o *clean-up*/pré-concentração. As amostras foram feitas em triplicata, conforme descrito no item 4.2.2.

De acordo com os resultados demonstrados na Tabela 17, pode-se constatar que o composto de maior ocorrência ambiental foi a carbamazepina, seguida por diazepam, bromazepam, clonazepam e lorazepam. As concentrações de diazepam encontradas ficaram entre  $348,0 \text{ ng L}^{-1}$  e  $369,0 \text{ ng L}^{-1}$  (média =  $355,0 \pm 9,4 \text{ ng L}^{-1}$ ); para carbamazepina foi de  $395,0 \text{ ng L}^{-1}$  e  $417,0 \text{ ng L}^{-1}$  (média =  $406,0 \pm 9,3 \text{ ng L}^{-1}$ );

bromazepam ficou entre 162,0 ng L<sup>-1</sup> e 189,0 ng L<sup>-1</sup> (média = 173,0±6,3 ng L<sup>-1</sup>); para lorazepam entre 125,0 ng L<sup>-1</sup> e 155,0 ng L<sup>-1</sup> (média = 140,0±10,2 ng L<sup>-1</sup>) e clonazepam de 74,0 ng L<sup>-1</sup> a 102,0 ng L<sup>-1</sup> (média = 90,0±10,0 ng L<sup>-1</sup>).

Tabela 17 – Concentrações ambientais medidas (MEC) médias de ansiolíticos e antiepilépticos determinadas no efluente do Pronto-Atendimento do Hospital Universitário de Santa Maria, no período de 23 a 25/04/2010, através da determinação por HPLC-UV.

Data da coleta	Bromazepam ng L <sup>-1</sup> (±SD)	Carbamazepina ng L <sup>-1</sup> (±SD)	Clonazepam ng L <sup>-1</sup> (±SD)	Diazepam ng L <sup>-1</sup> (±SD)	Lorazepam ng L <sup>-1</sup> (±SD)
23/04/2010	170,0±1,5	410,0±2,0	100,0±2,0	350,0±5,0	130,0±4,5
24/04/2010	180,0±8,5	396,0±3,1	80,0±6,0	366,0±1,0	140,0±2,0
25/04/2010	169,0±6,5	413,0±3,5	90,0±4,5	350,0±2,5	150,0±5,0

SD= Desvio padrão.

### 5.3.2 Determinação no efluente PA-HUSM por LC-MS

As amostras de efluente foram coletadas conforme descrito no item 4.2.2, na Tabela 18. Pode-se observar que a carbamazepina e o diazepam são os compostos de maior concentração determinada no efluente do PA-HUSM, seguido por bromazepam, lorazepam e clonazepam. As concentrações de carbamazepina encontradas ficaram entre 654,0 e 680,0 ng L<sup>-1</sup> (média = 665,0±2,0 ng L<sup>-1</sup>); para o diazepam as concentrações foram de 545,0 a 585,0 ng L<sup>-1</sup> (média = 564,0±15,3 ng L<sup>-1</sup>); para o bromazepam ficaram entre 128,0 a 154,0 ng L<sup>-1</sup> (média = 142,0±8,7 ng L<sup>-1</sup>); para lorazepam ficaram entre 87,0 a 104,0 ng L<sup>-1</sup> (média = 93,0±5,6 ng L<sup>-1</sup>) e para o clonazepam foram de 77,0 a 95,0 ng L<sup>-1</sup> (média = 87,0±6,4 ng L<sup>-1</sup>).

Tabela 18 – Concentrações ambientais medidas (MEC) de ansiolíticos e antiepilépticos no efluente do Pronto-Atendimento do Hospital Universitário de Santa Maria no período de 09 a 11/10/2010, através da determinação por LC-MS.

Data da coleta	Bromazepam ng L <sup>-1</sup> (±SD)	Carbamazepina ng L <sup>-1</sup> (±SD)	Clonazepam ng L <sup>-1</sup> (±SD)	Diazepam (±SD)	Lorazepam (±SD)
09/10/2010	134,0±5,6	660,0±5,0	80,0±3,0	561,0±6,6	100,0±4,5
10/10/2010	151,0±2,5	655,0±1,0	92,0±1,5	550,0±4,5	90,0±1,5
11/10/2010	141,0±3,2	680,0±8,5	90,0±4,5	580,0±5,0	90,0±2,5

### 5.3.3 Determinação no efluente PA-HUSM e no efluente geral por LC-MS/MS

Para fazer a determinação da concentração dos ansiolíticos e antiepiléticos, procedeu-se de acordo com o método de separação/quantificação e de *clean-up*/pré-concentração. Foram coletadas amostras de efluentes do PA-HUSM durante 7 dias, de quatro em quatro horas das 8 às 20 h, e filtradas qualitativamente. Foram medidas em triplicata e, a seguir, determinou-se a concentração dos compostos no efluente hospitalar em dois pontos o Ponto A – efluente gerado pelo Pronto Atendimento (PA-HUSM) e o Ponto B – efluente geral do HUSM, conforme descrito no item 4.2.2.

A Tabela 19 mostra as concentrações ambientais medidas (MEC) nos dois pontos de coleta. Em ambos os pontos de coleta, (A) e (B), a amostragem dos efluentes foi feita após o sistema de tratamento (do conjunto tanque séptico-filtro anaeróbio), e os valores MEC correspondem às concentrações de ansiolíticos e antiepiléticos que são liberados diretamente no curso d'água receptor.

A maior ocorrência de ansiolíticos e antiepiléticos foi no efluente do PA-HUSM (ponto de coleta A), sendo que, as mais altas concentrações foram de diazepam e de carbamazepina, seguidas por bromazepam, clonazepam e lorazepam. As concentrações médias dos psicoativos foi de: para o bromazepam  $195,0 \pm 6,4 \text{ ng L}^{-1}$ ; carbamazepina ( $589,0 \pm 6,1 \text{ ng L}^{-1}$ ); clonazepam ( $134,0 \pm 9,8 \text{ ng L}^{-1}$ ); lorazepam ( $95,7 \pm 6,7 \text{ ng L}^{-1}$ ) e, diazepam ( $645,0 \pm 0,3 \text{ ng L}^{-1}$ ).

Os valores de MEC no efluente geral - ponto (B), também revelaram a maior ocorrência de diazepam e carbamazepina, seguidos pelo bromazepam, clonazepam e lorazepam. As concentrações médias dos compostos foi de: bromazepam ( $137,0 \pm 7,0 \text{ ng L}^{-1}$ ); carbamazepina ( $460,7 \pm 9,3 \text{ ng L}^{-1}$ ); clonazepam ( $59,6 \pm 5,2 \text{ ng L}^{-1}$ ); lorazepam ( $42,4 \pm 4,2 \text{ ng L}^{-1}$ ) e, diazepam ( $571,0 \pm 9,9 \text{ ng L}^{-1}$ ). Estas concentrações são semelhantes com os valores relatados na literatura em efluente hospitalar (HUERTA-FONTELA *et al.* 2010; HUMMEL *et al.* 2006 e SMYTH *et al.* 2000).

Cabe ressaltar que os níveis encontrados no efluente geral do HUSM, foram mais baixos do que no PA-HUSM, provavelmente porque, nesse ponto de coleta, o efluente sofre diluição, pois a saída do sistema de esgotos é canalizada juntamente com o esgoto proveniente da biblioteca.

Tabela 19 – Concentrações ambientais medidas (MEC) de ansiolíticos e antiepilépticos nos dois pontos de coleta, ponto (A) PA-HUSM e ponto (B) efluente geral do Hospital Universitário de Santa Maria, através da determinação por LC-MS/MS.

Data da coleta	Ponto de Coleta	Bromazepam (±SD)	Carbamazepina (±SD)	Clonazepam (±SD)	Diazepam (±SD)	Lorazepam (±SD)
29/08/11	Ponto (A)	200,0±0,6	588,0±2,2	130,0±3,0	645,0±1,5	95,0±1,1
30/08/11		205,0±0,6	595,0±0,9	125,0±2,1	645,0±3,0	85,0±2,5
31/08/11		195,0±2,6	585,0±3,4	145,0±0,6	645,0±4,0	90,0±1,5
01/09/11		185,0±0,8	595,0±0,4	145,0±3,0	660,0±2,5	95,0±2,5
02/09/11		190,0±2,9	590,0±0,3	140,0±3,6	655,0±3,0	100,0±3,0
03/09/11		195,0±2,4	595,0±0,2	120,0±3,8	641,0±5,5	105,0±2,5
04/09/11		195,0±2,9	579,0±0,1	135,0±1,2	645,0±2,0	100,0±1,0
Média		195,0±6,4	589,6±6,1	134,3±9,8	645,0±0,3	95,7±6,7
29/08/11	Ponto (B)	125,0±4,5	455,0±5,2	55,0±2,5	560,0±2,0	40,0±3,5
30/08/11		135,0±1,5	465,0±2,9	54,0±2,0	580,0±4,5	45,0±1,0
31/08/11		145,0±2,0	445,0±0,7	60,0±0,6	560,0±0,6	38,0±1,0
01/09/11		135,0±1,5	455,0±5,1	49,0±2,5	565,0±1,5	40,0±1,5
02/09/11		145,0±3,5	465,0±3,2	65,0±2,0	585,0±1,0	45,0±3,5
03/09/11		135,0±2,0	470,0±5,1	60,0±1,5	570,0±2,5	50,0±1,0
04/09/11		140,0±0,6	470,0±2,4	55,0±2,5	569,0±7,2	40,0±2,5
Média		137,1±7,0	460,7±9,3	56,9±5,2	571,0±9,9	42,4±4,2

### 5.3.4 Comparação das técnicas utilizadas para a determinação fármacos psicoativos no efluente do HUSM/UFMS

A Tabela 20 apresenta uma comparação entre as três técnicas utilizadas para a determinação de psicoativos em efluente hospitalar. Por intermédio delas foi feita a identificação e quantificação dos compostos. Os resultados obtidos foram satisfatórios.

Observar-se que análise, utilizando HPLC-UV, apresenta algumas vantagens por se tratar de equipamento de mais baixo custo se comparado com os que utilizam espectrometria de massas. Porém, a desvantagem é que os limites de detecção alcançados para detectores UV são consideravelmente mais altos na ordem de  $\mu\text{g L}^{-1}$  a  $\text{ng L}^{-1}$ , comparados ao detector MS que consegue atingir limites de detecção (de  $\text{ng L}^{-1}$  a  $\text{pg L}^{-1}$ ) quando utilizado em série (MS/MS), oferecendo, também, a possibilidade de confirmação dos compostos analisados. Para análises ambientais com o propósito de triagem, com limites de detecção na faixa de concentração de  $\mu\text{g L}^{-1}$ , o detector de UV pode ser perfeitamente utilizado ou ainda, quando a concentração dos analitos na matriz é elevada.

As vantagens do uso do LC-MS/MS em química ambiental é o limite de detecção, e a possibilidade de confirmação estrutural dos compostos analisados, combinada à robustez do método. A desvantagem da utilização dessa instrumentação com o uso e a manutenção desses equipamentos mais sofisticados eleva significativamente o custo, limitando desta forma seus usuários e aplicações.

Tabela 20 – Comparação das técnicas cromatográficas utilizadas para a determinação de ansiolíticos e antiepiléticos no efluente do HUSM/UFSM.

	Técnicas		
	HPLC/UV	LC-MS	LC-MS/MS
Equipamento	HPLC Agilent 1100 (degasser, injetor automático, detector UV)	HPLC Agilent 1200 (degasser, injetor automático, detector LC-MS)	HPLC Agilent 1200 (degasser, injetor automático, detector API 4000_Q-Trap)
Coluna	Zorbax SB C <sub>18</sub> 5 µm (4.6 X 250 mm)	Zorbax SB C <sub>18</sub> 5 µm (4.6 X 250 mm)	Zorbax SB C <sub>18</sub> 5 µm (4.6 X 150 mm)
Fase móvel	(A) ácido acético 1%:(B) acetonitrila (1:1)	(A) acetonitrila:(B) acetato amônia 0,005 mol L <sup>-1</sup> ácido acético 1%:metanol (1:1)	(A) água:ácido fórmico 1%: (B) acetonitrila: ácido fórmico 1% (1:1)
Limite de detecção (ng L <sup>-1</sup> )	300-400	100-120	3-4
Limite de quantificação (ng L <sup>-1</sup> )	2000-10000	400	30-50
Custos	R\$ 100.000,00	R\$ 150.000,00	R\$ 500.000,00

#### 5.4 Identificação dos metabólitos de bromazepam, carbamazepina, clonazepam, diazepam e lorazepam no efluente do HUSM

Os fármacos psicoativos após sofrerem metabolização originam metabólitos que, frequentemente, têm atividade farmacológica e que, muitas vezes, podem ser potencialmente tóxicos. Para avaliar o risco ambiental destes resíduos, há a necessidade de identificação com detectabilidade dos compostos.

A identificação dos metabólitos foi feita através da infusão direta da solução padrão de todos os analitos na concentração de 100 µg L<sup>-1</sup>, no API 4000 Q\_Trap. A seguir foi feita a infusão do efluente para a identificação dos metabólitos a partir da coleta de amostras do efluente do PA-HUSM e do efluente geral.

Foram feitos experimentos (IDA), utilizando-se o modo de varredura armadilha de íons, através do qual se obteve um grande número de informações estruturais em uma única corrida cromatográfica. O volume de injeção utilizado foi de 20 µL de amostra, dado que os metabólitos presentes no efluente estão em

baixas concentrações. As demais condições cromatográficas e de manuseio da amostra não sofreram alterações.

## 5.4.1 Metabólitos do bromazepam

### 5.4.1.1 Metabólito 3-hidroxi-bromazepam

O 3 hidróxi-bromazepam (3-OH-bromazepam) é formado pela metabolização hepática através da hidroxilação e clivagem do anel de sete membros. É o principal metabólito ativo do bromazepam, sendo um metabólito inativo (CHÉZE et al., 2004).

Este foi identificado somente no efluente do PA-HUSM, através do experimento IDA, conforme descrito no item 4.2.4.4. Na Figura 27 pode-se verificar os fragmentos obtidos a partir da energia de colisão de 20 V. A melhor fragmentação do metabólito foi alcançada utilizando energia de colisão CE de 60 V (Figura 27b).

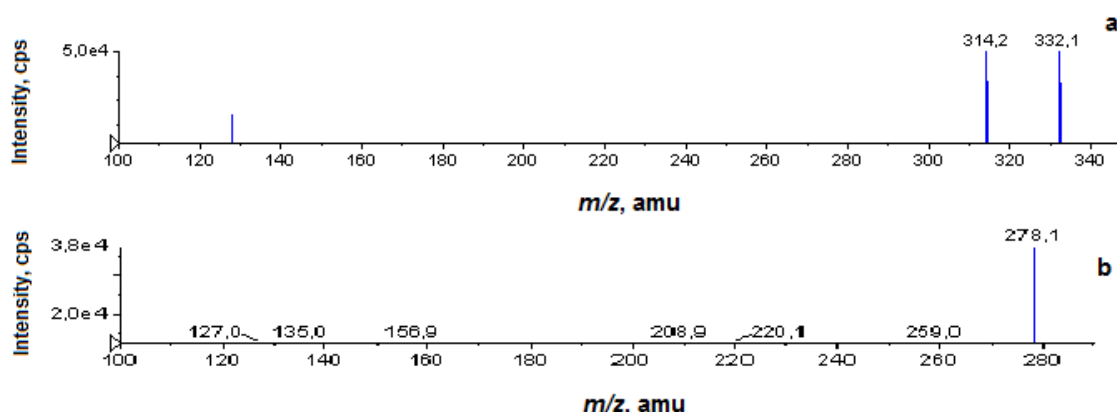


Figura 27 - Espectro de massas do metabólito 3-hidroxi-bromazepam -  $m/z$  332 e seu fragmento, em amostra de efluente do PA-HUSM. Condição: *Enhanced MS + EPI* (a) com energia de colisão 20 V e (b) com energia de colisão 60 V.

Após os experimentos de IDA e EPI com diferentes energias de colisão, foi obtida a rota de fragmentação do metabólito 3-OH-bromazepam com suas respectivas perdas de massa e proposição da fragmentação das estruturas moleculares que estão representados na Figura 28.

O metabólito 3-hidroxi-bromazepam com o íon precursor  $m/z$  332 e o fragmento  $m/z$  314  $[M + H]^+$  é proveniente da perda de água ( $H_2O$ ), da molécula do metabólito-pai com energia de colisão de 20 V, semelhante aos fragmentos encontrados por Chéze *et al.* (2004) e Smink *et al.* (2004), ao utilizarem a mesma



energia de colisão, em que obtiveram o mesmo fragmento em amostras de urina. A seguir ocorre perda dos grupamentos CO e NCH, originando o fragmento  $m/z$  259.

Nos relatos de Smink et al. (2004) quando utilizaram uma CE de 32 V foi encontrado o mesmo íon  $m/z$  332; porém, os fragmentos obtidos foram diferentes (286 e 275) e foram encontrados em amostras de sangue total.

No fragmento  $m/z$  278  $[M + H]^+$ , ocorre a perda da  $C_3H_3N$  da molécula do metabólito-pai com energia de colisão de 60 V, a seguir ocorre a quebra do anel de sete membros, perdendo o grupamento  $C_3H_3NO$  e formando o fragmento de  $m/z$  209. Outra rota proposta foi a ruptura do anel com a perda de  $C_2H_2O_2$  formando o fragmento  $m/z$  220 que pode perder os íons Br e N formando  $m/z$  127 ou perdendo o grupo  $C_3HN_2$  e formando o  $m/z$  157, no qual, em uma nova quebra ( $C_2H_2$ ) forma  $m/z$  135.

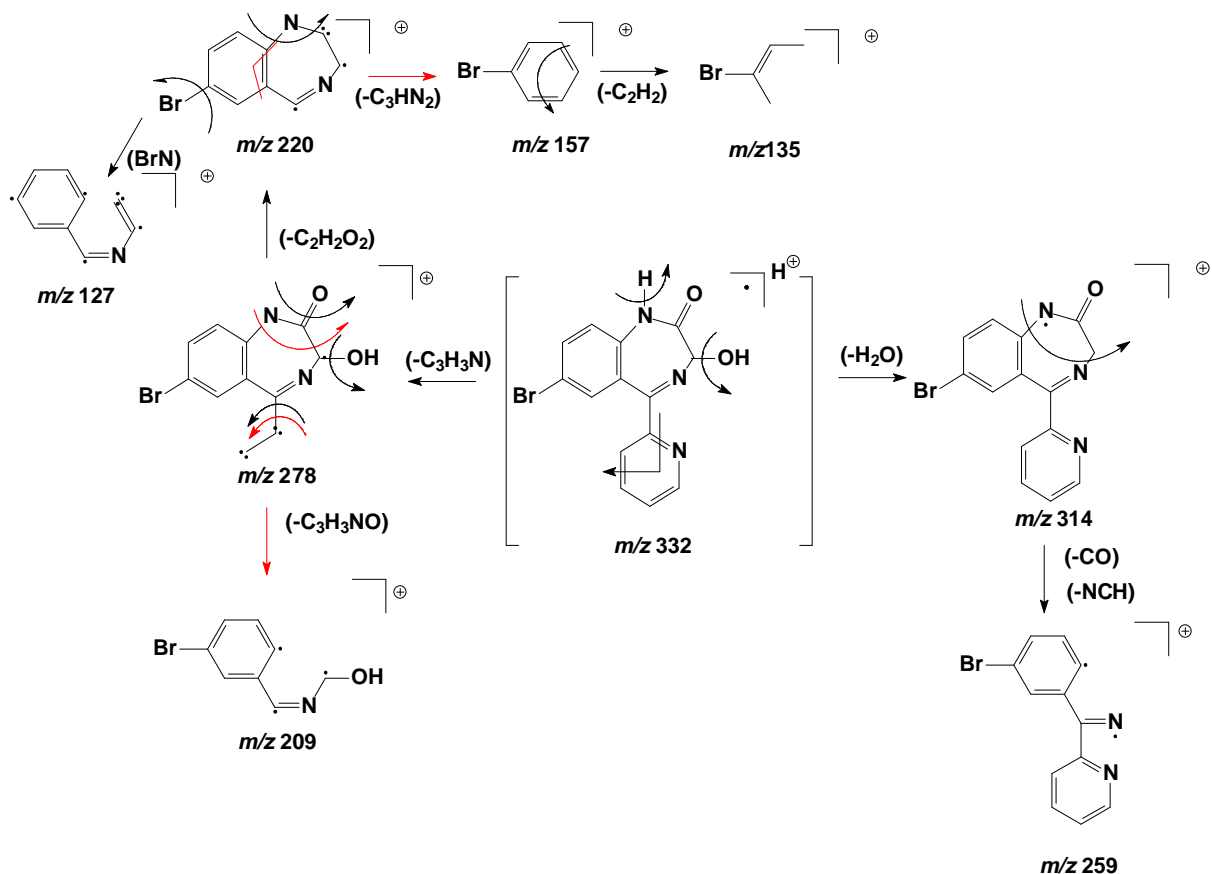


Figura 28 - Rota de fragmentação proposta para o metabólito 3-OH-bromazepam.

## 5.4.2 Metabólitos do clonazepam

### 5.4.2.1 Metabólito 7-aminoclonazepam

O clonazepam é resultado da metabolização hepática onde o grupo nitro sofre redução, produzindo o metabólito ativo principal o 7-aminoclonazepam. Em uma segunda etapa, o metabólito é acetilado (STEENTOF et al., 2009). O metabólito foi identificado somente no efluente do PA-HUSM. Utilizando-se o experimento de IDA com precursor ion  $m/z$  270, foi obtido o íon-pai 286 e mais dois fragmentos foram gerados (Figura 29), sendo, posteriormente, observados no experimento com energia de colisão de 20 V.

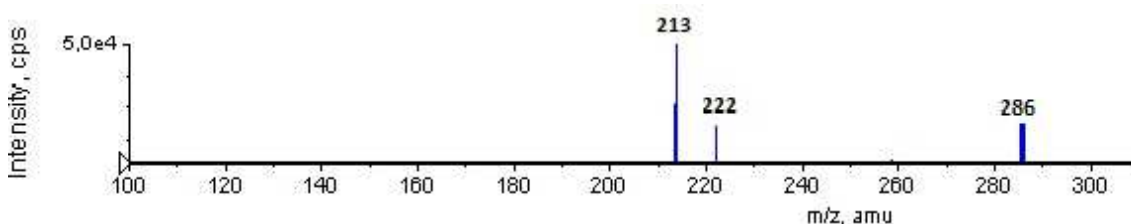


Figura 29 - Espectro de massas do metabólito 7-aminoclonazepam  $m/z$  286 e respectivos fragmentos, em amostra efluente PA-HUSM. Condição: *Enhanced MS+ EPI* com CE 20 V.

A proposição da rota de fragmentação foi realizada após os experimentos de IDA e EPI com diferentes energias de colisão. Foram obtidas as fragmentações das estruturas moleculares do metabólito 7-aminoclonazepam com suas respectivas perdas de massa (Figura 30).

Pode-se observar que o íon-pai  $m/z$  286 e o fragmento  $m/z$  222  $[M + H]^+$  é proveniente da perda do grupamento  $NH_2$ , e dos íons Cl e O da molécula do metabólito-pai com energia de colisão de 20 V. A formação deste fragmento foi relatada nos trabalhos de Villain et al. (2005) (CE de 25 V), Xiang et al. (2011) e Kim et al. (2011) (CE= 39 V) em análises forenses, utilizando amostras de cabelo. Nos relatos de Chéze et al. (2004), também foi encontrado este fragmento (CE de 30V) e Smink et al. (2004) usaram CE de 40 V.

O fragmento  $m/z$  213  $[M + H]^+$  encontrado é proveniente da perda dos grupamentos  $C_2H_5$  e  $N_2O$ , da molécula do metabólito-pai com energia de colisão de

20 V, o que difere dos relatos de Villain et al. (2005), porém este utilizou a CE de 25 V em análises forenses de amostras de cabelo.

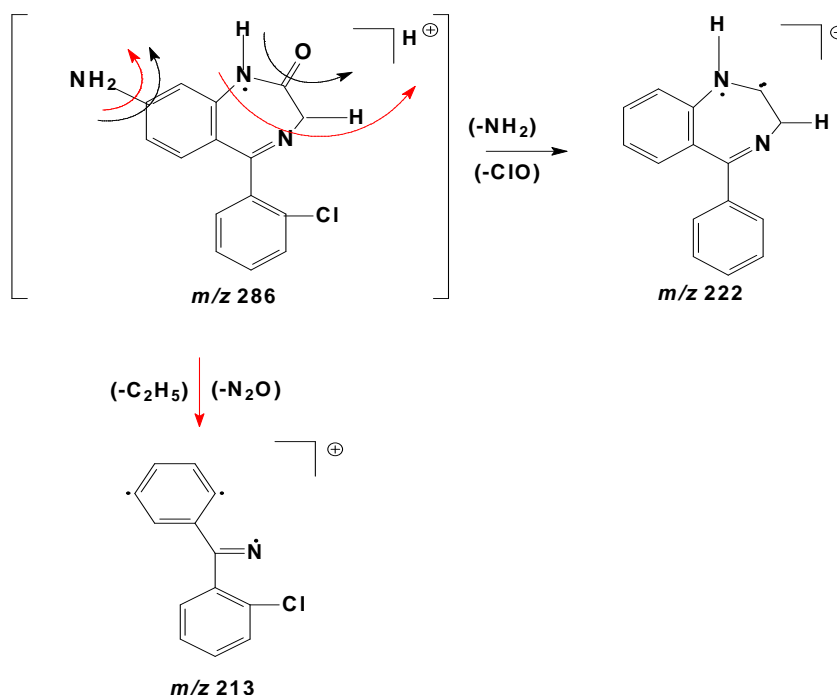


Figura 30 - Rota de fragmentação proposta para o metabólito 7 aminoclonazepam.

### 5.4.3 Metabólitos da carbamazepina

A carbamazepina é metabolizada, predominantemente, no fígado, em duas fases. A fase I é biotransformada pelas reações de oxidação, redução ou hidrólise, liberando grupos funcionais reativos. A fase II ocorre através de glucoronização, sulfonação, metilação ou acetilação, formando, dessa maneira, diversos metabólitos sendo muitos deles potencialmente ativos (GOODMAN & GILMAN, 2010).

#### 5.4.3.1 Carbamazepina 10,11-epóxido

A carbamazepina sofre a reação de epoxidação com a formação de um metabólito ativo, a carbamazepina 10,11-epóxido, sendo o principal metabólito e possui propriedades anticonvulsivas.

O metabólito com íon  $m/z$  252 foi encontrado no efluente geral do HUSM. O experimento de IDA foi feito com precursor íon que proporcionou o estudo da fragmentação desse metabólito seguido de EPI CE 20, 40 e 60 V (Figura 31).

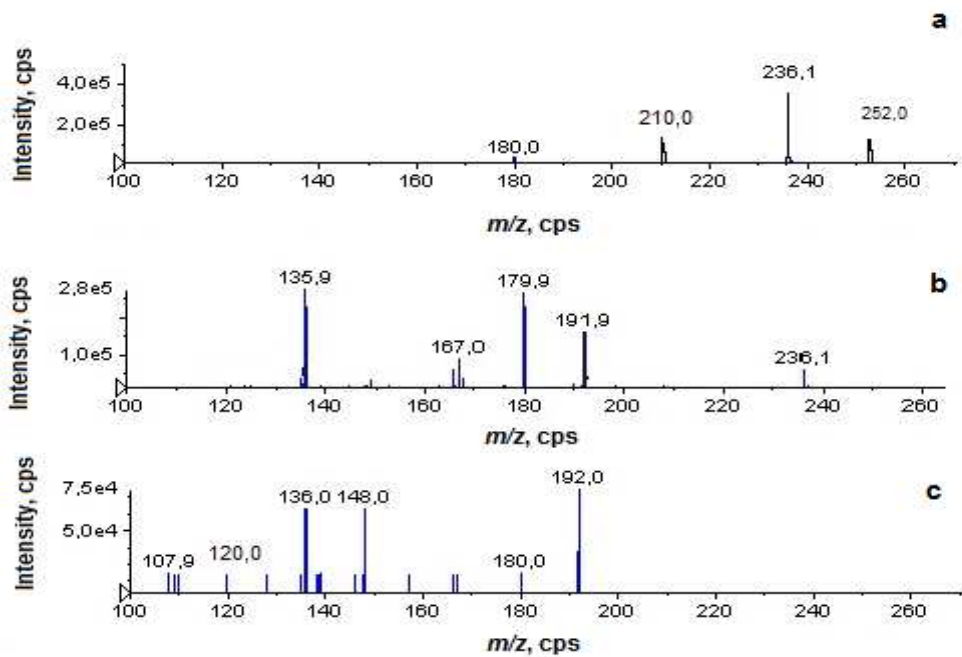


Figura 31 - Espectro de massas do metabólito carbamazepina 10,11-epóxido, íon-pai  $m/z$  252 e seus fragmentos em amostra de efluente geral do HUSM. Condição: *Enhanced MS+* EPI com: (a) fragmentos com CE de 20 V; (b) fragmentos com CE de 40 V e (c) fragmentos com CE de 60 V.

O metabólito carbamazepina 10,11-epóxido também foi encontrado no efluente do PA do HUSM pelo experimento EMS com EPI CE 20, 40 e 60 V (Figura 32).

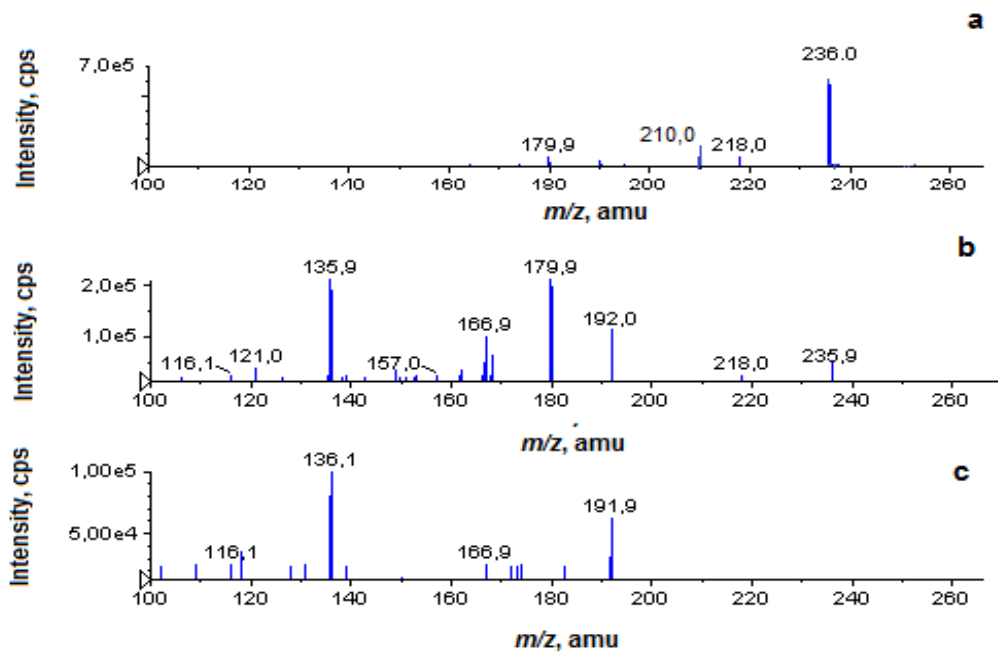


Figura 32 - Espectro de massas do metabólito carbamazepina 10,11-epóxido, íon-pai  $m/z$  252 e seus fragmentos. Em amostra de efluente PA-HUSM Condição: *Enhanced MS+* EPI (a) com CE 20 V, (b) com CE 40 V, (c) com CE 60 V.

O experimento proporcionou o estudo da fragmentação, considerando os fragmentos presentes nos espectros de massas obtidos com as diferentes energias de colisão desse metabólito (Figura 33), a partir íon  $m/z$  252, de modo a ocorrer a quebra na cadeia lateral da carboxamida com a perda do grupamento  $\text{NH}_2$ . Isso acarretou a formação do fragmento  $m/z$  236, que, após sofrer uma nova ruptura em sua estrutura, perdeu  $2\text{CO}$ , formando o fragmento  $m/z$  180 e, por fim, ocorre uma ruptura do anel com a perda de  $\text{CH}$  formando  $m/z$  167, o que foi confirmado por Miao & Metcalfe (2003) em determinações de amostras de águas de superfície e efluentes. Diferentes pesquisadores encontraram estes fragmentos em seus experimentos, como: Breton *et al.* (2005), que realizaram determinações dos metabólitos em plasma humano, Niessen *et al.* (2011) e Royen *et al.* (2002).

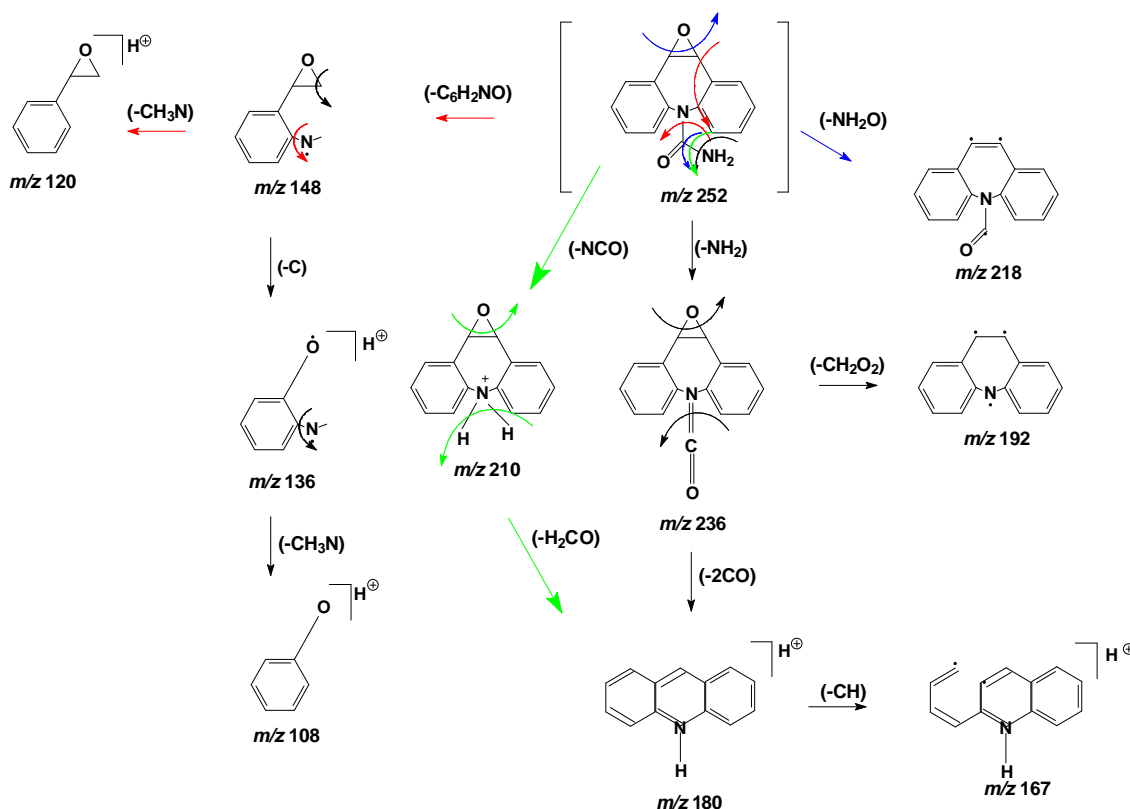


Figura 33 - Rota de fragmentação proposta para o metabólito carbamazepina 10,11 epóxido.

A partir do íon  $m/z$  252, pode ocorrer também a formação do fragmento de  $m/z$  210, que é resultante da perda do grupamento  $\text{NCO}$ , utilizando um  $\text{MS}^2$  e posterior perda do grupamento  $\text{H}_2\text{CO}$ , formando o fragmento  $m/z$  180. Outra rota proposta seria ruptura do íon  $m/z$  252, em que ocorre a perda do grupamento  $\text{C}_6\text{H}_2\text{NO}$ , originando o fragmento de  $m/z$  148., Logo em seguida, ocorre a perda de

um íon C, que forma o fragmento de  $m/z$  136, e a quebra do grupamento  $\text{CH}_3\text{N}$  formando o fragmento de  $m/z$  108.

Diferentes pesquisadores detectaram a presença do metabólito carbamazepina 10,11-epóxido: em afluente  $4,1 \text{ ng L}^{-1}$  (Gebhardt & Schröder, 2007),  $880\text{-}4026 \text{ ng L}^{-1}$  (Huerta-Fontela et al., 2010) e  $300\text{-}500 \text{ ng L}^{-1}$  (Gómez et al., 2007); em efluente detectou-se  $52,0 \text{ ng L}^{-1}$  (Gebhardt & Schröder, 2007) e  $69\text{-}2377 \text{ ng L}^{-1}$  (Huerta-Fontela et al., 2010) e  $300 \text{ ng L}^{-1}$  (Gómez et al., 2007).

#### 5.4.3.2 Metabólito 10-dihidro-10,11-dihidroxicarbamazepina

Uma segunda via do metabolismo da carbamazepina forma diversos metabólitos hidroxilados. O metabólito 10-dihidro-10,11-dihidroxicarbamazepina (10-OH-CBZ)  $m/z$  255 foi encontrado no efluente PA-HUSM através do experimento precursor íon 194 com 3 experimentos de EPI e três energias de colisão diferentes 20, 40 e 60 V. Os experimentos de CE 20 e 40 V mostraram as melhores fragmentações para o metabólito 10-OH-CBZ (Figura 34).

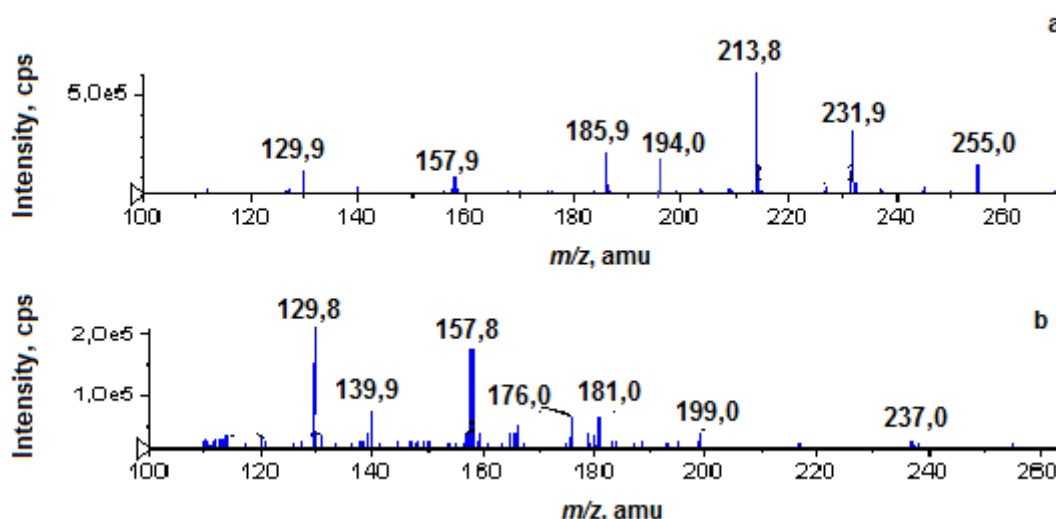


Figura 34 - Espectro de massas do metabólito 10-OH-CBZ e seus fragmentos, em amostra efluente PA-HUSM. Precursor íon 194 + EPI. Condição: *Enhanced MS+* EPI (a) com energia de colisão 20 V, (b) com energia de colisão 40 V.

A proposição da rota de fragmentação do metabólito 10-OH-CBZ está descrita na Figura 35. A partir do íon  $m/z$  255, um dos principais caminhos de fragmentações é através da perda de água, formando o íon com  $m/z$  237,0 (fragmento identificado

por Miao & Metcalfe (2003) em águas de superfície e efluentes). Posteriormente, ocorre a formação do fragmento do ion com  $m/z$  194,0, através da perda de ácido isociânico (HCNO). Esses fragmentos foram obtidos por Breton *et al.* (2005) e as quebras foram confirmadas por Calza *et al.* (2012), os quais afirmaram que a deslocalização de elétrons ao longo do sistema aromático confere elevada estabilidade à molécula e impedem uma nova quebra. Uma segunda via de fragmentação proposta para a formação do fragmento  $m/z$  194 seria através da perda do grupamento carbomoiil (HNCO), originando o fragmento  $m/z$  212 e, logo em seguida, ocorre a perda de água.

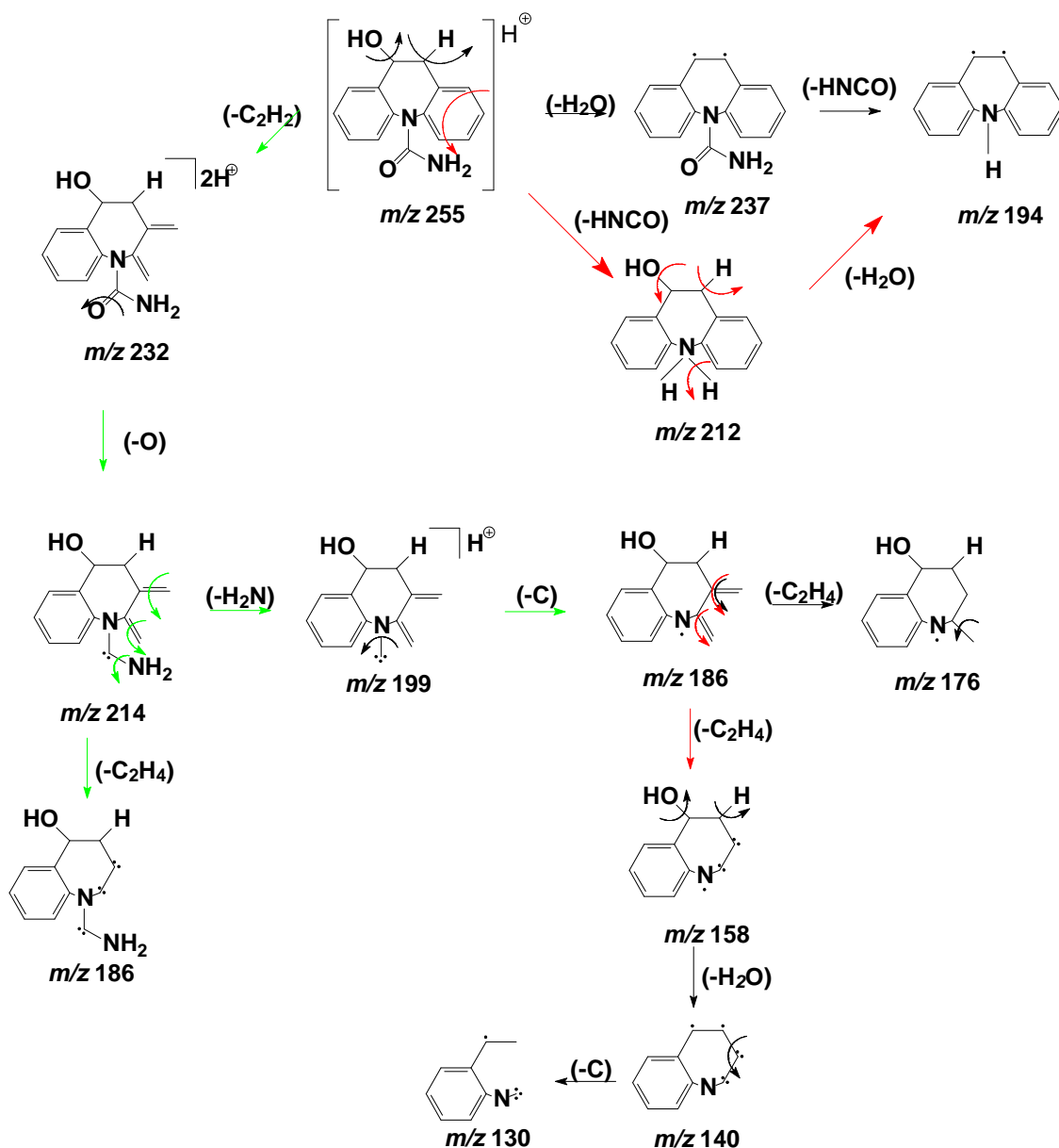


Figura 35 - Rota de fragmentação proposta para o metabólito 10-OH-CBZ.

Uma terceira rota proposta, a partir do íon  $m/z$  252 pode ocorrer com a quebra do grupamento  $C_2H_2$  formando o  $m/z$  232, perdendo na sequência o íon de O ( $m/z$  214) e o do grupamento  $C_2H_4$  ( $m/z$  186).

#### 5.4.3.3 Metabólito 2-Hidróxi-carbamazepina

Outro metabólito hidroxilado é o 2-hidróxi-carbamazepina (2-OH-CBZ) com íon  $m/z$  253 e foi encontrado no efluente geral do HUSM. Sua fragmentação foi obtida através do experimento de EMS + 3 EPI com CE 20, 40 e 60 V. Os espectros de massas da fragmentação do metabólito podem ser observados na Figura 36. Os pesquisadores Gebhardt & Schröder (2007) detectaram a presença desse metabólito em afluente  $94 \text{ ng L}^{-1}$  e em efluente  $130 \text{ ng L}^{-1}$  no Canadá.

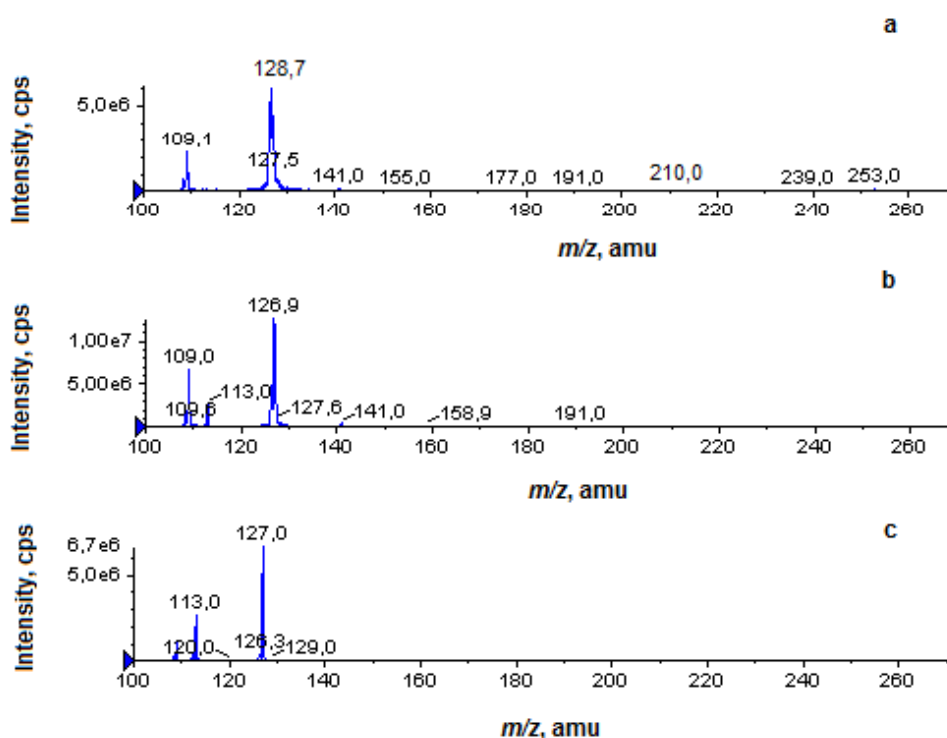


Figura 36 - Espectro de massas do metabólito 2-OH-carbamazepina  $m/z$  253 e seus fragmentos, amostra efluente geral HUSM. Condição: *Enhanced MS+ EPI* (a) com energia de colisão 20 V, (b) com energia de colisão 40 V, (c) com energia de colisão 60 V.

A rota de fragmentação proposta para o metabólito 2-OH-CBZ está descrita na Figura 37. A partir do íon  $m/z$  253, foi obtido o fragmento  $m/z$  210, através da perda do grupamento HNCO (43 Da), sendo comprovado por Miao & Metcalfe



(2003), ao detectarem a presença do metabólito em amostras de afluente e efluente. A formação desse fragmento também foi obtido por Breton et al. (2005) e Calza et al. (2012).

Uma segunda via proposta foi a formação do íon  $m/z$  236 através da perda de  $\text{NH}_3$  que, após sofrer uma nova ruptura em sua estrutura, perde  $\text{C}_2\text{O}_2$ , formando o fragmento  $m/z$  180. Outra rota proposta para a formação do fragmento  $m/z$  191 seria através da perda dos grupamentos  $\text{CH}_3$  e  $\text{NO}_2$ , seguido de sucessivas quebras dos anéis aromáticos, formando os íons  $m/z$  177, 159, 155, 141 e 109.

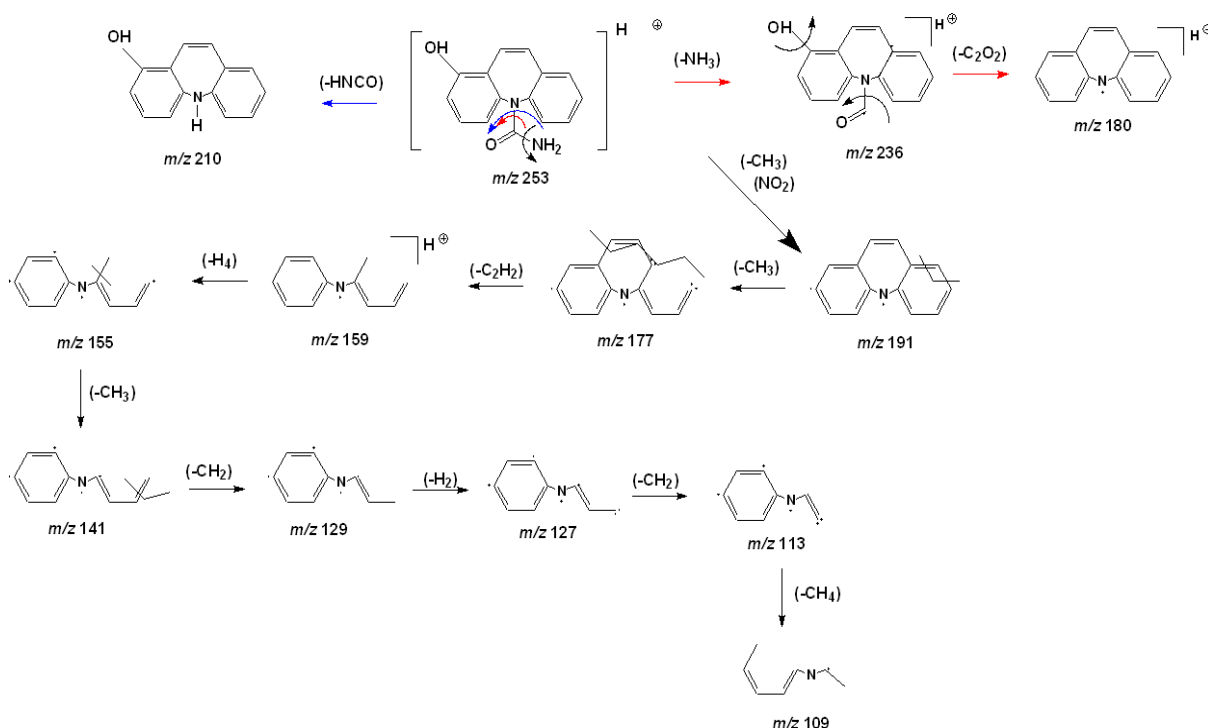


Figura 37 - Rota proposta para a fragmentação do metabólito 2-OH-carbamazepina.

#### 5.4.3.4 Iminoquinona

A iminoquinona é um metabólito secundário da carbamazepina que pode ser considerado potencialmente ativo com  $m/z$  207, e foi encontrado no efluente PA-HUSM e no efluente geral do HUSM. Os experimentos utilizados para o estudo da fragmentação deste metabólito foram EMS + EPI com 3 CE. Os experimentos de CE 20 e 40 V mostraram as melhores fragmentações para o metabólito iminoquinona no efluente do PA (Figura 38) e no efluente geral (Figura 39).

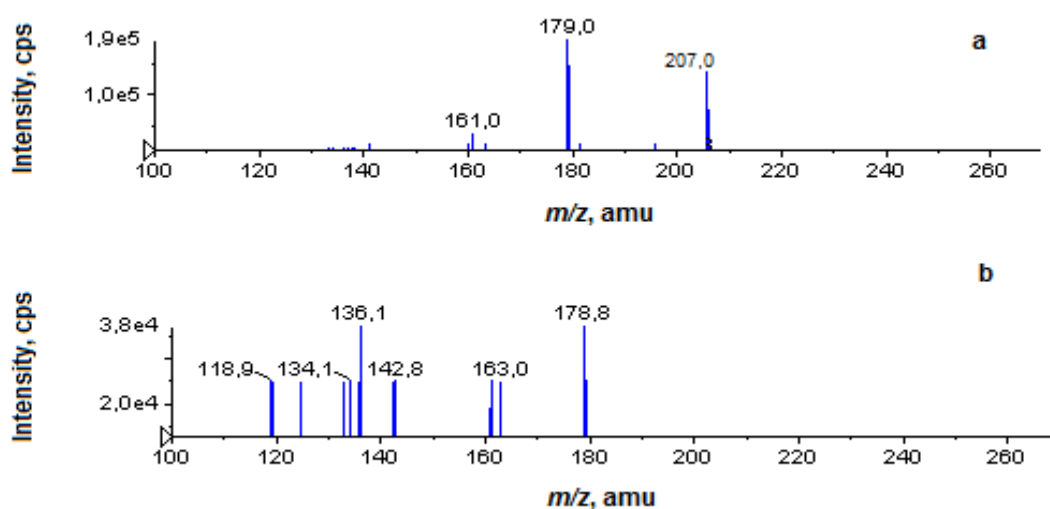


Figura 38 - Espectro de massas do metabólito iminoquinona  $m/z$  207 e seus fragmentos, amostra efluente PA-HUSM. Condição: *Enhanced MS+ EPI* (a) com energia de colisão 20 V; (b) com energia de colisão 40 V.

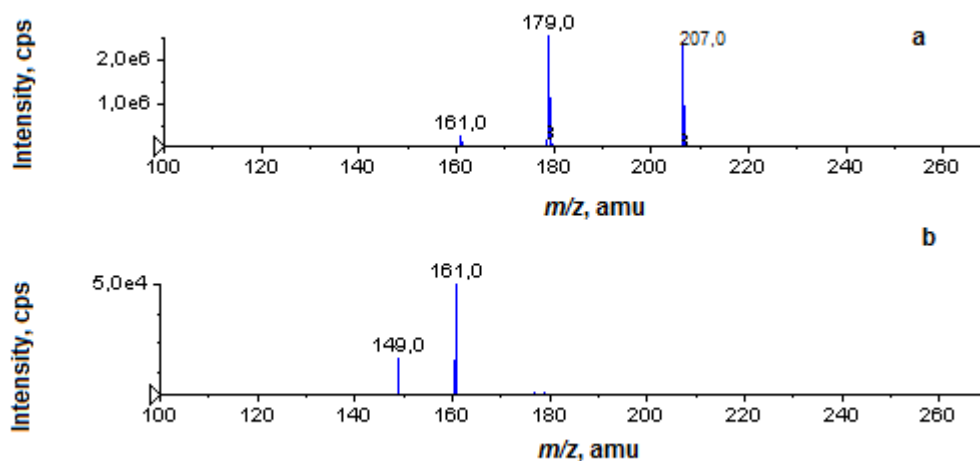


Figura 39 - Espectro de massas do metabólito iminoquinona  $m/z$  207 e seus fragmentos, amostra efluente geral-HUSM. Condição: *Enhanced MS+ EPI* (a) com energia de colisão 20 V, (b) com energia de colisão 40 V.

A Figura 40 demonstra o caminho proposto para a fragmentação do metabólito iminoquinona (íon  $m/z$  207), através da quebra dos anéis aromáticos com a perda do grupamento  $C_3H_3O$ , formando o fragmento  $m/z$  161,0 e, após, sofre sucessivas perdas de grupamentos  $CH_3$  (fragmentos  $m/z$  149, 136, 134, 119).

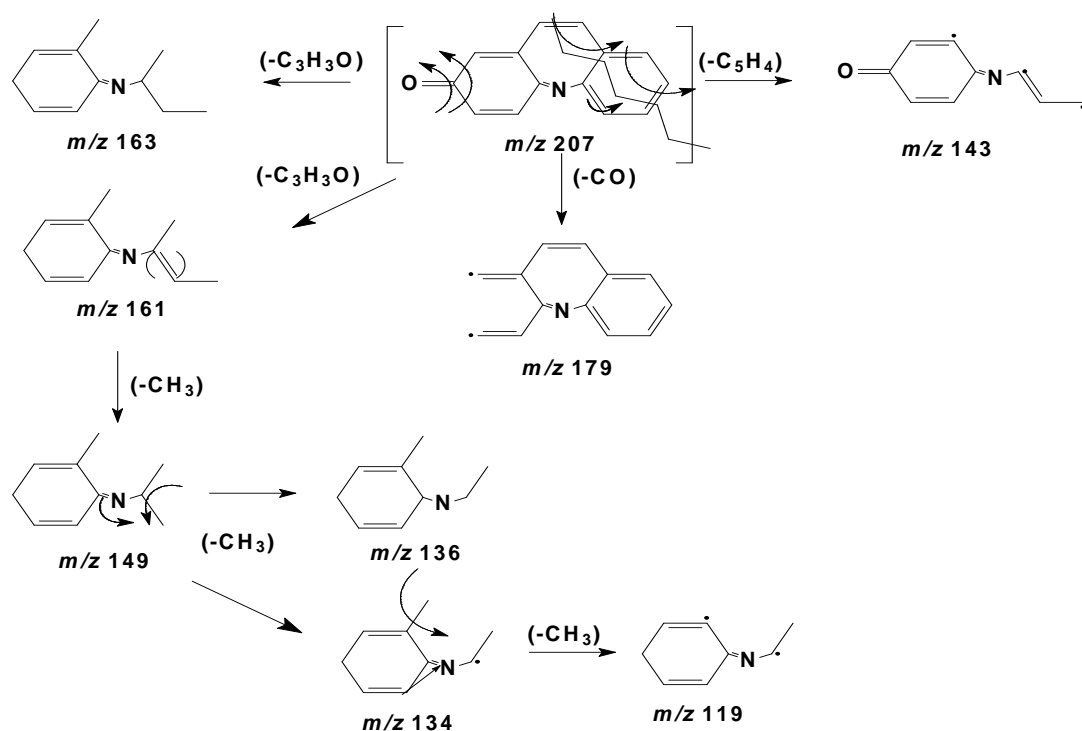


Figura 40 - Rota proposta para a fragmentação do metabólito iminoquinona.

### 5.4.3.5 Acridona

A acridona é um metabólito secundário da carbamazepina, sendo esse suspeito de apresentar toxidez. O íon  $m/z$  196 foi encontrado no efluente geral do HUSM, o experimento de IDA que permitiu a identificação da acridona foi o EMS seguido de EPI com 3 CE 20, 40 e 60 V, o estudo de diferentes espectros de fragmentos de massas está demonstrado na Figura 41.

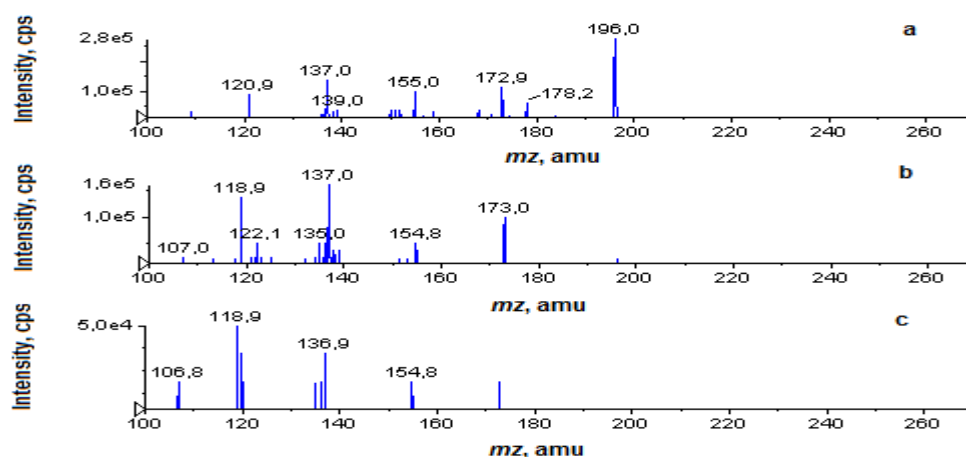


Figura 41 - Espectro de massas do metabólito acridona  $m/z$  196 e seus fragmentos, amostra efluente geral HUSM. Condição: *Enhanced MS+ EPI* (a) com energia de colisão 20 V, (b) com energia de colisão 40 V e (c) com energia de colisão 60 V.

Na Figura 42 estão demonstradas as principais proposições para a fragmentação do metabólito acridona (íon  $m/z$  196), em que foi verificada a quebra do grupamento HCO, formando o fragmento  $m/z$  167,0 o que foi comprovado nos relatos de Breton *et al.* (2005) em plasma humano. Uma segunda via seria a perda do radical OH, com a formação do íon com  $m/z$  178,0 e posterior perda de  $C_3H_3$  formando o fragmento  $m/z$  139,0.

Uma terceira via de fragmentação seria a quebra do grupamento  $C_2H_2$  formando o íon de  $m/z$  173 e posterior perda de um íon de O, cujo  $m/z$  é 155. Outra via alternativa seria a quebra do anel aromático a partir do íon  $m/z$  173, com sucessivas fragmentações, até formar o íon  $m/z$  107.

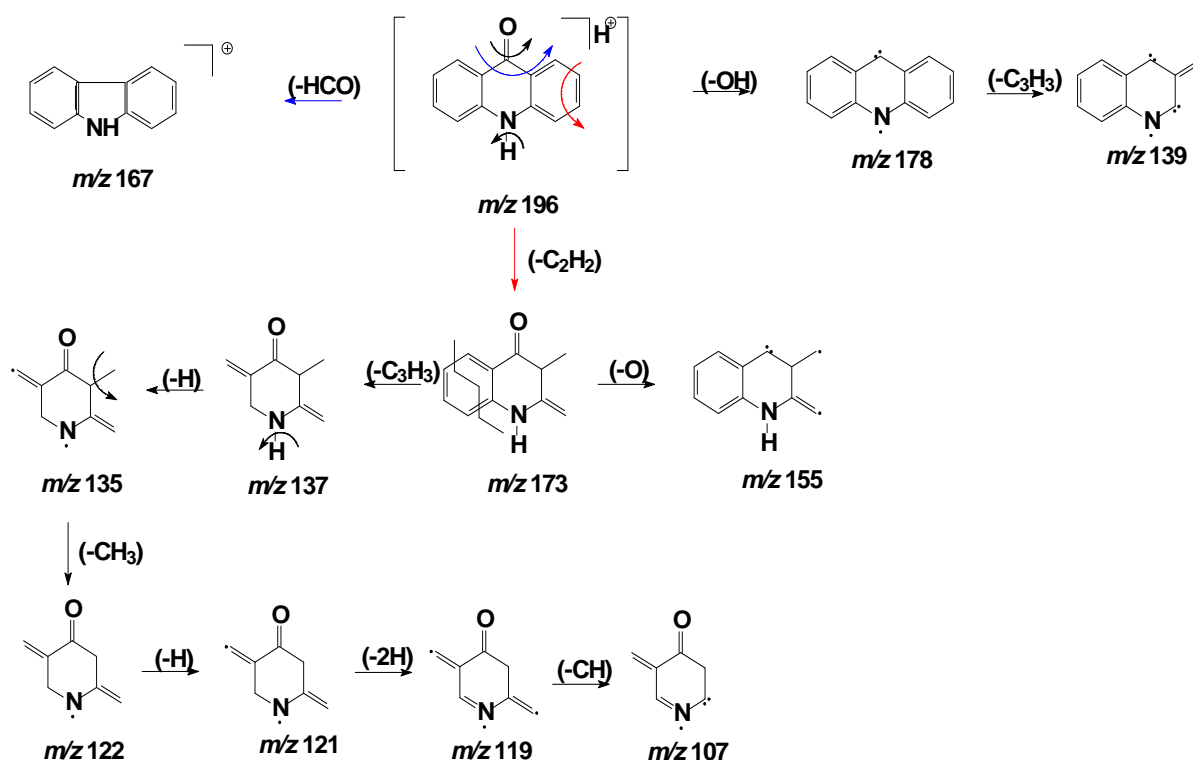


Figura 42 - Rota de fragmentação proposta para o metabólito acridona.

#### 5.4.4 Metabólitos do diazepam

O diazepam é biotransformado, principalmente, ao nível hepático por enzimas do sistema microsômico do citocromo P450, CYP2C e CYP3A, sendo três os metabólitos biologicamente ativos: nordiazepam, temazepam e oxazepam (FREIRE *et al.*, 2005).

#### 5.4.4.1 Nordiazepam (N-desmetildiazepam)

O metabólito nordiazepam com íon  $m/z$  271 foi encontrado somente no efluente geral HUSM, através do experimento de IDA. O que permitiu a identificação do nordiazepam foi o EMS seguido de EPI com 3 CE de 20, 40 e 60 V, proporcionando o estudo de diferentes espectros de fragmentos de massas (Figura 43).

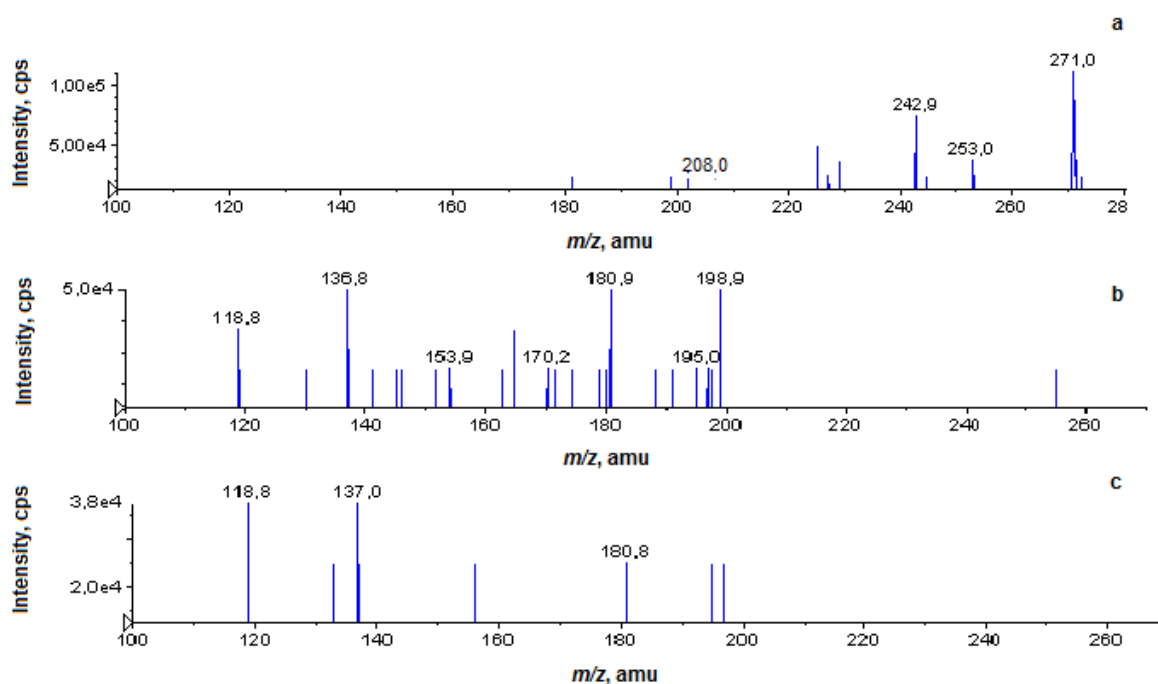


Figura 43 - Espectro de massas do metabólito nordiazepam  $m/z$  271 e seus fragmentos, amostra efluente geral HUSM. Condição: *Enhanced MS+* EPI (a) com energia de colisão 20 V, (b) com energia de colisão 40 V e (c) com energia de colisão 60 V.

O metabólito nordiazepam é o principal derivado de muitos fármacos benzodiazepínicos, e entre eles, o diazepam, que apresenta um grupo Cl na posição 7, e um íon  $m/z$  271, sendo encontrado somente no efluente geral do HUSM. Na Figura 44, está proposto o caminho de fragmentação para o metabólito nordiazepam. A formação do fragmento  $m/z$  243 que, após sofrer ionização *electrospray* por protonação em modo positivo, resulta na perda de uma molécula de CO (28 u). Isso resulta na contração do anel de sete membros a uma ressonância estabilizada de seis membros. Após, ocorre a perda de Cl, originando um cátion estabilizado por ressonância (fragmento  $m/z$  208). Essas fragmentações são

confirmadas pelos experimentos encontrados por Smyth *et al.* (2000), Smink *et al.* (2004) e Risoli *et al.* (2007).

Uma segunda proposição de rota de fragmentação foi através da perda de uma molécula de OH formando íon  $m/z$  253 e a seguir o grupamento  $C_2H_5N_2$  (íon  $m/z$  199). Ainda, uma terceira rota proposta seria pela perda do grupamento  $C_6H_5$  (íon  $m/z$  195) e, em seguida, pela ocorrência de sucessivas quebras do anel de sete membros (fragmentos íon  $m/z$  181, 170, até formar o íon  $m/z$  137).

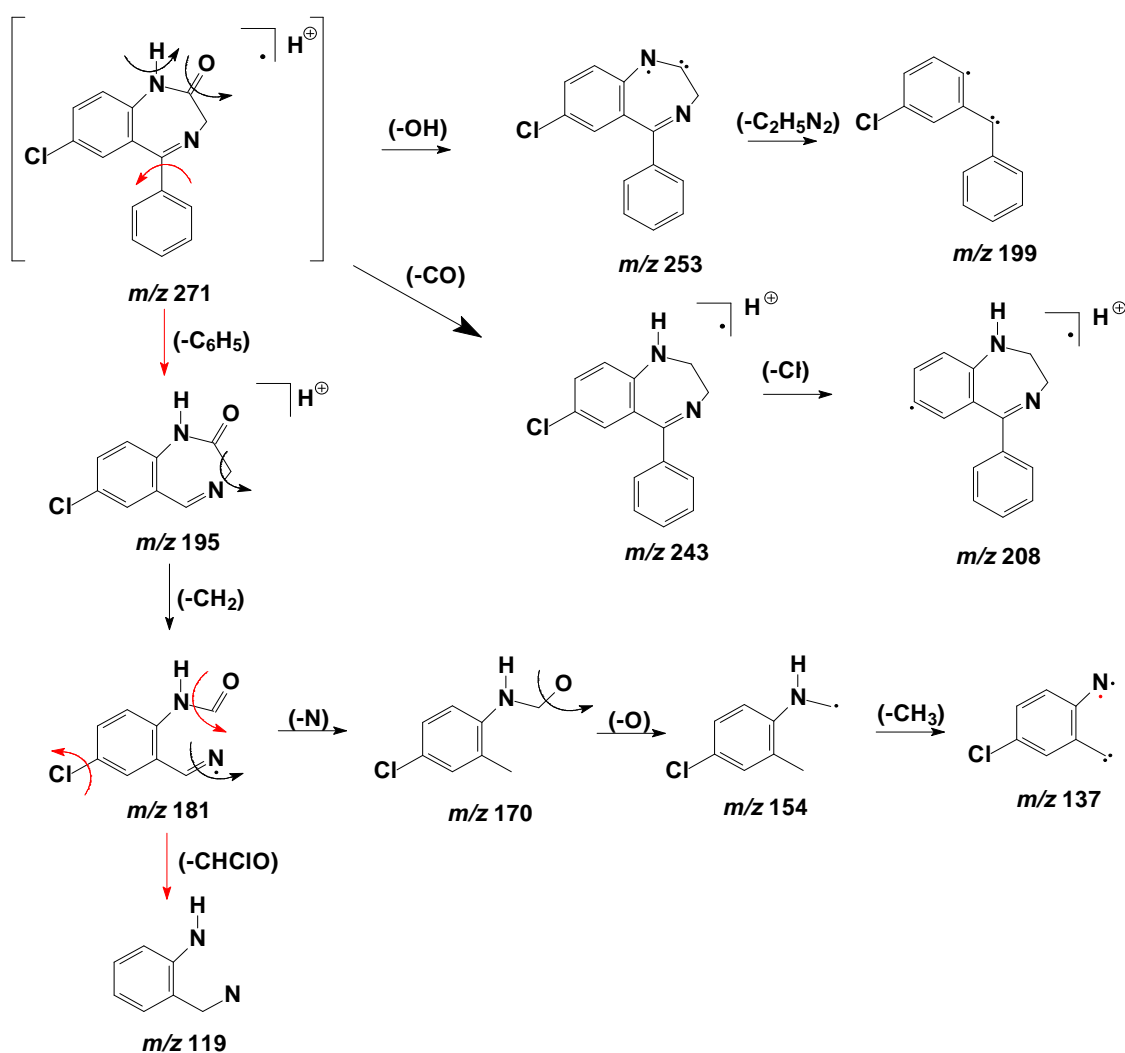


Figura 44 - Rota de fragmentação proposta para o metabólito nordiazepam.

Nos experimentos realizados por Kim *et al.* (2011) foi encontrado o íon  $m/z$  271 em amostras de pelos de rato, porém os fragmentos obtidos foram diferentes (íons  $m/z$  140 e 165), provavelmente, devido à utilização de CE diferente (37 e 31, respectivamente). Os mesmos fragmentos foram encontrados por tais autores em

amostras de cabelo humano e, também, em pelos de ratos que receberam a administração de diazepam.

O mesmo íon  $m/z$  271 e os fragmentos 140 e 165, também encontrados por Villain *et al.* (2005) e Xiang *et al.* (2011), ao analisarem amostras de cabelo. Nos relatos de Smink *et al.* (2004), foi encontrado o íon  $m/z$  271, porém os fragmentos obtidos foram diferentes (243, 208 e 140) e determinados em amostras de sangue total.

#### 5.4.4.2 Oxazepam

O Oxazepam (íon  $m/z$  287) é um metabólito ativo derivado do diazepam e foi encontrado somente no efluente geral do HUSM, através do experimento EMS-EPI com três de CE 20, 40 e 60 V. Os espectros de massas com suas fragmentações podem ser observados na Figura 45.

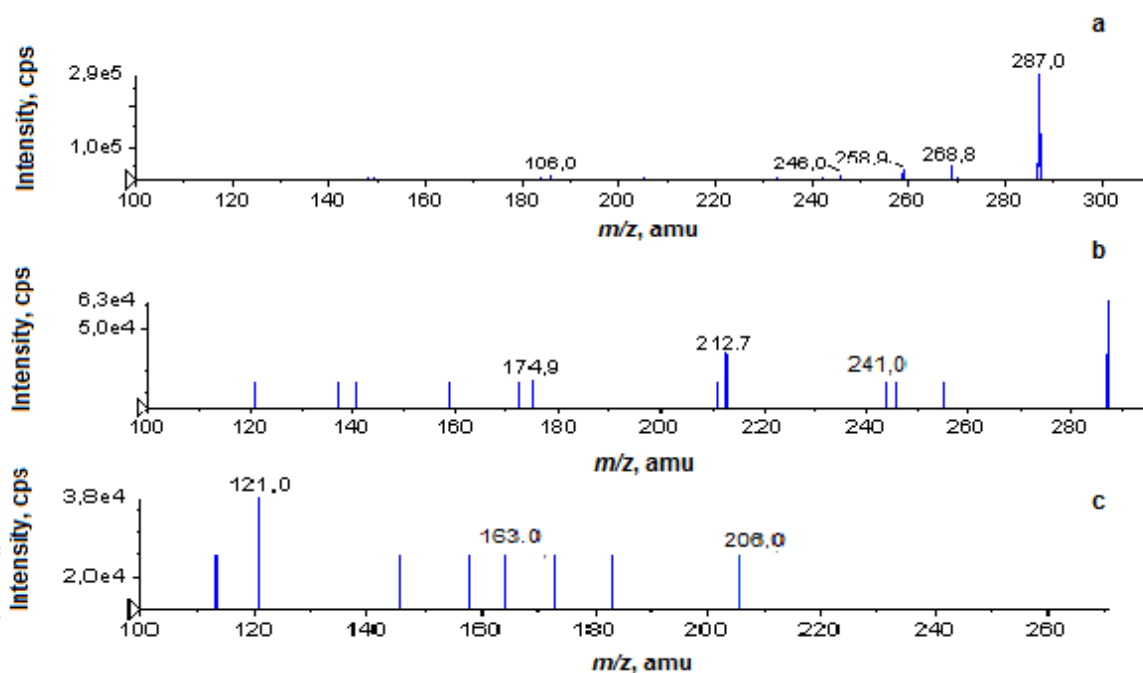


Figura 45 - Espectro de massas do metabólito oxazepam  $m/z$  287 e seus fragmentos, amostra efluente geral HUSM. Condição: *Enhanced MS+ EPI* (a) com energia de colisão 20 V, (b) com energia de colisão 40 V, (c) com energia de colisão 60 V.

O caminho de fragmentação para o metabólito oxazepam ( $m/z$  287) foi proposto considerando os fragmentos presentes nos espectros de massas obtidos com as diferentes energias de colisão (Figura 46).

A formação do fragmento  $m/z$  269 é resultado da perda de espécie neutra  $H_2O$  (18 amu), a qual ocorre utilizando um  $MS^2$  no *íon trap*, que deixa intacto o íon carbônio do anel de sete membros, conforme o comprovado pelos experimentos de Smyth et al. (2000). No entanto, Smyth et al. (2010) relataram que tal perda de água a partir do anel benzodiazepínico, acarreta a contração do anel, que fica com 6 membros.

Na sequência, semelhante ao que aconteceu com o nordiazepam, aqui também ocorreu a perda de radical CO, formando o fragmento  $m/z$  241. Outra perda é de cloro (35u) com formação do radical  $m/z$  206 comprovado por Smyth et al. (2000), Smink et al. (2004) e Kim et al. (2011). Outro caminho que pode ser seguido a partir do  $m/z$  241 seria a perda de um grupamento fenil resultando na formação de um carbocátion (fragmento  $m/z$  163), isto foi comprovado por Villain et al. (2005) e também por Smyth et al. (2010) em amostras de cabelo.

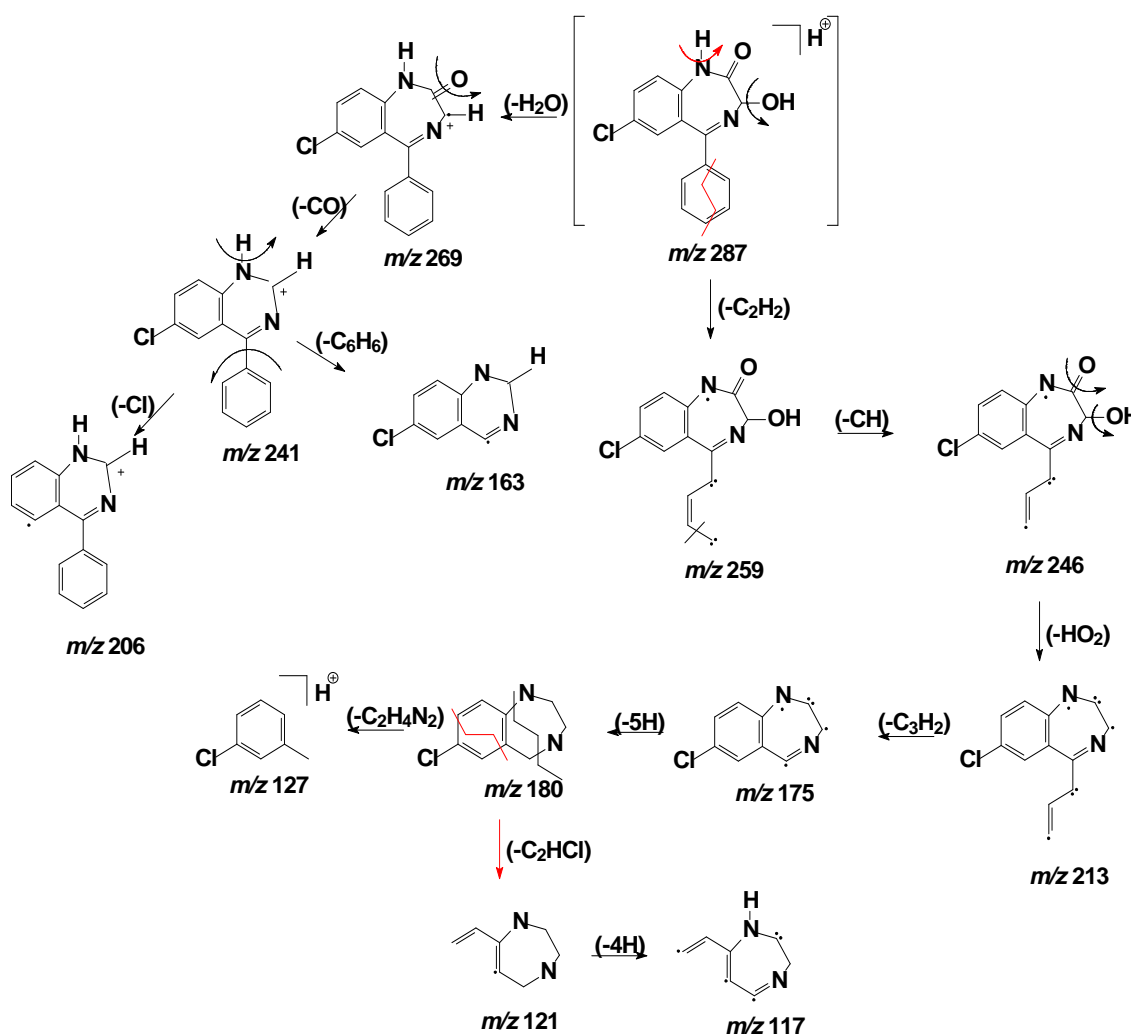




Figura 46 - Rota de fragmentação proposta para o metabólito oxazepam.

Uma segunda rota alternativa seria a perda de um grupamento  $C_2H_2$  com a quebra de radical fenil formando o íon  $m/z$  259.

Xiang *et al.* (2011) também obtiveram o íon-pai de  $m/z$  287,2, porém os fragmentos encontrados foram diferentes (140,2 e 208,1) provavelmente porque foi utilizada uma CE de 36 V.

#### 5.4.4.3 Temazepam

O temazepam ( $m/z$  301,2) é um metabólito derivado do hidroxilado de diazepam, que foi encontrado no efluente geral do HUSM pelo experimento *Precursor ion* 154 + EPI com 3 energias de colisão avaliadas. Os espectros de massas gerados por este experimento podem ser visto na Figura 47.

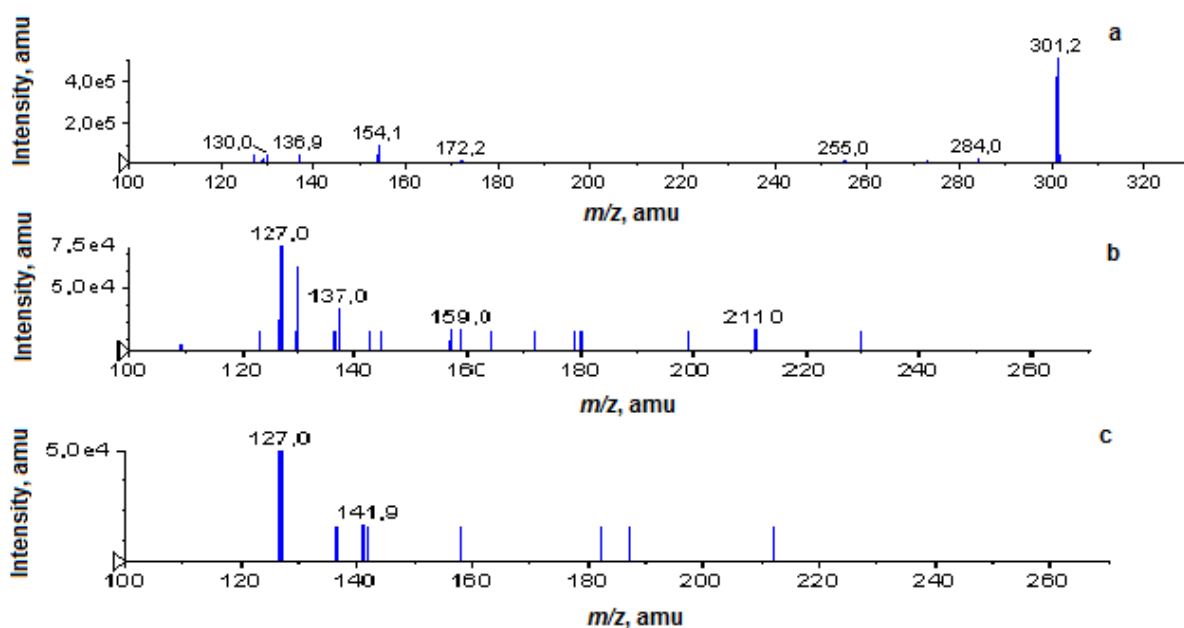


Figura 47 - Espectro de massas do metabólito temazepam  $m/z$  301,2 e seus fragmentos, amostra efluente geral HUSM. Precursor íon 154. Condição: *Enhanced MS+ EPI* (a) com energia de colisão 20 V, (b) com energia de colisão 40 V e (c) com energia de colisão 60 V.

As melhores fragmentações nesse experimento foram com as energias de 20 e 40 V. Os espectros de massas gerados pelo experimento podem ser vistos na Figura 48. Em função disso, os resultados são parecidos com os resultados encontrados por Jager & Bailey (2011) em que se verificou a formação do íon  $m/z$  300,9, e os fragmentos 255 e 177,5 em amostras de urina, utilizando CE de 31 V.

O metabólito temazepam  $m/z$  301,0 foi encontrado no efluente geral do HUSM pelo experimento *Precursor Íon 154 + EPI* com 3 energias de colisão avaliadas.

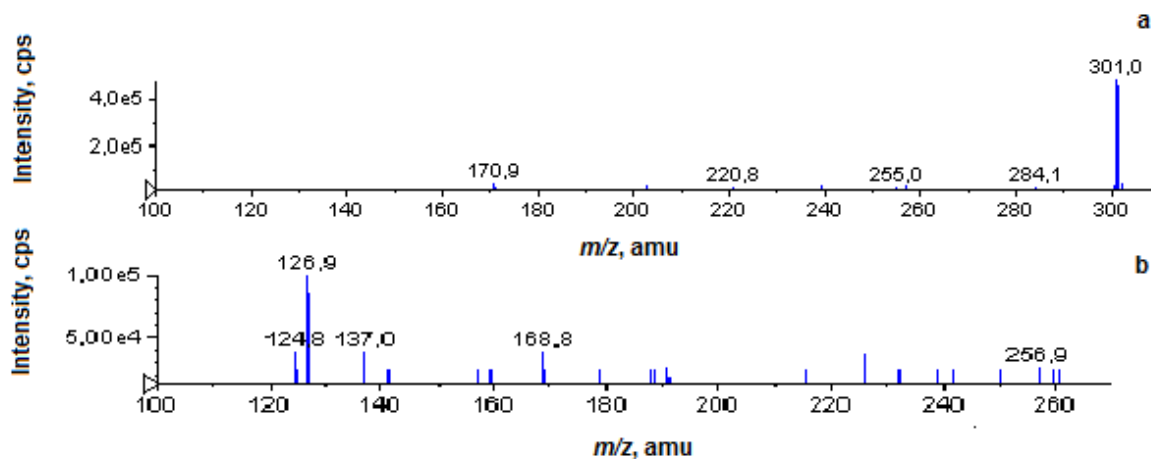


Figura 48 - Espectro de massas do metabólito temazepam  $m/z$  301 e seus fragmentos, amostra efluente geral HUSM. Condição: *Enhanced MS+ EPI* (a) com energia de colisão 20 V, (b) com energia de colisão 40 V.

O metabólito temazepam também foi encontrado no efluente PA-HUSM, pelo experimento EMS + EPI com 3 energias de colisão 20, 40 e 60 V. Os espectros de massas gerados por este experimento podem ser observados na Figura 49.

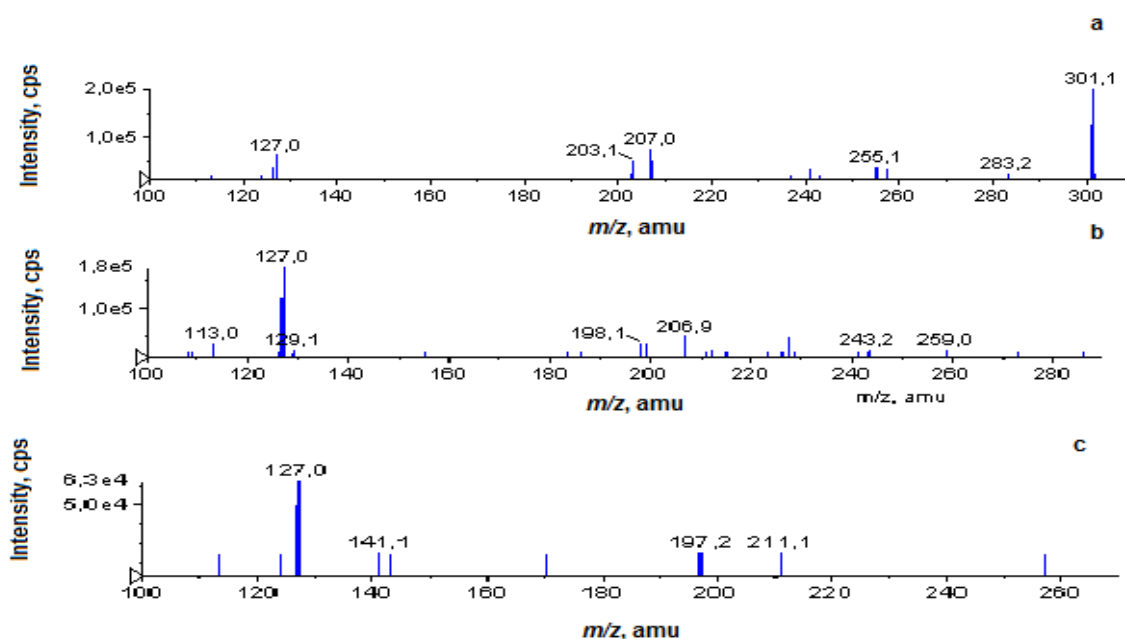


Figura 49 - Espectro de massas do metabólito temazepam  $m/z$  301 e seus fragmentos, amostra efluente PA-HUSM. Condição: *Enhanced MS+ EPI* (a) com energia de colisão 20 V, (b) com energia de colisão 40 V e (c) com energia de colisão 60 V.

A rota de fragmentação para o metabólito temazepam  $m/z$  301,0 foi proposto considerando os fragmentos presentes nos espectros de massas obtidos com as diferentes energias de colisão (Figura 50). A formação do fragmento  $m/z$  283 foi resultado da perda de espécie neutra  $H_2O$  (18u), que foi comprovado por Smyth et al. (2000). Outra quebra que ocorreu foi a perda de radical  $CO$ , formando o fragmento  $m/z$  255. Tal fragmento foi encontrado nos relatos de Rust et al. (2012), Xiang et al. (2011) e Kim et al. (2011) ao analisarem amostras de cabelo, resultados semelhantes aos obtidos por Smink et al. (2004), que encontraram  $m/z$  301, ao determinarem esses compostos em amostras de sangue total.

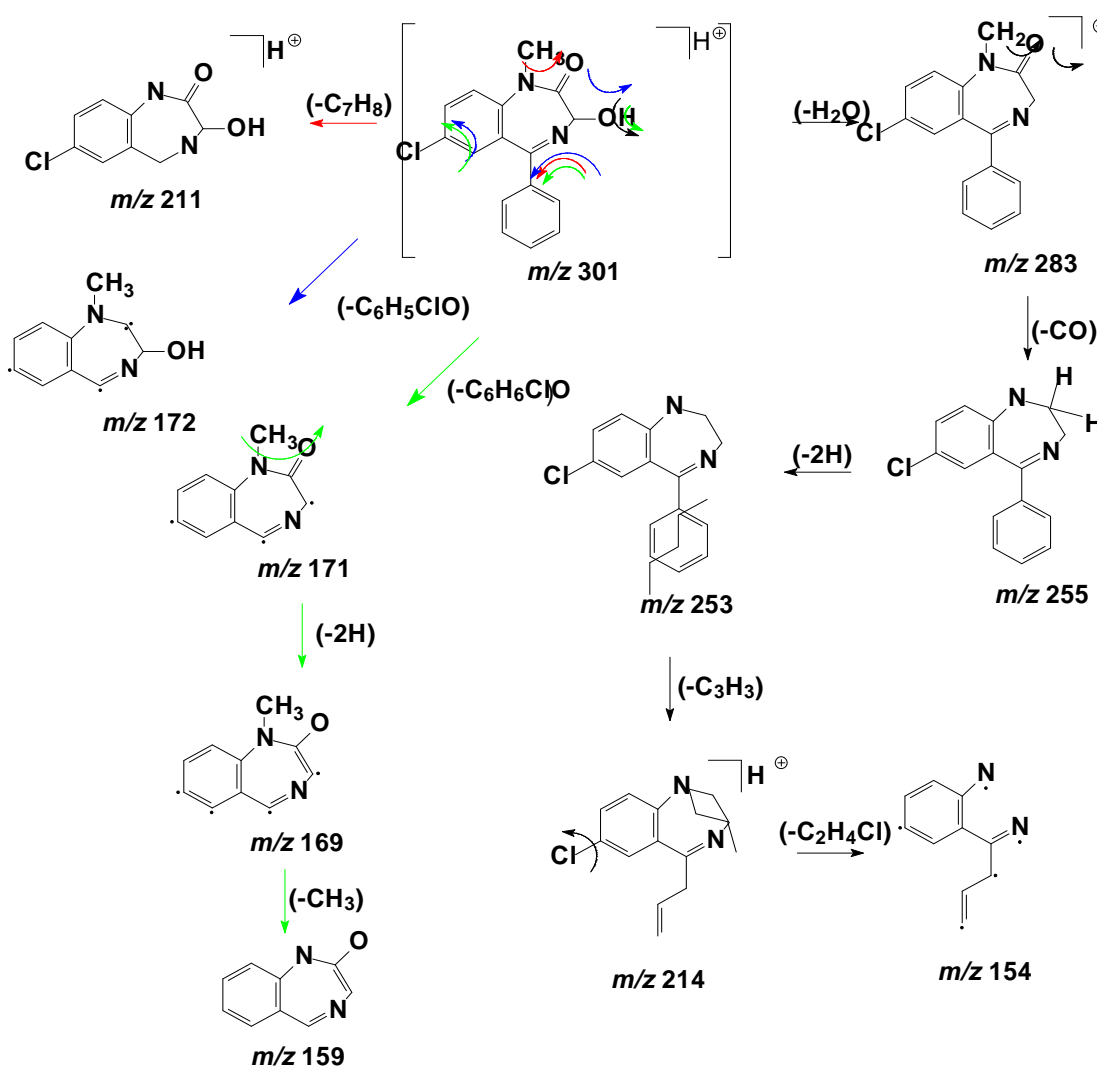


Figura 50 - Rota de fragmentação proposta para o metabólito temazepam.

Na Tabela 21 estão demonstrados os íons precursores e íons produtos dos fármacos psicoativos identificados no efluente do HUSM. Estes resultados estão de acordo com os dados encontrados na literatura, conforme pode-se observar na Tabela 3.

Tabela 21 – Íon precursor ( $M+H^+$ ) e íon produto ( $m/z$ ) de ansiolíticos, antiepilépticos e seus metabólitos identificados no efluente do PA-HUSM e efluente geral.

Composto	Íon precursor $M+H^+$ ( $m/z$ )	Íon produto ( $m/z$ )	Metabólitos	Íon precursor $M+H^+$ ( $m/z$ )	Íon produto ( $m/z$ )	Matriz (efluente)
Bromazepam	316	214/151	3-OH bromazepam	332	314	PA-HUSM
			Carbamazepina 10,11-epóxido	252	236	PA-HUSM
			10-dihidro-10,11-dihidroxicarbamazepina	255	231,9	PA-HUSM
Carbamazepina	237	194/179	2-OH-carbamazepina	253	239	Geral
			Iminoquinona	207	179	PA-HUSM
			Acridona	196	167	Geral
Clonazepam	316	270/181	7-aminoclonazepam	286	222	PA-HUSM
			Nordiazepam	271	253	Geral
Diazepam	285	193/154	Oxazepam	287	241	Geral
			Temazepam	301	283	PA-HUSM
						Geral
Lorazepam	321	275/302,9	Não encontrado	-----	-----	-----

## 5.5 Avaliação preliminar do risco de drogas psicoativas no ambiente - o caso do HUSM

Neste estudo, foi conduzida uma avaliação preliminar do risco relacionado com a emissão de ansiolíticos e antiepilépticos mais utilizados no HUSM, a partir da concentração desses compostos no efluente tratado do HUSM. Comparou-se a concentração previsível no ambiente (PEC), com os valores de toxicidade relatados na literatura, que se refere à PNEC. Somente os dados de PNEC de diazepam e carbamazepina foram encontrados na literatura pesquisada. Além disso, investigou-se o consumo médio de água do HUSM, cerca de 1,3 m<sup>3</sup> por paciente, por dia, por um fluxo médio de 190 m<sup>3</sup> dia<sup>-1</sup> (Wilde et al, 2012.).

Para o cálculo do PEC, foi considerada a seguinte situação: (1) todas as drogas prescritas são usadas em tratamentos no hospital, (2) a fração excretada foi, integralmente, descarregada no sistema de esgoto hospitalar, (3) não há transformação dos medicamentos após a saída para o sistema de esgoto, e (4) que é suposto um padrão de uso dos produtos farmacêuticos, uniformes no tempo e no espaço (Wilde et al, 2012.).

O quociente de risco de cada fármaco foi calculado dividindo os valores de PEC pelos de PNEC. Os valores de PEC foram estimados da Equação 1. A

Tabela 222 apresenta os dados para a avaliação de risco dos ansiolíticos e antiepilépticos mais usados no HUSM.

Tabela 22 - Concentração ambiental predita (PEC) e o quociente de risco (QR) dos principais ansiolíticos e antiepilépticos usados no HUSM.

Composto	Excreção como composto ativo (%) <sup>a</sup>	Consumo Anual (g ano <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	PEC <sub>Eff.</sub> (µg L <sup>-1</sup> ) <sup>*</sup>	PEC <sub>Córr.</sub> (µg L <sup>-1</sup> ) <sup>*</sup>	PNEC (µg L <sup>-1</sup> )	QR (PEC/PNEC) <sup>d,*</sup>
Bromazepam	84	6	0,08	0,008	NE <sup>**</sup>	NE
Carbamazepina	20-30	1500	18,3	1,83	13,8 <sup>c</sup>	1,33
Clonazepam	90	14	0,18	0,018	NE	NE
Diazepam	70	178	2,31	0,23	2,0 <sup>c</sup>	1,16
Lorazepam	90	5	0,02	0,002	NE	NE

<sup>a</sup>Lima (2009); <sup>b</sup> Dados da farmácia do HUSM (2010); <sup>c</sup> Verlicchi et al. (2012); <sup>d</sup>Jonnes (2002); <sup>e</sup> Quociente de risco calculado teoricamente; <sup>\*</sup>Presente estudo; <sup>\*\*</sup> NE= Não encontrado na literatura.

Como pode ser observado, todos os compostos apresentaram valor de  $PEC_{\text{Eff.}}$  maior do que  $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$ , já no curso d'água ( $PEC_{\text{Córr.}}$ ) onde o esgoto do HUSM é lançado, os compostos carbamazepina, o clonazepam e o diazepam estavam acima desses valores, o que aponta para a problemática e a relevância do estudo de tais compostos.

Não foram encontrados dados na literatura sobre o PNEC para os compostos bromazepam, clonazepam e lorazepam, o que impossibilitou o cálculo do QR para tais compostos. Embora a carbamazepina tenha uma taxa de excreção baixa como composto ativo, ela apresenta uma maior PEC comparada com os outros compostos. Tanto a carbamazepina quanto o diazepam apresentam um QR acima de 1,0, o que merece mais atenção, pois apresenta um alto risco. O mesmo comportamento para o QR foi encontrado por Verlicchi et al. (2012).

Os valores de PNEC encontrados na literatura referem-se ao crustáceo *Daphnia magna*, indicando que para esse organismo a quantidade lançada pelo HUSM apresentaria risco encontrado nos relatos de Verlicchi et al. (2012). Por esta razão o impacto ambiental destes fármacos precisa ainda de atenção, pois ainda não se conhece sua ação crônica em longo prazo.

## 6 CONCLUSÕES

Ao término desta etapa trabalho pode-se concluir:

A utilização de ferramenta multivariada baseada em Metodologia de Superfície de Resposta (RSM) permitiu a otimização das variáveis experimentais;

Foram desenvolvidas e validadas três técnicas: HPLC-UV, LC-MS e LC-MS/MS\_Qtrap) para determinar fármacos psicoativos (bromazepam, carbamazepina, clonazepam, diazepam e lorazepam). Estas técnicas apresentaram ótimos resultados de validação;

O uso da técnica por HPLC-UV apresenta-se como alternativa devido ao baixo custo quando comparado a uso da espectrometria de massas.

As condições otimizadas para a metodologia de SPE obtidas para os ansiolíticos e antiepilépticos foram semelhantes e a variável sorvente atuou de maneira negativa, o que pôde ser comprovado através das variáveis que comparam o sorvente às outras variáveis. Os melhores resultados foram obtidos quando utilizou-se o sorvente C<sub>18</sub> Premium;

A confecção em laboratório de cartuchos para extração em fase sólida preparados diminui os custos. Os sorventes apolares Bond Elut, C<sub>18</sub> Premiun Grade e C<sub>18</sub> apresentaram recuperação maior que 75%, sendo que o sorvente C<sub>18</sub> Premiun Grade apresentou a melhor taxa de recuperação;

Dentre as técnicas avaliadas e desenvolvidas para a determinação dos fármacos em efluente hospitalar, o LC-MS/MS\_Qtrap é a mais sensível e seletiva para a determinação dos compostos, atingindo um limite de quantificação foi de 30,00 ±1,10 ng L<sup>-1</sup>, para bromazepam, clonazepam e lorazepam; carbamazepina, 50,00 ±1,81 ng L<sup>-1</sup> e, diazepam, 40,00 ±0,98 ng L<sup>-1</sup>, principalmente por que as concentrações determinadas estão na ordem de ng L<sup>-1</sup>;

Na investigação foram detectadas a presença de drogas psiquiátricas no efluente do PA-HUSM e efluente geral, sendo suas concentrações respectivamente, bromazepam, 195,0±6,4 ng L<sup>-1</sup> e 137,1±7,0 ng L<sup>-1</sup>; carbamazepina, 589,6±6,1 ng L<sup>-1</sup> e 460,7±9,3 ng L<sup>-1</sup>, diazepam, 645,0±0,3 ng L<sup>-1</sup> e 571,0±9,9 ng L<sup>-1</sup>, lorazepam, 95,7±6,7 ng L<sup>-1</sup> e 42,4±4,2 ng L<sup>-1</sup> e clonazepam, 134,3±9,8 ng L<sup>-1</sup> e 56,9±9,9 ng L<sup>-1</sup>, o que pode representar um risco para a saúde pública, uma vez que este efluente hospitalar final é descartado em curso d'água que percorre o Campus da UFSM;

Com o auxílio de LC-MS/MS\_QTrap ocorreu a identificação dos metabólitos de ansiolíticos e antiepilépticos no efluente hospitalar, tanto no efluente do PA-HUSM (ponto A), quanto no efluente geral (ponto B). Os metabólitos identificados foram: 3-hidroxi bromazepam (bromazepam), 7-amino clonazepam (clonazepam), carbamazepina 10,11 epóxido, 10-dihidroxi-10,11-dihidrocarbamazepina, iminoquinona, 2-hidroxi-carbamazepina e acridona (carbamazepina), nordiazepam, oxazepam e temazepam (diazepam), e, seus caminhos de fragmentação foram propostos;

A partir da avaliação de risco preliminar, os compostos carbamazepina e diazepam apresentaram o maior risco, possuindo Quociente de Risco teórico (0,85 e 0,90, respectivamente), o que requer maior atenção no que se refere à toxicidade.



## **7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

- Investigar a eficiência dos Processos Avançados de Oxidação (PAOS) na degradação dos ansiolíticos e antiepilépticos (bromazepam, carbamazepina, clonazepam, diazepam e lorazepam) em amostras de efluente hospitalar.
- Realizar estudo dos produtos gerados pela aplicação dos PAOS.
- Avaliar o comportamento da toxicidade do efluente hospitalar contendo ansiolíticos e antiepilépticos e seus metabólitos após o tratamento com PAOS.
- Fazer a quantificação dos metabólitos.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBARA, C.; BARDOT, I.; CAILLEUX, A. *et al.* **High-performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) method for the simultaneous determination of diazepam, atropine and pralidoxime in human plasma.** *Journal of Chromatography B*, v. 874, p. 42-50, 2008.

ABRAHAM, D.J. **Nervous System Agents – Burger’s Medicinal Chemistry & Drug Discovery.** v. 6, 6th ed, 2003.

AL-HAWASLI, H.; AL-KHAYAT, M.A.; AL-MARDINI, M.A. **Development of a validated hplc method for the separation and analysis of a bromazepam, medazepam and midazolam mixture.** *Journal of Pharmaceutical Analysis*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2012.05.001>. In press. 2012.

AL AUKIDY, M.; VERLICCHI, P.; JELIC, A. *et al.* **Monitoring release of pharmaceutical compounds: Occurrence and environmental risk assessment of two WWTP effluents and their receiving bodies in the Po Valley, Italy.** *Science Total Environmental*, v. 438, p. 15–25, 2012.

ALBANO, F.M; RAYA-RODRIGUEZ, M.T. **Validação e garantia da qualidade de ensaios laboratoriais - Guia Prático, Rede Metrológica.** Porto Alegre, RS, 2009.

ALVES, C. In: **Análise de fármacos em fluidos biológicos empregando o acoplamento SPME-LC/MS.** 2006. 199 f. Tese (Doutorado em Ciências - Química Analítica) – Universidade de São Paulo,. São Paulo, 2006.

ALMEIDA, M.G.; LIMA, I.V.; SILVA, I.V. *et al.* **Barbitúricos e benzodiazepínicos.** In: **Fundamentos de Toxicologia.** 3. ed., p. 277-281, 2008.

AMBROZIO, A. F.; SILVA, P.S.; CARVALHO, C.M. *et al.* **Mechanisms of Action of Carbamazepine and Its Derivatives, Oxcarbazepine, BIA 2-093, and BIA 2-024.** *Neurochemical Research*, v. 27, n. 1/2, p. 121–130, 2002.

ANDREOZZI, R.; MAROTTA, R.; PINTO, G. *et al.* **Carbamazepine in water: persistence in the environment, ozonation treatment and preliminary assessment on algal toxicity.** *Water Research*, v. 36, p. 2869–2877, 2002.

ANDREOZZI, R.; RAFFAELE, M.; NICKLAS, P. **Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment.** *Chemosphere*, v. 50, p. 1319–1330, 2003.

ANVISA 2005. **Guia para qualidade em química analítica: uma assistência para a acreditação.** 1. Ed., Brasília: ANVISA, 80 p, 2005.

ANVISA, 2004. **Resolução n. 306, de 7 de dezembro de 2004. Dispõe sobre o regulamento técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde.** Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, DF, 7 dez. 2004. Acesso em

Setembro 2012. Available at:  
[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2004/rdc/306\\_04rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2004/rdc/306_04rdc.htm).

APPLIED BIOSYSTEMS/MDS SCIEX – **Espectrometria de massas e suas aplicações**. São Paulo, p. 65, 2003.

ARAÚJO, D.S.; SILVA, H.R.R.; FREITAS, R.M. **Carbamazepina: uma revisão de literatura**. Revista Eletrônica de Farmácia. v. 7. n. 4. p. 30–45. 2010.

ARAUJO, M.B.C. **Estudo de um método multiclasse/multirresíduo para a determinação de pesticidas em amostras aquosas**. 2004. 166 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

ARSAND, D.R. In: **Anti-inflamatório dexametasona: estudos de biodegradabilidade, toxicidade, ocorrência e degradação oxidativa avançada em efluente hospitalar**. 2010. 199 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

AUCHEWSKI, A.; ANDREATINI, R.; GALDURÓZ, J.C.F. *et al.* **Avaliação da orientação médica sobre os efeitos colaterais dos benzodiazepínicos**. Revista Brasileira de Psiquiatria, v. 26, n. 1, p. 24-31, 2004.

AZZAM, R.M.; NOTARIANNI, L.J.; ALI, H.M. **Rapid and simple chromatographic method for the determination of diazepam and its major metabolites in human plasma and urine**. Journal of Chromatography B, v. 708, p. 304–309, 1998.

BALDESSARINI, R.J. **Fármacos e o tratamento dos distúrbios psiquiátricos – depressão e mania**. In: GOODMAN & GILMANN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9. ed., Rio de Janeiro, McGraw Hill, p. 314-331, 1996.

BAPTISTA, I.E.; SOARES, C.H.L.; MATIAS, W.G. *et al.* **Avaliação da toxicidade aguda de efluentes de uma indústria têxtil utilizando *Dafnia magna*, *Poecilia reticulata* e *Vibrio fischeri* como bioindicadores**. In: Espíndola, E.L.G.; Paschoal, C.M.R.B.; Rocha, O.; Bohrer, M.B.C.; Oliveira Neto, A. L. **Ecotoxicologia, Perspectivas para o século XXI**. Rima, São Paulo, São Carlos, p. 365-377, 2000.

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

BLASER, S.A.; SCHERINGER, M.; MACLEOD, M. *et al.* **Estimation of cumulative aquatic exposure and risk due to silver: Contribution of nano-functionalized plastics and textiles**. Science of the Total Environment, v. 390, p. 396–409, 2008.

BORGES, K.B; FREIRE, E.F.; MARTINS, I. *et al.* **Simultaneous determination of multibenzodiazepines by HPLC/UV: Investigation of liquid–liquid and solid-phase extractions in human plasma**. Talanta, v. 78, p. 233–241, 2009.

BOUND, J.P.; VOULVOULIS, N. **Pharmaceuticals in the aquatic environment comparison of risk assessment strategies**. Chemosphere, v. 56, p. 1143-1155, 2004.

BOYD, R.; FURLONG, E. **Human-health pharmaceuticals compounds in Lake Mead, Nevada and Arizona, and Las Vegas Wash, Nevada, October 2000–August 2001**. Open-File Report 02-385, U.S. Geological Survey. Carson City. NV. p. 18, 2002.

BRETON, H.; COCIGLIO M.; BRESSOLLE, F. *et al.* **Liquid chromatography–electrospray mass spectrometry determination of carbamazepine, oxcarbazepine and eight of their metabolites in human plasma**. Journal of Chromatography B, v. 828, p. 80–90, 2005.

BUSETTI, F.; LINGE, K.L.; HEITZ, A. **Analysis of pharmaceuticals in indirect potable reuse systems using solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry**. Journal of Chromatography A, v. 1216, p. 5807–5818, 2009.

CALZA, P.; MEDANA, C.; PADOVANO, E. *et al.* **Identification of the unknown transformation products derived from clarithromycin and carbamazepine using liquid chromatography/high-resolution mass spectrometry**. Rapid Communications in Mass Spectrometry, v. 26, p. 1687–1704, 2012.

CARDOSO, L.V. **Otimização e validação de método empregando SPE e LC-APCI-MS/MS para determinação de fármacos em água de superfície e de abastecimento público**. 90 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, 2011.

CARLSSON, C. *et al.* **Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part I: environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients**. The Science of the total environment, v. 364, n. 1-3, p. 67-87, 2006.

CARPENTER, C.J.; GRIGGS, R.C.; LOSCALZO, J. **Cecil - Medicina Interna Básica**. 5. ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 818-819, 2002.

CARUSO M.; HARVEY M.T.; ROBERTS C.; *et al.* **Differential effects of carbamazepine on negatively versus positively reinforced responding**. Pharmacology, Biochemistry and Behavior, v. 74, p. 221–227, 2002.

CASTIGLIONI, S.; FANELLI, R.; CALAMARI, D. *et al.* **Methodological approaches for studying pharmaceuticals in the environment by comparing predicted and measured concentrations in river po, Italy**. Regulatory Toxicology and Pharmacology, v. 39, p. 25-32, 2004.

CAVEDAL, L.E.; MENDES, F.D.; DOMINGUES, C.C. *et al.* **Clonazepam quantification in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry in a bioequivalence study**. Journal Mass Spectrometry, v. 42, p. 81–88, 2007.

CHÈZE, M.; VILLAIN, M.; PÉPIN, G. **Determination of bromazepam, clonazepam and metabolites after a single intake in urine and hair by LC–MS/MS. Application to forensic cases of drug facilitated crimes**. Forensic Science International, v. 145, p. 123–130, 2004.

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** Quim. Nova, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.

CLARA, M; STRENN, B; KREUZINGER, N. **Carbamazepine as a possible anthropogenic marker in the aquatic environment: investigations on the behaviour of Carbamazepine in wastewater treatment and during groundwater infiltration.** Water Research, v. 38, p. 947–954, 2004.

COELHO, F.M.S; ELIAS, R.M.; POYARES, D. *et al.* **Benzodiazepínicos: uso clínico e perspectivas.** Disponível em: <<http://www.sono.org.br/pdf/2006%20Coelho%20RBM.pdf>>. Acesso em: 25 set. 2009.

CORDIOLI, A.V. **Psicofármacos nos transtornos mentais** <[http://www.ufrgs.br/psiq/Caballo%206\\_8.pdf](http://www.ufrgs.br/psiq/Caballo%206_8.pdf)> acessado em 04/08/2011. Porto Alegre: Artes Médicas. 2. ed. 2000.

CORDEIRO, Q.; SHAVITT, R.G.; CAPPI, C.; *et al.* **Farmacogenômica e psiquiatria.** Revista Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba, v. 11, n. 1, p. 4 – 10, 2009.

COSTA, A.C.O. **Metodologias para determinação de fármacos, seus metabólitos e desreguladores endócrinos em águas brutas voltadas ao abastecimento público utilizando técnicas de separação em meio líquido (CE/UV, CE-MS, LC-MS/MS).** 2009. 298 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

COSTA, C.R.; OLIVI, P.; BOTTA, C.M. R. *et al.* **Toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação.** Química Nova, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

CUNHA, A.C.B. **Desenvolvimento de procedimento analítico para determinação de fármacos e pesticidas em amostra ambientais.** 2005. 111 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

DBSKA, J.; KOT-WASIK, A.; NAMIENIK, J. **Fate and Analysis of Pharmaceutical Residues in the Aquatic Environment.** Critical Reviews in Analytical Chemistry, v. 34, p. 51 – 67, 2004.

DOMENE, X.; RAMÍREZ, W.; MATTANA, S. *et al.* **Ecological risk assessment of organic waste amendments using the species sensitivity distribution from a soil organisms test battery.** Environmental Pollution, v. 155, p. 227–236, 2008.

ESCHER, B.I.; BAUMGARTNER, R.; KOLLER, M. *et al.* **Environmental toxicology and risk assessment of pharmaceuticals from hospital wastewater.** Water Research, v. 45, n. 1, p. 75-92, 2010.

EICKHOFF, P.; HEINECK, I.; SEIXAS, L.J. **Gerenciamento e destinação final de medicamentos: uma discussão sobre o problema.** Revista Brasileira de Farmácia, v. 90, n. 1, p. 64-68, 2009.

EMA – Europe Medicines Agency, 2006. **Committee for medicinal products for human use (CHMP). Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/4447/00.** [www.emea.europa.eu/pdfs/human/swp/444700en.pdf](http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/swp/444700en.pdf). acessado em 04/08/2011.

FAGIOLINO, P; VÁZQUEZ, M.; OLANO, I. *et al.* **Systemic and Presystemic Conversion of Carbamazepine to Carbamazepine-10,11-Epoxy During Long Term Treatment.** J Epilepsy Clin Neurophysiol, v. 12, n. 1, p. 13-16, 2006.

FENT K.; WESTON A.A.; CAMINADA D. **Ecotoxicology of human pharmaceuticals.** Aquatic Toxicology, v. 76, p. 122–159, 2006.

FERRARI B.; PAXEUS N.; GIUDICE R. *et al.* **Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibrac acid, and diclofenac.** Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 55, p. 359–370, 2003.

FERREIRA, D.C. **Benzodiazepinas – contribuição para o estudo de preparações farmacêuticas,** 1992 Tese. (Doutorado em Química). Universidade do Porto, Porto. Portugal, 1992.

FERREIRA, S.L.C.; BRUNS, R.E.; FERREIRA, H.S. *et al.* **Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods.** Analytica Chimica Acta, v. 597, p. 179-186, 2007.

FERRAZ, J.A.M.B. **Efeito do substituinte “-F” na interação “Fármaco-Receptor” em Benzodiazepinas.** 2010 112 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal, 2010.

FRANCK, C.S. **Concepção, construção e avaliação de fotorreatores catalizados na degradação de carga poluente em amoxicilina em efluente hospitalar.** 87 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

FREIRE, E.F.; MIRANDA. J.L., MAIA, P.P. *et al.* **Diazepam e nordiazepam em plasma: métodos de extração líquido-líquido e em fase sólida no pré-tratamento de amostras para análise cromatográfica em fase líquida.** Química Nova, v. 28, n. 5, p. 773-776, 2005.

FREITAS, M.B; COSTA, P.R.; BRITO, J.O. *et al.* **Amitriptilina e Nortriptilina em Plasma: Extração em Fase Sólida por Polímeros de Impressão Molecular e Sílica Octadecila para Análise Cromatográfica em Fase Líquida de Alta Resolução** Latin American Journal of Pharmacy. v. 28, n. 1, p. 70-79, 2009.

GASSER, G.; RONA, M.; VOLOSHENKO, A., *et al.* **Evaluation of micropollutant tracers. II. Carbamazepine tracer for wastewater contamination from a nearby water recharge system and from non-specific sources.** Desalination, v. 273, p. 398–404, 2011.

GAUTAM, A.K.; KUMAR, S.; SABUMON, P.C. **Preliminary study of physico-chemical treatment options for hospital wastewater.** Journal of Environmental Management, v. 83, p. 298–306, 2007.

GEBHARDT, W.; SCHRÖDER, H.F. **Liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry for the follow-up of the elimination of persistent pharmaceuticals during wastewater treatment applying biological wastewater treatment and advanced oxidation.** Journal of Chromatography A, v. 1160, p. 34–43, 2007.

GEHLEN, K.A. *in: Avaliação toxicológica dos benzodiazepínicos diazepam e maleato de midazolam sobre o desenvolvimento pré-natal de ratos Wistar.* 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

GHASEMI, J.; NIAZI, A. **Two and three-way chemometrics methods applied for spectrophotometric determination of lorazepam in pharmaceutical formulations and biological fluids.** Analytica Chimica Acta, v. 533, p. 169–177, 2005.

GOMÉZ, M.J.; PETROVIC, M.; FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. *et al.* **Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters.** Journal of Chromatography A, v. 1114, p. 224–233, 2006.

GÓMEZ, M.J.; MARTÍNEZ, B.; LACORTE, S. *et al.* **Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast.** Chemosphere, v. 66, p. 993–1002, 2007.

GOODMAN, L.S.; GILMAN, A.G., **Goodman & Gilman - As bases farmacológicas da terapêutica.** In: McNamara, J.O. **Farmacoterapia da epilepsias.** 11.ed., Rio de Janeiro, p. 456-460, 2010.

GRUJIĆ, S.; VASILJEVI, T.; LAUŠEVIĆ, M. **Determination of multiple pharmaceutical classes in surface and ground waters by liquid chromatography–ion trap–tandem mass spectrometry.** Journal of Chromatography A, v. 1216, p. 4989–5000, 2009.

GRUNG, M.; KÄLLQVIST, T.; SAKSHAUG, S. *et al.* **Environmental assessment of Norwegian priority pharmaceuticals based on the EMEA guideline.** Ecotoxicology Environmental Safety, v. 71, n. 2, p. 328-340, 2008.

HALLING-SØRENSEN, B.; NIELSEN, S.N.; LANZKY, P.F. *et al.* **Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment - a review.** Chemosphere, v. 36, n. 2, p. 357-393, 1998.

HARRIS, D.C. **Análise Química Quantitativa.** 6. ed., Editora LTC, 2003.

HEIZMANN, P.; GESCHKE, R.; ZINAPOLD, K. **Determination of bromazepam in plasma and of its main metabolites in urine by reversed-phase high-**

**performance liquid chromatography.** Journal of Chromatography, v. 310, p. 129-137, 1984.

HENNION, M.C., **Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography.** Journal of Chromatography A, v. 856, p. 3-54, 1999.

HERBERER, T. **Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data.** Toxicology Letters, v. 131, p. 5-17, 2002.

HERNANDO, M.D.; MEZCUA, M.; FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. *et al.* **Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments.** Talanta, v. 69, n. 2, p. 334-342, 2006.

HUERTA-FONTELA, M.; GALCERAN, M.T.; VENTURA, F. **Fast liquid chromatography–quadrupole-linear ion trap mass spectrometry for the analysis of pharmaceuticals and hormones in water resources.** Journal of Chromatography A, v. 1217, p. 4212–4222, 2010.

HUMMEL, D.; LÖFFLER, D.; FINK, G. *et al.* **Simultaneous determination of psychoactive drugs and their metabolites in aqueous matrices by liquid chromatography mass spectrometry.** Environmental Science Technology, v. 40, p. 7321-7328, 2006.

ICH, 2005. International Conference on Harmonization. ICH Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures — Text and Methodology, Geneva, Switzerland, 2005. *Text*, 2.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e qualidade Industrial. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos.** DOQ-CGCRE-008. Revisão 04 - 06/2011.

IRVING, R.C.; DICKSON, S.J. **The detection of sedatives in hair and nail samples using tandem LC–MS–MS.** Forensic Science International, v. 166, p. 58 – 67. 2007.

ISHIDA, T.; KUDO, K.; HAYASHIDA, M. *et al.* **Rapid and quantitative screening method for 43 benzodiazepines and their metabolites, zolpidem and zopiclone in human plasma by liquid chromatography/mass spectrometry with a small particle column.** Journal of Chromatography B, v. 877, p. 2652-2657, 2009.

JAGER, A.D.; BAILEY, N.L. **Online extraction LC–MS/MS method for the simultaneous quantitative confirmation of urine drugs of abuse and metabolites: Amphetamines, opiates, cocaine, cannabis, benzodiazepines and methadone.** Journal of Chromatography B, v. 879, p. 2642– 2652, 2011.

JENSEN, J.; SMITH, S. R.; KROGH, P. H. *et al.* **European risk assessment of LAS in agricultural soil revisited: Species sensitivity distribution and risk estimates.** Chemosphere, v. 69, p. 880–892, 2007.



JINNO, K.; TANIGUCHI, M; HAYASHIDA, M. **Solid phase micro extraction coupled with semi-microcolumn high performance liquid chromatography for the analysis of benzodiazepines in human urine.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 17, p. 1081–1091, 1998.

JONES, O.; VOULVOULIS, N.; LESTER, J. **Potential Ecological and Human Health Risks Associated with the Presence of Pharmaceutically Active Compounds in the Aquatic Environment.** Critical Reviews in Toxicology, v. 34, p. 335–350, 2004.

KAPLAN, S.A.; JACK, M.L. In: E. Costa, Ed **The Benzodiazepines - From molecular biology- to Clinical Practice.** Raven, New York, p. 173-199, 1983.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia básica e clínica.** 6 ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 255-267, 1998.

KASPRZYK-HORDERN, B.; DINSDALE, R.M.; GUWY, A.J. **Multi-residue method for the determination of basic/neutral pharmaceuticals and illicit drugs in surface water by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography–positive electrospray ionisation tandem mass spectrometry.** Journal of Chromatography A, v. 1161, p. 132–145, 2007.

KLIEMANN, A.D.F.; MONTE, T.L. **Antiepilépticos.** In: **Farmacologia – Fundamentos da Terapêutica Racional.** 3 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 535-552, 2004.

KIM, J.; LEE, S.; IN, S. *et al.* **Validation of a simultaneous analytical method for the detection of 27 benzodiazepines and metabolites and zolpidem in hair using LC–MS/MS and its application to human and rat hair.** Journal of Chromatography B, v. 879, p. 878–886, 2011.

KINTZ, P.; VILLAIN, M.; CONCHEIRO, M. *et al.* **Screening and confirmatory method for benzodiazepines and hypnotics in oral fluid by LC-MS/MS.** Forensic Science International, v. 150, p. 213–220, 2005.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. **Química Farmacêutica.** Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, S. A., 783 P. 1988.

KOT-WASIK, A.; DEBSKA; J.; NAMIEŚNIK, J. **Analytical techniques in studies of the environmental fate of pharmaceuticals and personal-care products.** Trends in Analytical Chemistry, v. 26, n. 6, p. 557-568, 2007.

KUBOVA H.; MARES P. **Anticonvulsant action of oxcarbazepine, hydroxycarbamazepine, and carbamazepine against metrazol-induced motor seizures in developing rats.** Epilepsia, v. 34, p. 188–92, 1993.

KUMAR, A.; KUMAR, S.; SABUMON, P.C. **Preliminary study of physico-chemical treatment options for hospital wastewater.** Journal of Environmental Management, v. 83, p. 298-306, 2007.

LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos, 46p, 2004.

LARINI, L. **Compostos ansiolíticos**. In: LARINI, L. **Toxicologia**. 3 ed. São Paulo: Manole, p. 255-265, 1997.

LAURITO, T.L.; MENDES, G.D.; SANTAGADA, V. *et al.* **Bromazepam determination in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry: a highly sensitive and specific tool for bioequivalence studies**. *Journal of Mass Spectrometry*, v. 39, p. 168–176, 2004.

LEITE, F. **Validação em Análise Química**. 4. ed., Campinas: Átomo, 278 p. 2002.

LIMA, A.P.S. *in*: **Desenvolvimento de métodos eletroforéticos e cromatográficos para a determinação de benzodiazepínicos como adulterantes em formulações fitoterápicas para emagrecimento**. 119 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

LIMA, D.R.A. **Manual de farmacologia clínica terapêutica e toxicologia**. Editora Guanabara Koogan, p. 962, 2009.

Mac LEOD, T.C.O. **Metaloporfirinas e compostos salen como modelos biomiméticos do citocromo P450 no metabolismo de fármacos anticonvulsivante e antidepressivo**. 2008. 261 f. Tese (Doutorado em Ciências – Área: Química) – Universidade de São Paulo – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2008.

MAGGS, J.L.; PIRMOHAMED, M.; KITTERINGHAM, N.R. *et al.* **Characterization of the metabolites of carbamazepine in patient urine by liquid chromatography/mass spectrometry drug metabolism and disposition**. v. 25, n 3, 1996.

MARCHETTI, R.L.; CASTRO, A.P.W.; KURCGANT, D. *et al.* **Transtornos mentais associados à epilepsia**. *Revista de Psiquiatria Clínica*, v. 32, n. 3, p. 170-182, 2005.

MARCHI, I; SCHAPPLER, J; VEUTHEY, J. *et al.* **Development and validation of a liquid chromatography–atmospheric pressure photoionization–mass spectrometry method for the quantification of alprazolam, flunitrazepam, and their main metabolites in haemolysed blood**. *Journal of Chromatography B*, v. 877, p. 2275–2283, 2009.

MARQUES, A.C.F. **O medicamento veterinário em Portugal: do registro à comercialização**. 2008. 111 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, Portugal, 2008.

MARTINS, A.F.; MAYER, F.; CONFORTIN, E.C. *et al.* **A Study of Photocatalytic Processes Involving the Degradation of the Organic Load and Amoxicillin in Hospital Wastewater**. *CLEAN - Soil, Air, Water*, v. 37, n. 4-5, p. 365-371, 2009.

MARTINS, A.F.; ARSAND, D.R.; BRENNER, C.B; et al. **COD Evaluation of Hospital Effluent by Means of UV-Spectral Deconvolution**. CLEAN - Soil, Air, Water, v. 36, n. 10-11, p. 875-878, 2008.

MARTINS, M.L. **Determinação de resíduos de compostos orgânicos em água por microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) e GC-(TQ)MS/MS**. 2010. 161 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS. 2010.

MARTINS, A.F.; MALLMANN, C.A.; ARSAND, D.R. et al. **Occurrence of the Antimicrobials Sulfamethoxazole and Trimethoprim in Hospital Effluent and Study of Their Degradation Products after Electrocoagulation**. CLEAN - Soil, Air, Water, v. 39, n. 1, p.21-27, 2011.

MASSOCO, C.; PALERMO-NETO, J. **Diazepam effects on peritoneal macrophage activity and corticosterone serum levels in Balb/c mice**. Life Science, v. 65, p. 2157-2165, 1999.

MEDINA, W.S.G. **Efeito dos anticonvulsivantes aromáticos (carbamazepina, fenitoína e fenobarbital) e de seus areno-óxidos na função e no estresse oxidativo mitocondrial em fígado de rato**. 2008. 145 f. Tese (Doutorado em Toxicologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP, 2008.

MERCOLINI, L.; MANDRIOLI, R.; IANNELLO, C. *et al.* **Simultaneous analysis of diazepam and its metabolites in rat plasma and brain tissue by HPLC-UV and SPE**. Talanta, v. 80, p. 279-285, 2009.

MIAO, X.; METCALFE, C.D. **Determination of Carbamazepine and Its Metabolites in Aqueous Samples Using Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry**. Analytical Chemistry, v. 75, p. 3731-3738, 2003.

MINETTO, L.; MAYER, F.M.; MALLMANN, C.A. et al. **Quantification of Diclofenac in Hospital Effluent and Identification of Metabolites and Degradation Products**. CLEAN - Soil, Air, Water, v. 39, n. 1, p.21-27, 2012, DOI: 10.1002/clen.201100676.

MORAES, M.C.B.; LAGO, C.L. **Espectrometria de massas com ionização por “electrospray” aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas**. Quimica Nova, v. 26, n. 4, p. 556-563, 2003.

MOREIRA, R.P.L. **Desenvolvimento e validação de métodos multirresíduos para determinação de medicamentos veterinários em alimentos e em ração utilizando CL-EM/EM**. Tese (Doutorado em Ciências-Química) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2012.

MORENO, R.A.M.; MORENO, D.H.; SOARES, M.B.M. et al. **Anticonvulsants and antipsychotics in the treatment of Bipolar Disorder**. Revista Brasileira Psiquiatria, v. 26, p. 37-43, 2004.

MOSTARDEIRO, C.P. **Quantificação de Carbamazepina e carbamazepina-10,11-epóxido em plasma utilizando cromatografia líquida e alta eficiência**. 2001. 106

f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2001.

MUELLER, C.A.; WEINMANN, W.; DRESEN, S. et al. **Development of a multi-target screening analysis for 301 drugs using a QTrap liquid chromatography/tandem mass spectrometry system and automated library searching.** Rapid Communications in Mass Spectrometry, v. 19, p. 1332–1338, 2005.

MUCHOHI, S.N.; OBIERO, K.; KOKWARO, G.O. et al. **Determination of lorazepam in plasma from children by high-performance liquid chromatography with UV detection.** Journal of Chromatography B, v. 824, p. 333–340, 2005

MUSAVI, S. & KAKKAR, P. **Diazepam induced early oxidative changes at the subcellular level in rat brain.** Molecular and Cellular Biochemistry, v. 178, p. 41–46, 1998.

NETO, J.C.; MARCHETTI, R.L. **Aspectos epidemiológicos e relevância dos transtornos mentais associados à epilepsia.** Revista Brasileira de Psiquiatria, v. 27, n. 4, p. 323-328, 2005.

NIESSEN, W.M.A. **Fragmentation of toxicologically relevant drugs in positive-ion liquid chromatography–tandem mass spectrometry.** Mass Spectrometry Reviews, v. 30, p. 626–663, 2011.

NUNES, B. S.; FELIX, D.; CARVALHO, C. et al. **Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing.** Environmental Pollution, v. 144, p. 453-462, 2006.

OGA, Seizi. **Fundamentos da Toxicologia.** 2ª. ed., São Paulo: Atheneu Editora. 2003.

OLIVEIRA, A.C.P. **Desenvolvimento e validação de uma metodologia bioanalítica para quantificação de zolpidem em plasma humano utilizando a técnica de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LCMS/MS).** Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde. Área de Concentração: Farmacologia Clínica e Geral) Universidade São Francisco. Bragança Paulista, 77 p, 2010.

PALMER, P.M.; WILSON, L.R.; O'KEEFE, P. et al. **Sources of pharmaceutical pollution in the New York City Watershed.** Science of The Total Environment, v. 394, p. 90–102, 2008.

PAPINI, O.; BERTUCCI, C.; CUNHA, S.P. et al. **Quantitative assay of lorazepam and its metabolite glucuronide by reverse-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry in human plasma and urine samples.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 40, p. 389–396, 2006.

PASCHOAL, J.A.R.; RATH, S. **Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos.** Química Nova, v. 31, n. 5, p. 1190-1198, 2008.

PEDROSO, R.C.R. **Desenvolvimento de métodos por CLAE-UV para os antimicrobianos tetraciclina, sulfametoxazol e trimetoprima utilizando materiais à base de sílica e poliméricos como sistemas de pré concentração.** 2007. 122 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

PERALTA-ZAMORA, P.; MORAIS, J.L.; NAGATA, N. **Por que otimização multivariada?** Eng. sanit. ambient., v. 10, p. 106-110, 2004.

PIENIMÄKI, P.; FUCHS S.; ISOJÄRVI, J *et al.* **Improved detection and determination of carbamazepine and oxycarbazepine and their metabolites by high-performance liquid chromatography.** Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, v. 673, n. 1, p. 97-105, 1995.

PRESTES, O.D.; FRIGGI, C.A.; ADAIME, M.B. *et al.* **QuEChERS – Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas.** Química Nova, v. 32, n. 6, p. 1620-1634, 2009.

PUNYAPALAKUL, P.; SITTHISORN, T. **Removal of ciprofloxacin and carbamazepine by adsorption on functionalized mesoporous silicates** World Academy of Science, Engineering and Technology, v. 69, p. 546-550, 2010.

QUEIROZ, C.N; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.F. **Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica.** Química Nova, v. 24, n. 1, 2001.

QUEIROZ, R.H.C.; BERTUCCI, C.; MALFARÁ, W.R. *et al.* **Quantification of carbamazepine, carbamazepine-10,11-epoxide, phenytoin and phenobarbital in plasma samples by stir bar-sorptive extraction and liquid chromatography.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 48, p. 428–434, 2008.

QUINN, B.; GAGNÉ, F.; BLAISE, C. **An investigation into the acute and chronic toxicity of eleven pharmaceuticals (and their solvents) found in wastewater effluent on the cnidarian, *Hydra attenuate*.** Science of the total environment, v. 389, p. 306 – 314, 2008.

RADJENOVIĆ, J.; PETROVIĆ, M.; BARCELÓ, D. *et al.* **Advances mass spectrometric methods applied to the study of fate and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment.** Trends in Analytical Chemistry, v. 26, n. 11, p. 1132-1144, 2007.

RAMASWAMY, B.R.; SHANMUGAM, G.; VELU, G. *et al.* **GC–MS analysis and ecotoxicological risk assessment of triclosan, carbamazepine and parabens in Indian rivers.** Journal of Hazardous Materials, v. 186, n. 2-3, p. 1586-93, 2011.

RISOLI, A.; CHENG, J.B.Y.; VERKERK, U.H. *et al.* **Gas-phase fragmentation of protonated benzodiazepines.** Rapid Communications in Mass Spectrometry, v. 21, p. 2273–2281, 2007.

RODRIGUES, S.A.; CALDAS, S.S.; FURLONG, E.B. *et al.* **Otimização e validação de método empregando QuEChERS modificado e LC-ESI-MS/MS para determinação de agrotóxicos em cebola.** *Química Nova*, v. 34, p. 780-786, 2011.

RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; LOPEZ DE ALDA, M. J.; BARCELÓ, D. **Advantages limitations of on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography–mass spectrometry technologies versus biosensors for monitoring of emerging contaminants water.** *Journal of Chromatography A*, v. 1152, n. 2, p. 97-115, 2007.

ROOYEN, G.F.; BADENHORST, D.; SWART, K.J.; *et al.* **Determination of carbamazepine and carbamazepine 10,11-epoxide in human plasma by tandem liquid chromatography–mass spectrometry with electrospray ionization.** *Journal of Chromatography B*, v. 769, p.1–7, 2002.

ROUINI, M.; ARDAKANI, Y.H.; MOGHADDAM, K.A. *et al.* **An improved HPLC method for rapid quantitation of diazepam and its major metabolites in human plasma.** *Talanta*, v. 75, p. 671–676, 2008.

ROQUE, A.L.R.R. **Remoção de compostos farmacêuticos persistentes das águas efeitos no ambiente e na saúde humana.** 2009. 123 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia do Ambiente) – Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal, 2009.

RUST, K.Y.; BAUMGARTNER, M.R.; MEGGIOLARO, N. *et al.* **Detection and validated quantification of 21 benzodiazepines and 3 “z-drugs” in human hair by LC–MS/MS.** *Forensic Science International*, v. 215, p. 64–72, 2012.

SANTOS, J.L.; APARICIO, I., ALONSO, E. **Occurrence and risk assessment of pharmaceutically active compounds in wastewater treatment plants. A case study: Seville city (SPAIN).** *Environmental International*, v. 33, p. 596-601, 2007.

SANTOS, L.H.M.L.M.; ARAÚJO, A.N.; FACHINI, A. *et al.* **Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment.** *Journal of Hazardous Materials*, v. 175, p. 45–95, 2010.

SHUCARA, E.A. **Desenvolvimento de metodologias analíticas para determinação de fármacos em fluídos biológicos e amostras ambientais por cromatografia líquida e gasosa.** 125 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

SILVA, P. **Farmacologia.** 7ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 2006.

SILVADO, C. **Farmacogenética e Antiepilépticos (Farmacologia das drogas antiepilépticas: da teoria à prática).** *Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology*, v. 14, n. 2, p. 51-56, 2008.

SMINK, B.E.; BRANDSMA, J.E.; DIJKHUIZEN, A. *et al.* **Quantitative analysis of 33 benzodiazepines, metabolites and benzodiazepine-like substances in whole**

**blood by liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry.** *Journal of Chromatography B*, v. 811, p. 13–20, 2004.

SMYTH, T.J.P.; ROBLEDO, V.R.; SMYTH, W.F. **Characterisation of oxazepam degradation products by high-performance liquid chromatography/electrospray ionisation mass spectrometry and electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry.** *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 24, p. 651–658, 2010.

SMYTH, W.F.; MCCLEAN, S.; RAMACHANDRAN V.N. **A study of the electrospray ionisation of pharmacologically significant 1,4- benzodiazepines and their subsequent fragmentation using an ion-trap mass spectrometer.** *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 14, p. 2061–2069, 2000.

SOLLEU, H.L.; DEMOSTES-MAYNARD, F.; VINÇON, G. *et al.* **The determination of bromazepam in plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography.** *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, v. 11, n. 8, p. 771-775, 1993.

STEENTOFT, A.; LINNET K. **Blood concentrations of clonazepam and 7-aminoclonazepam in forensic cases in Denmark for the period 2002–2007.** *Forensic Science International*, v. 184, p. 74–79, 2009.

SUAREZ, S.; LEMA, J.M.; OMIL, F. **Pre-treatment of hospital wastewater by coagulation–flocculation and flotation.** *Bioresource Technology*, v. 100, p. 2138–2146, 2009.

TANAKA, E.; TERADA, M.; MISAWA, S. *et al.* **Simultaneous determination of twelve benzodiazepines in human serum using a new reversed-phase chromatographic column on a 2- $\mu$ m porous microspherical silica gel.** *Journal of Chromatography B*, v. 682, p. 173-178, 1996.

TERNES, T.A. **Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples.** *Trends in Analytical Chemistry*, v. 20, n. 8, p. 419-434, 2001.

TERNES, T.A. **Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers.** *Water Research*, v. 32, p. 3245-3260, 1998.

TIXIER C.; HEINZ P.; SINGER S. *et al.* **Occurrence and Fate of Carbamazepine, Clofibric Acid, Diclofenac, Ibuprofen, Ketoprofen, and Naproxen in Surface Waters.** *Environmental Science & Technology*, v. 37, n. 6, p. 1061-1068, 2003.

UNCETA, N.; SAMPEDROM, C.; BAKAR, N.K.A.; *et al.* **Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in wastewaters by dual solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography electrospray ionization ion trap mass spectrometry.** *Journal of Chromatography A*, v. 1217, p. 3392–3399, 2010.

VERENITCH, S. S.; LOWE, C. J.; MAZUMDER, A. **Determination of acidic drugs and caffeine in municipal wastewaters and receiving waters by gas chromatography–ion trap tandem mass spectrometry.** Journal of Chromatography A, v. 1116, p. 193–203, 2006.

VIENO, N.M.; TUHKANEN, T.; KRONBERG, L. **Analysis of neutral and basic pharmaceuticals in sewage treatment plants and in recipient rivers using solid phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry detection.** Journal of Chromatography A, v. 1134, p. 101–111, 2006.

VILLAIN, M.; CONCHEIRO, M.; CIRIMELE, V.; *et al.* **Screening method for benzodiazepines and hypnotics in hair at pg/mg level by liquid chromatography–mass spectrometry/mass spectrometry.** Journal of Chromatography B, v. 825, p. 72–78, 2005.

WILDE, M.L. **βeta-bloqueadores em efluente hospitalar: ocorrência, degradação por processos avançados de oxidação e identificação de subprodutos** 281 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

WU, C.; SPONGBERG, A.L.; WITTER, J.D. **Use of solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry for simultaneous determination of various pharmaceuticals in surface water.** International Journal of Environmental Analytical Chemistry, v. 88, n. 14, p. 1033–1048, 2008.

XIANG, P.; SUN Q.; SHEN, B.; *et al.* **Segmental hair analysis using liquid chromatography–tandem mass spectrometry after a single dose of benzodiazepines.** Forensic Science International, v. 204, p. 19–26, 2011.

ZAGATTO, P.A. **Ecotoxicologia.** In: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E.. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações.** São Carlos, Ed. Rima, p. 1-13, 2006.

ZHANG, Z.L.; ZHOU, J.L. **Simultaneous determination of various pharmaceutical compounds in water by solid-phase extraction–liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** Journal of Chromatography A, v. 1154, p. 205-213, 2007.

ZHU, Y; CHIANG, H.; WULSTER-RADCLIFFE, M.; *et al.* **Liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the determination of carbamazepine and its main metabolite in rat plasma utilizing an automated blood sampling system.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 38, p. 119–125, 2005.



Apêndice 1 – Superfície de resposta obtida através de análise de carbamazepina por HPLC-UV

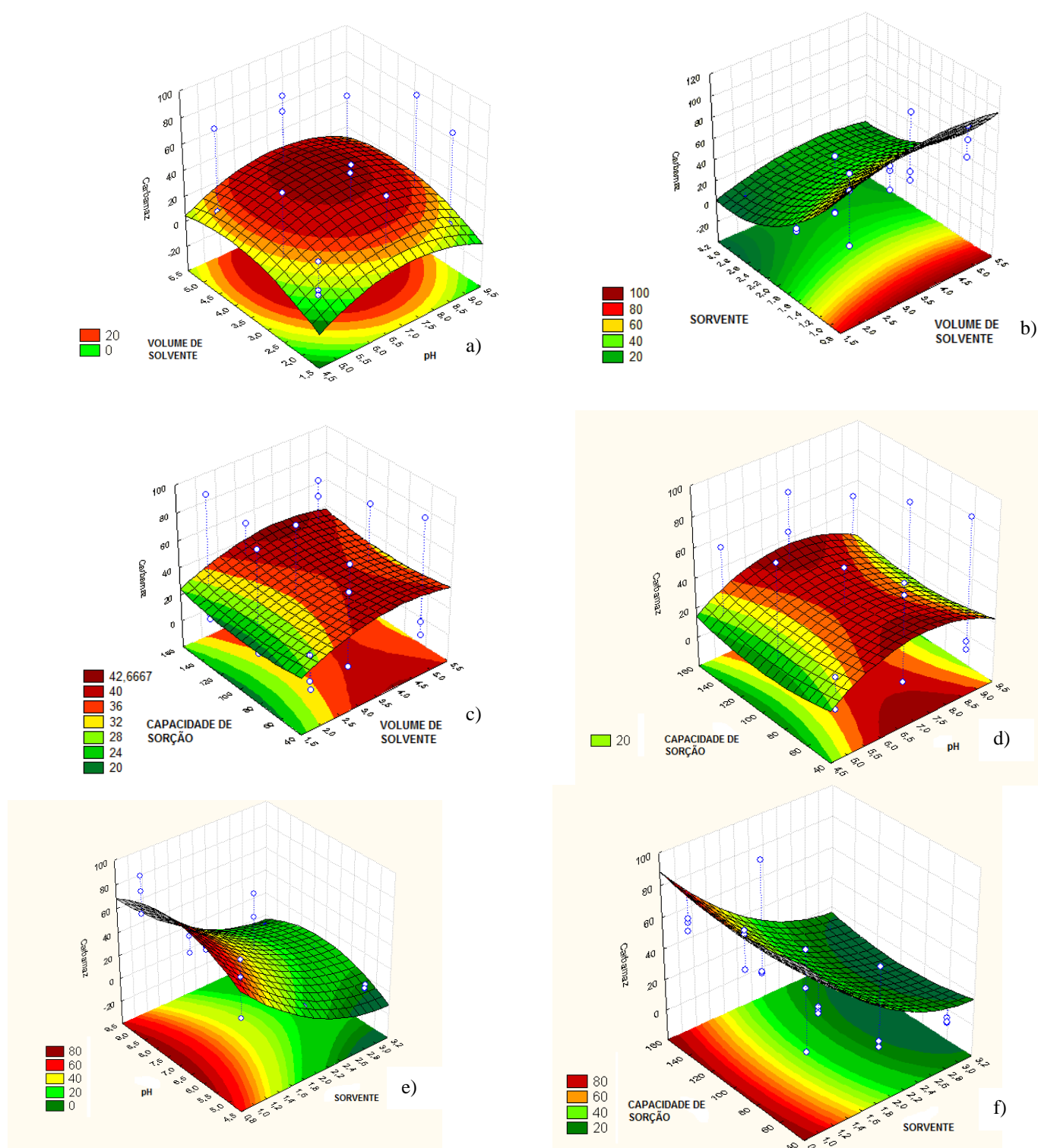


Figura 51 - Superfície de resposta obtida através de análise de carbamazepina por HPLC-UV a) volume de solvente e pH; b) sorvente e volume de solvente; c) capacidade de sorção e volume de solvente, d) capacidade de sorção e pH; e) sorvente e pH e f) capacidade de sorção e sorvente.

## Apêndice 2 – Superfície de resposta obtida através de análise de clonazepam por HPLC-UV

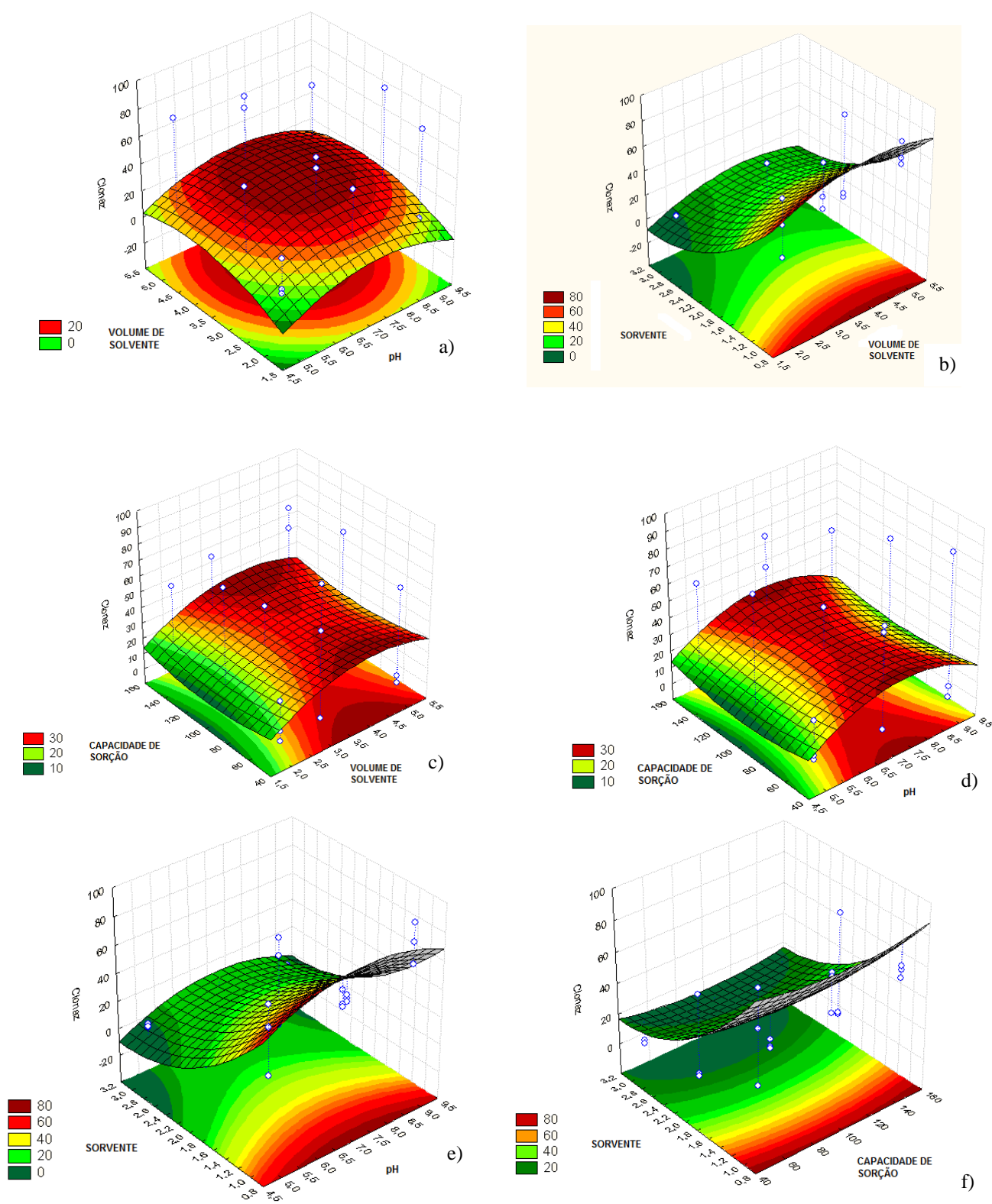


Figura 52 - Superfície de resposta obtida através de análise de clonazepam por HPLC-UV a) volume de solvente e pH; b) sorvente e volume de solvente; c) capacidade de sorção e volume de solvente, d) capacidade de sorção e pH; e) sorvente e pH e f) capacidade de sorção e sorvente.

Apêndice 3 – Superfície de resposta obtida através de análise de lorazepam por HPLC-UV

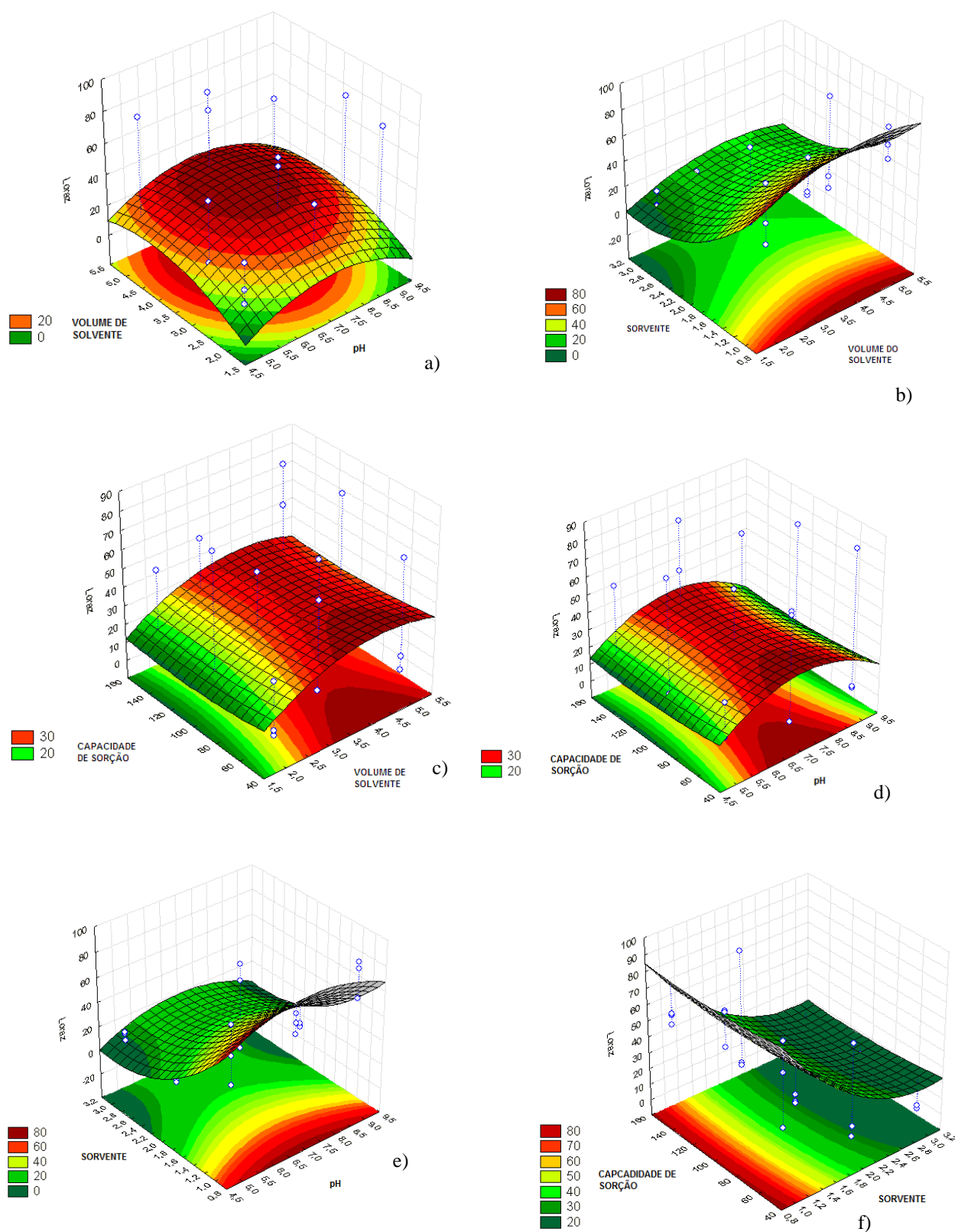


Figura 53 - Superfície de resposta obtida através de análise de lorazepam por HPLC-UV a) volume de solvente e pH; b) sorvente e volume de solvente; c) capacidade de sorção e volume de solvente, d) capacidade de sorção e pH; e) sorvente e pH e f) capacidade de sorção e sorvente.

Apêndice 4 – Superfície de resposta obtida através de análise de diazepam por HPLC-UV

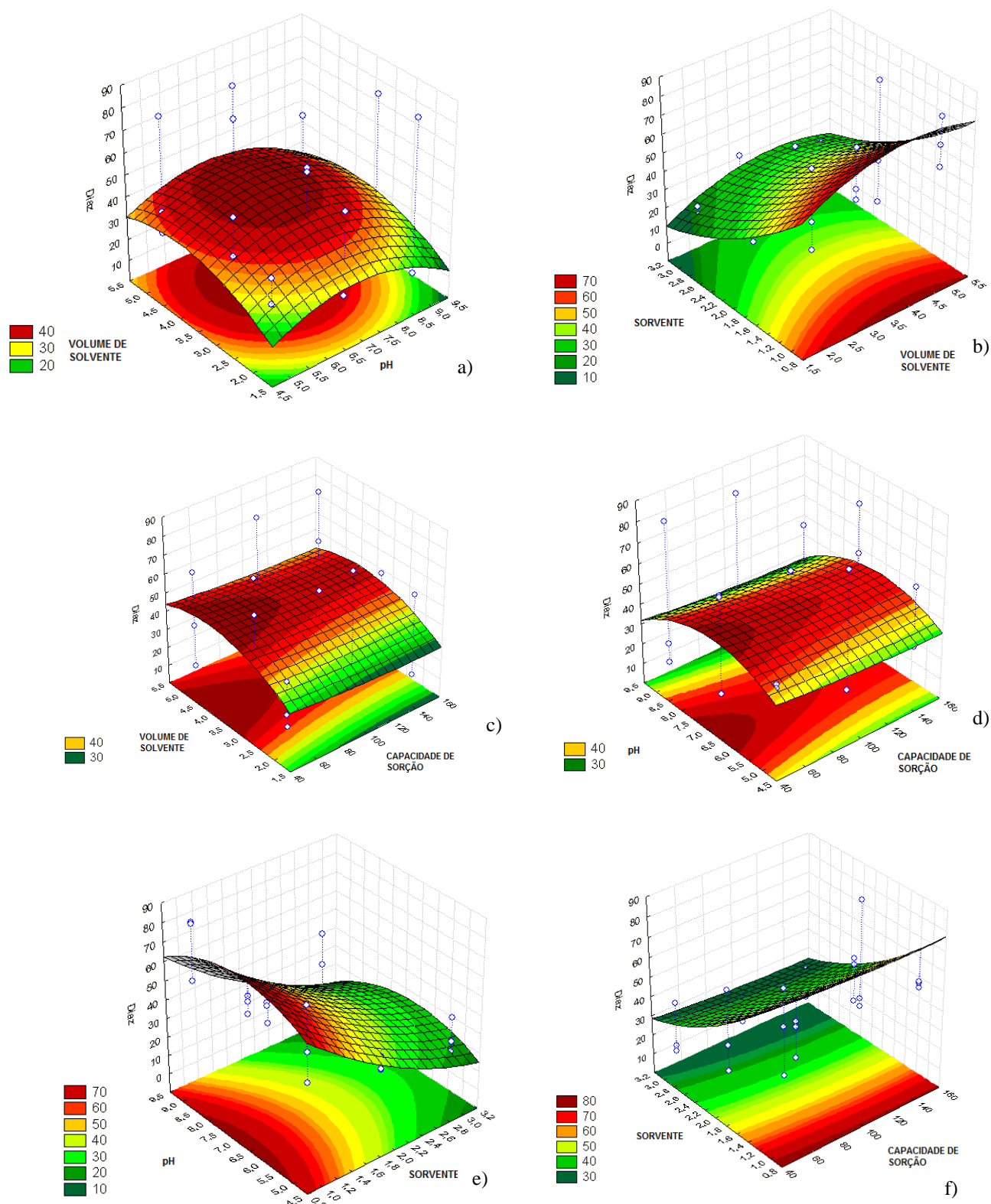


Figura 54 - Superfície de resposta obtida através de análise de diazepam por HPLC-UV a) volume de solvente e pH; b) sorvente e volume de solvente; c) capacidade de sorção e volume de solvente, d) capacidade de sorção e pH; e) sorvente e pH e f) capacidade de sorção e sorvente.

Apêndice 5 – Perfil da seletividade - curvas analíticas preparadas com *spike* na matriz (efluente) e sem matriz (em metanol), utilizando HPLC-UV.

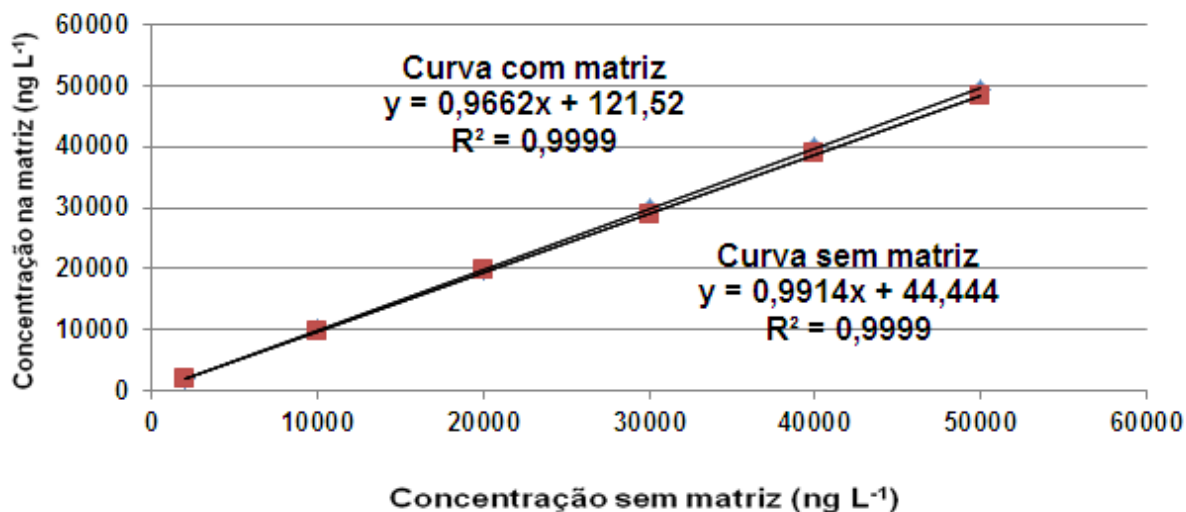


Figura 55 – Perfil da seletividade: curva analítica de bromazepam preparadas com *spike* na matriz (efluente) e sem matriz (em metanol), utilizando HPLC-UV.

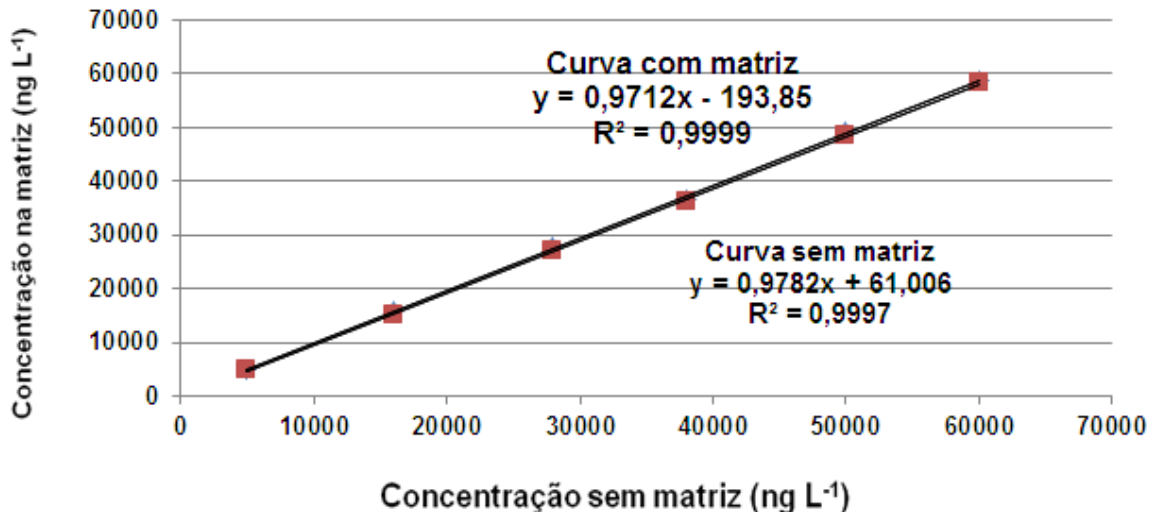


Figura 56 – Perfil da seletividade: curva analítica de carbamazepina preparadas com *spike* na matriz (efluente) e sem matriz (em metanol), utilizando HPLC-UV.

Apêndice 6 - Perfil da seletividade: curvas analíticas preparadas com *spike* na matriz (efluente) e sem matriz (em metanol), utilizando HPLC-UV.

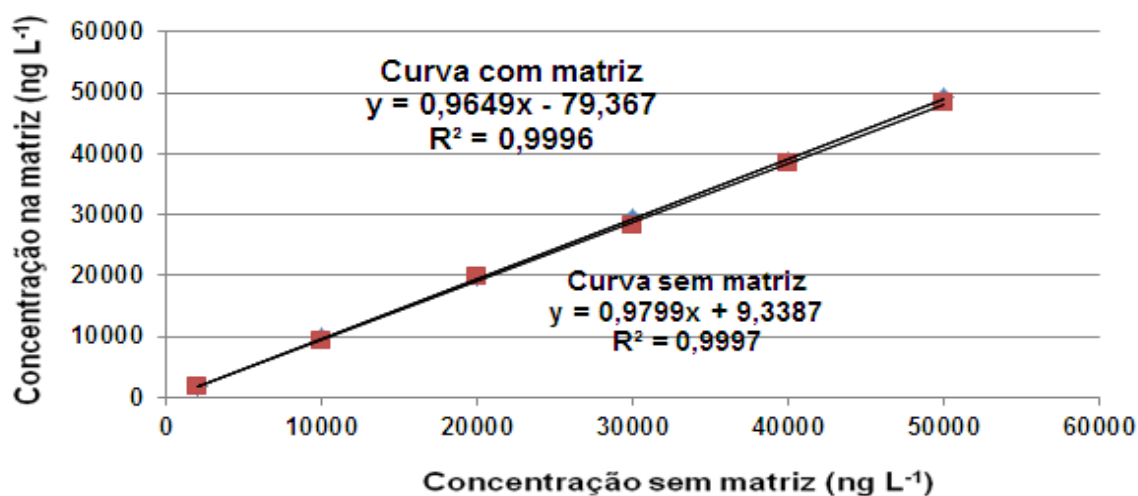


Figura 57 – Perfil da seletividade: curva analítica de clonazepam preparada com *spike* na matriz (efluente) e sem matriz (em metanol), utilizando HPLC-UV.

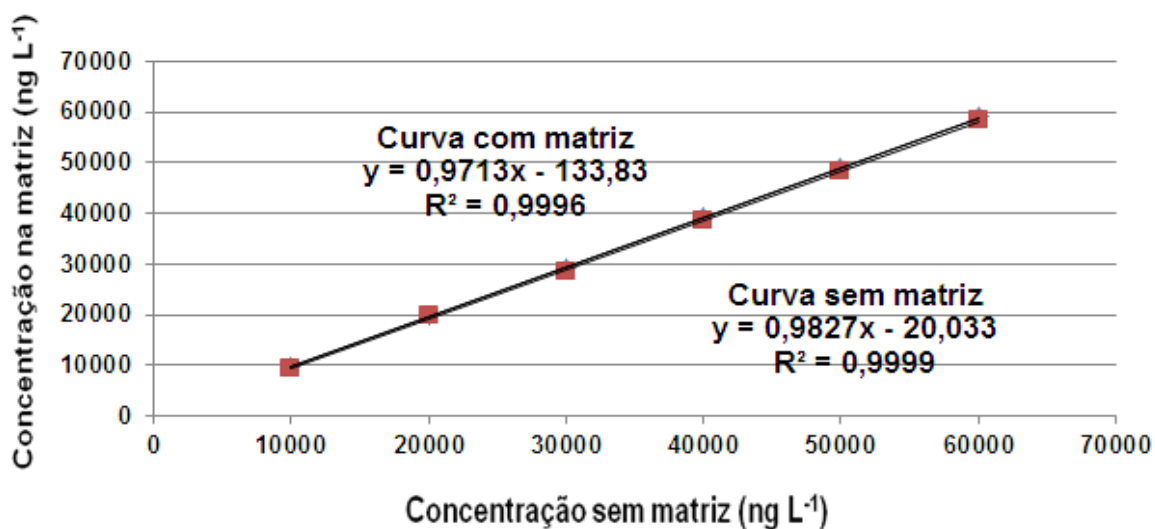


Figura 58 – Perfil da seletividade: curva analítica de diazepam preparadas com *spike* na matriz (efluente) e sem matriz (em metanol), utilizando HPLC-UV.

Apêndice 7 - Perfil da seletividade: curvas analíticas preparadas com *spike* na matriz (efluente) e sem matriz (em metanol)

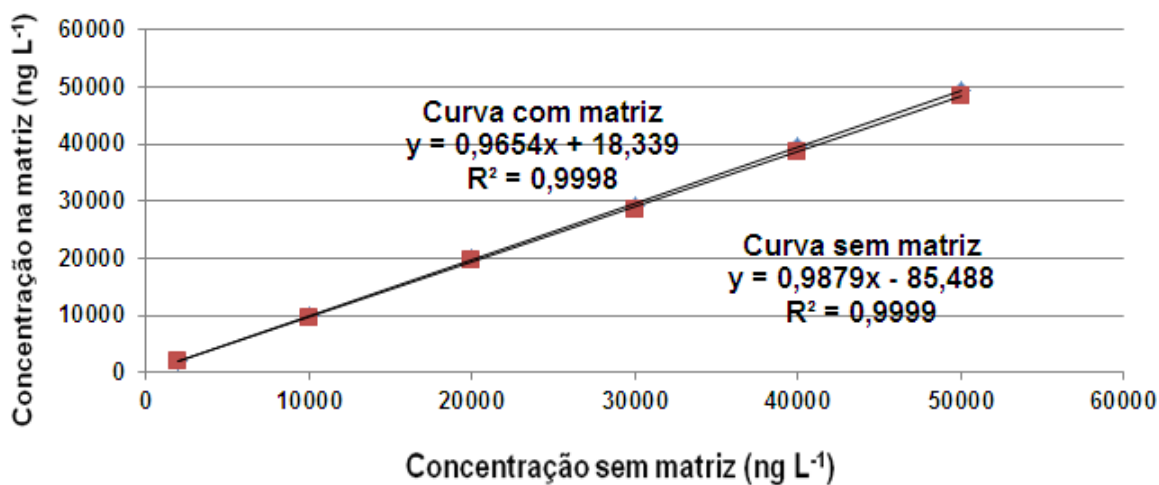


Figura 59 – Perfil da seletividade: curva analítica de lorazepam preparadas com *spike* na matriz (efluente) e sem matriz (em metanol), utilizando HPLC-UV.

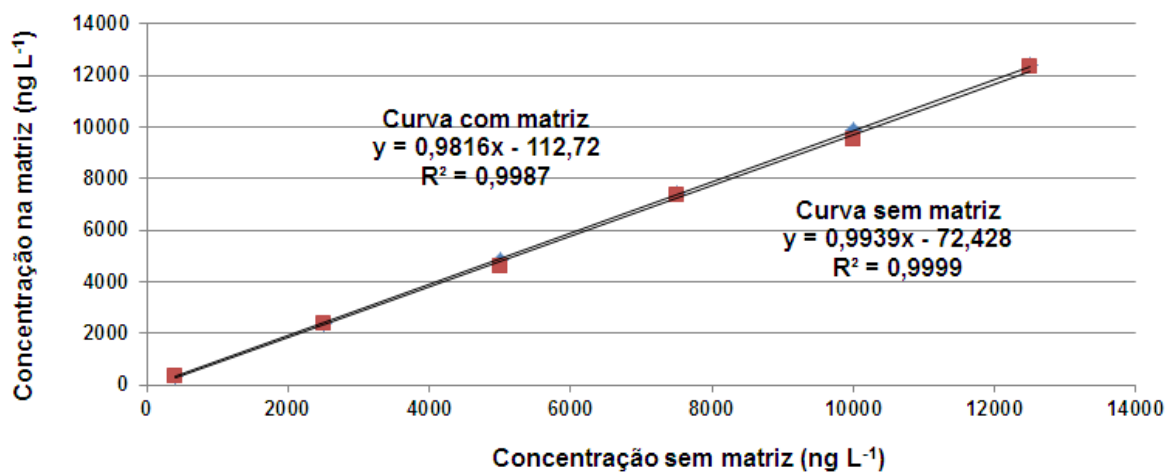


Figura 60 – Perfil da seletividade: curva analítica de bromazepam preparadas com *spike* na matriz (efluente) e sem matriz (em metanol), utilizando LC-MS.

Apêndice 8 - Perfil da seletividade: curvas analíticas preparadas com *spike* na matriz (efluente) e sem matriz (em metanol)

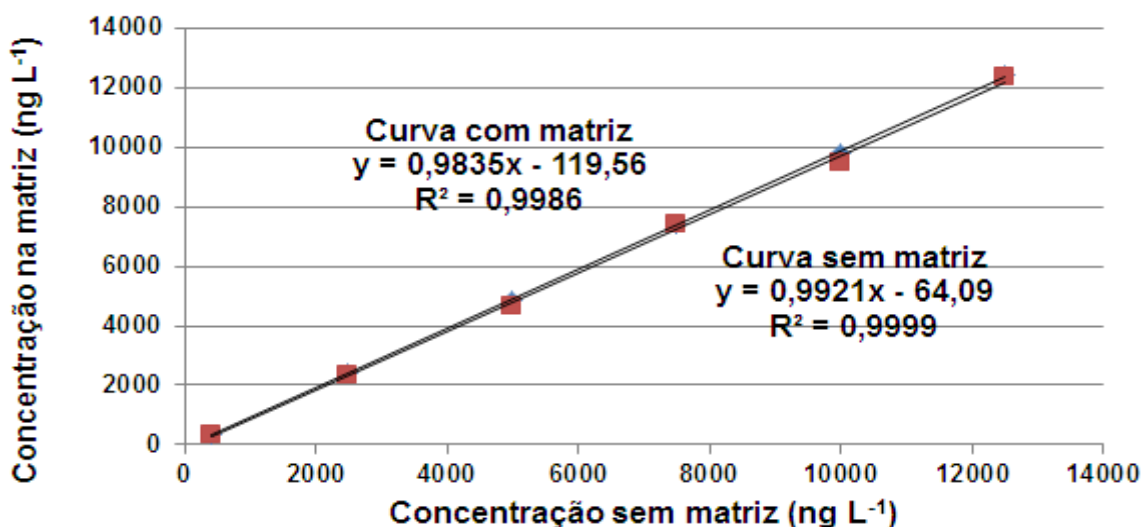


Figura 61 – Perfil da seletividade: curva analítica de carbamazepina preparadas com *spike* na matriz (efluente) e sem matriz (em metanol), utilizando LC-MS.

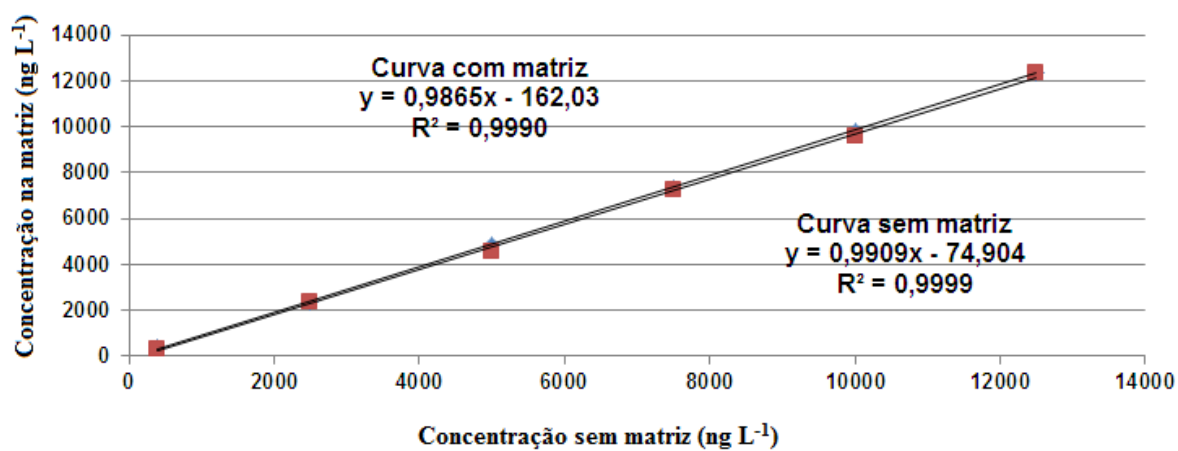


Figura 62 – Perfil da seletividade: curva analítica de clonazepam preparados com *Spike* na matriz (efluente) e sem matriz (em metanol), utilizando LC-MS.



Apêndice 9 - Perfil da seletividade: curvas analíticas preparadas com *spike* na matriz (efluente) e sem matriz (em metanol)

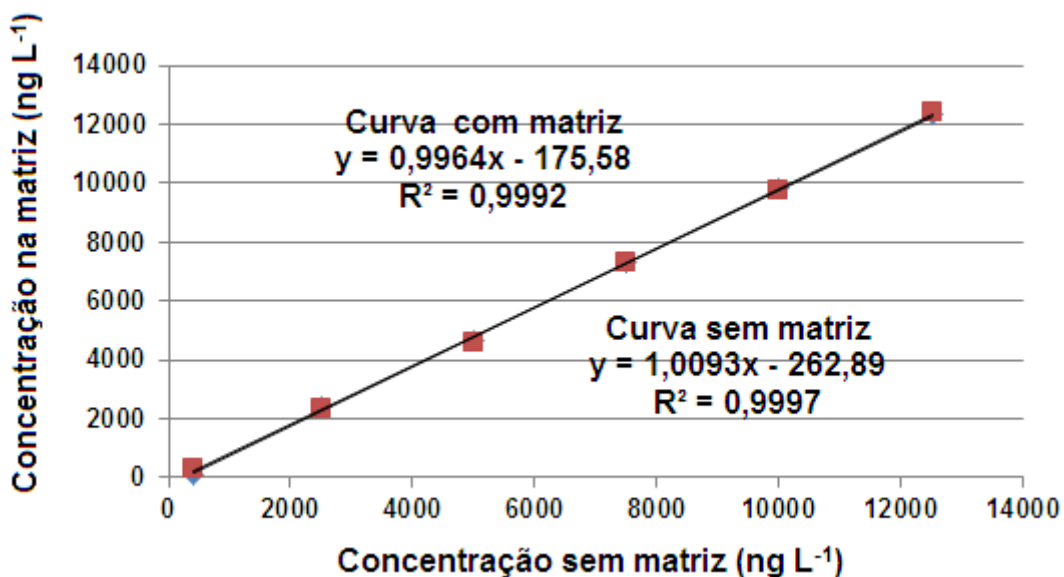


Figura 63 – Perfil da seletividade: curva analítica de diazepam preparadas com *spike* na matriz (efluente) e sem matriz (em metanol), utilizando LC-MS.

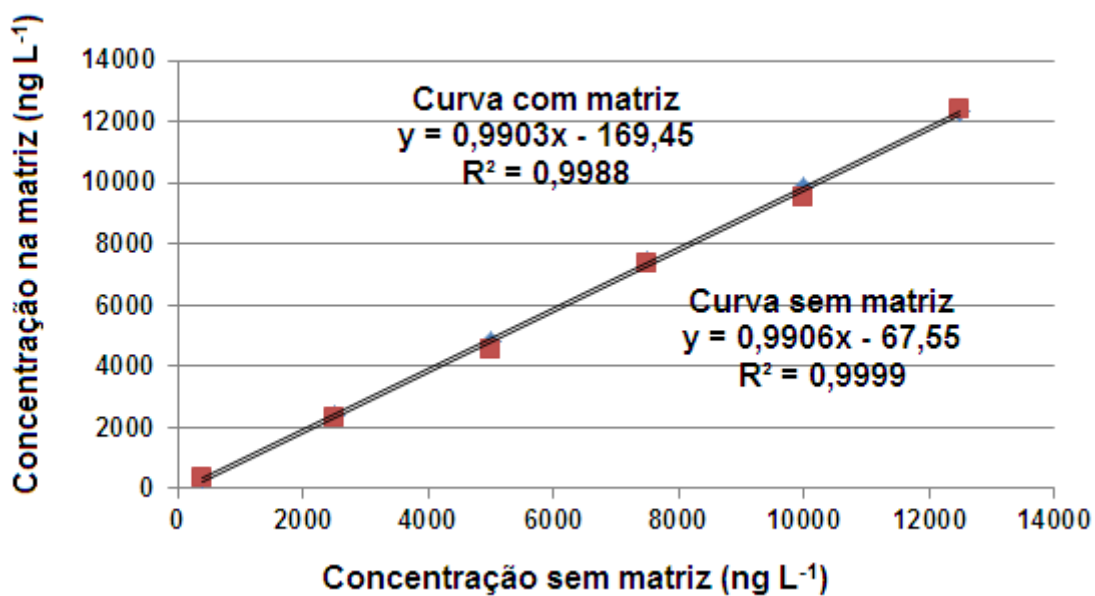


Figura 64 – Perfil da seletividade: curva analítica de lorazepam preparadas com *spike* na matriz (efluente) e sem matriz (em metanol), utilizando LC-MS.

Apêndice 10 - Perfil da seletividade: curvas analíticas preparadas com *spike* na matriz (efluente) e sem matriz (em metanol)

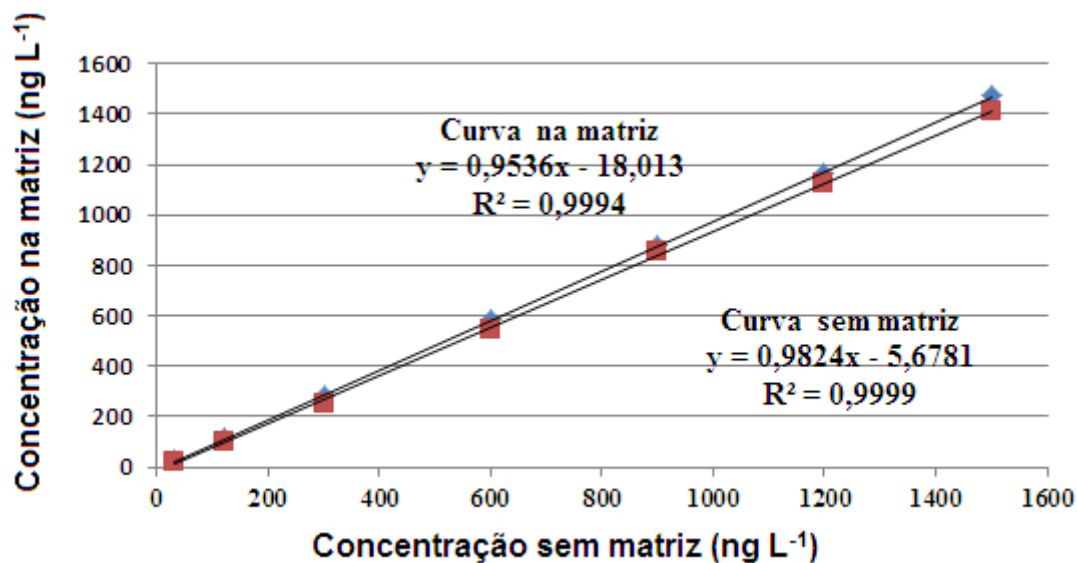


Figura 65 – Perfil da seletividade: curva analítica de bromazepam preparadas com *spike* na matriz (efluente) e sem matriz (em metanol), utilizando LC-MS/MS.

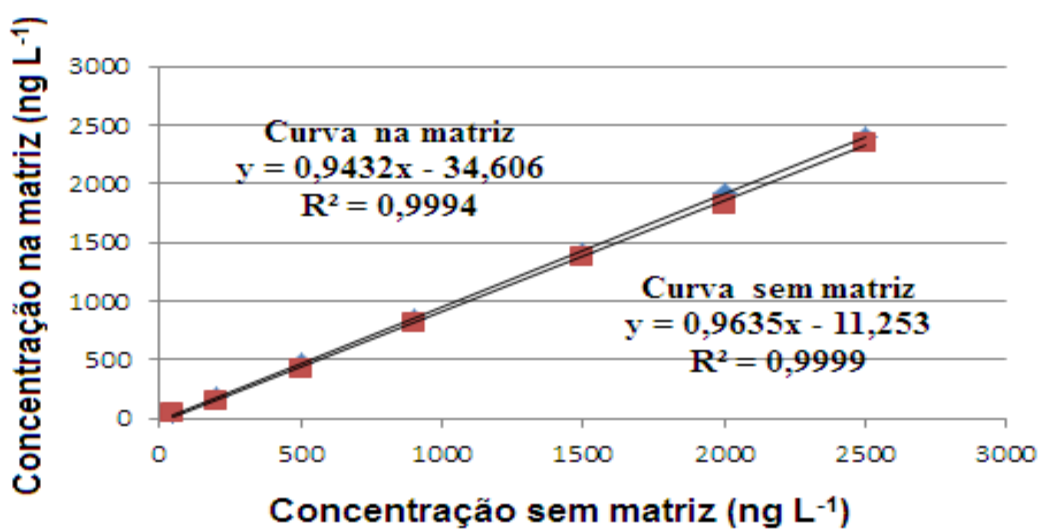


Figura 66 – Perfil da seletividade: curva analítica de carbamazepina preparadas com *spike* na matriz (efluente) e sem matriz (em metanol), utilizando LC-MS/MS.

Apêndice 11 - Perfil da seletividade: curvas analíticas preparadas com *spike* na matriz (efluente) e sem matriz (em metanol)

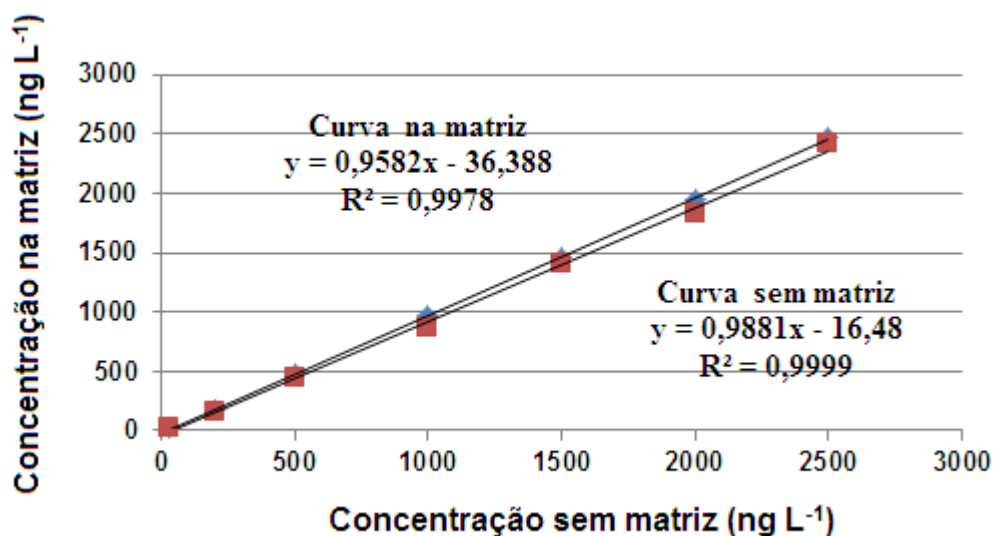


Figura 67 – Perfil da seletividade: curva analítica de clonazepam preparadas com *spike* na matriz (efluente) e sem matriz (em metanol), utilizando LC-MS/MS.

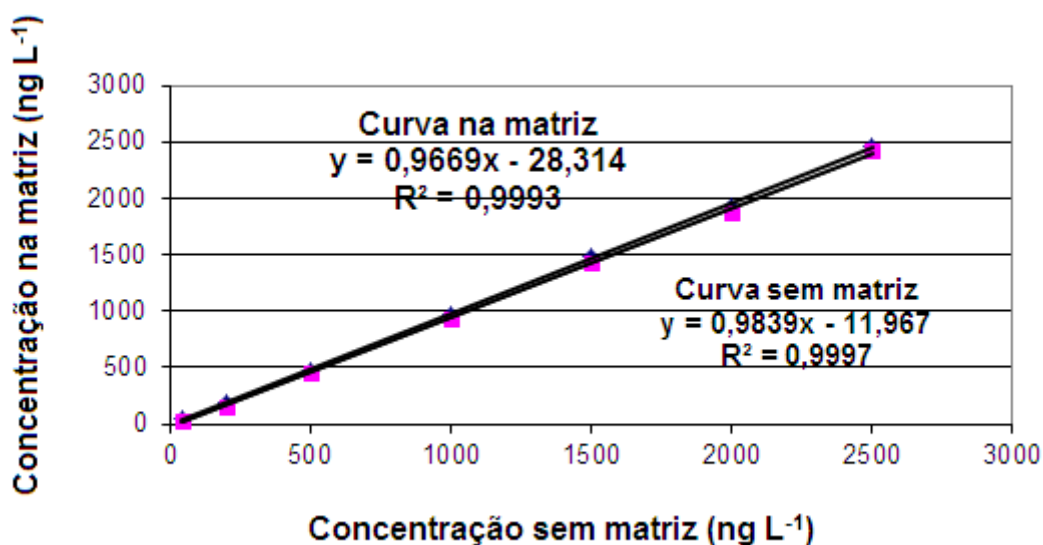


Figura 68 – Perfil da seletividade: curva analítica de diazepam preparadas com *spike* na matriz (efluente) e sem matriz (em metanol), utilizando LC-MS/MS.

Apêndice 12 - Perfil da seletividade: curvas analíticas preparadas com *spike* na matriz (efluente) e sem matriz (em metanol)

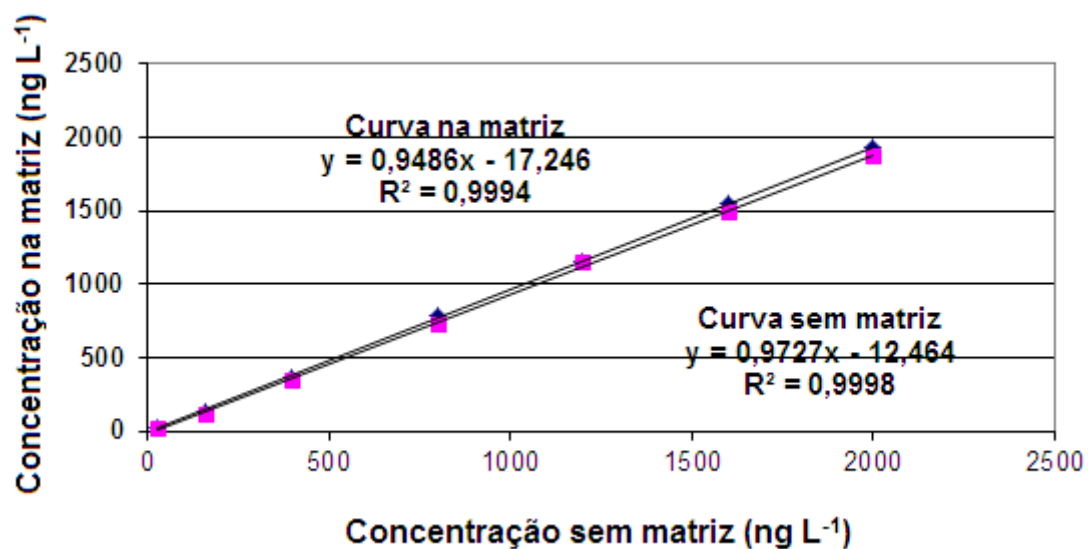


Figura 69 – Curva analítica de diazepam preparadas com *spike* na matriz (efluente) e sem matriz (em metanol), utilizando LC-MS/MS.

## Apêndice 13 - Ensaios de recuperação e Repetibilidade (intra-dia) de fármacos psicoativos em amostras de efluente hospitalar

Tabela 23 – Ensaios de recuperação e precisão intra-dia de fármacos psicoativos em amostras de efluente hospitalar do HUSM utilizando HPLC-UV (n=7).

Analito	Real (n L <sup>-1</sup> )	*Enc. (n L <sup>-1</sup> )	**Rec (%)	***DP (RSD)	Real (n L <sup>-1</sup> )	Enc. (n L <sup>-1</sup> )	Rec (%)	DP (RSD)	Real (n L <sup>-1</sup> )	Enc. (n L <sup>-1</sup> )	Rec (%)	DP (RSD)
Bromazepam	2500	2151	86,1	44,5(±2,1)		23792	95,2	85,2(±0,4)		49022	98,0	242,8(±0,5)
Carbamazepina	5000	4296	85,9	142,0(±3,3)		23514	94,1	358,9(±1,5)		48817	97,6	63,9(±0,1)
Clonazepam	2500	2134	85,4	55,9(±2,6)	25000	23448	93,8	142,0(±3,3)	50000	48960	97,9	142,0(±3,3)
Diazepam	10000	9072	90,7	290,0(±3,2)		23520	94,1	315,8(±1,3)		49036	98,1	284,4(±0,6)
Lorazepam	2500	2115	84,6	59,2(±2,8)		23504	94,0	383,1(±1,6)		48986	98,0	260,7(±0,5)

\* Enc= Encontrado; \*\* Rec= recuperado;\*\*\*DP= Desvio Padrão, RSD= Desvio padrão relativo

Tabela 24 – Ensaios de recuperação e precisão intra-dia de fármacos psicoativos em amostras de efluente hospitalar do HUSM utilizando LC-MS (n=7).

Analito	Real (n L <sup>-1</sup> )	*Enc. (n L <sup>-1</sup> )	**Rec (%)	***DP (RSD)	Real (n L <sup>-1</sup> )	Enc. (n L <sup>-1</sup> )	Rec (%)	DP (RSD)	Real (n L <sup>-1</sup> )	Enc. (n L <sup>-1</sup> )	Rec (%)	DP (RSD)
Bromazepam		504,6	84,0	16,2(±3,2)		23792	95,2	39,9(±1,1)		49022	98,0	61,3(±0,6)
Carbamazepina		510,0	85,0	19,1(±3,8)		23514	94,1	34,8(±1,0)		48817	97,6	58,1(±0,6)
Clonazepam	600,0	498,6	83,1	21,9(±4,4)	4000,0	23448	93,8	42,7(±1,2)	10000,0	48960	97,9	52,7(±0,5)
Diazepam		507,1	84,5	18,0(±3,5)		23520	94,1	315,8(±1,3)		49036	98,1	284,4(±0,6)
Lorazepam		518,6	86,4	59,2(±2,8)		23504	94,0	383,1(±1,6)		48986	98,0	260,7(±0,5)

\* Enc= Encontrado; \*\* Rec= recuperado;\*\*\*DP= Desvio Padrão, RSD= Desvio padrão relativo

Tabela 25 – Ensaios de recuperação e precisão intra-dia de fármacos psicoativos em amostras de efluente hospitalar do HUSM utilizando LC-MS/MS (n=7).

Analito	Real (n L <sup>-1</sup> )	*Enc. (n L <sup>-1</sup> )	**Rec (%)	***DP (RSD)	Real (n L <sup>-1</sup> )	Enc. (n L <sup>-1</sup> )	Rec (%)	DP (RSD)	Real (n L <sup>-1</sup> )	Enc. (n L <sup>-1</sup> )	Rec (%)	DP (RSD)
Bromazepam	40,0	37,1	92,1	1,1(±2,9)	600,0	555,8	92,6	18,2(±3,3)	1200,0	1151,7	96,3	22,3(±1,9)
Carbamazepina	50,0	44,3	88,6	1,1(±2,5)	500,0	461,4	92,3	6,9(±1,5)	2000,0	1940,0	97,0	30,6(±1,6)
Clonazepam	40,0	36,6	91,4	1,1(±3,1)	600,0	558,6	93,1	14,6(±2,6)	1600,0	1555,3	97,2	15,8(±1,0)
Diazepam	50,0	43,1	86,3	0,7(±1,6)	500,0	454,3	90,9	11,3(±2,5)	2000,0	1964,3	98,2	18,1(±0,9)
Lorazepam	40,0	35,7	89,3	1,3(±3,5)	600,0	564,9	94,1	14,8(±2,6)	2000,0	1958,6	97,9	21,2(±1,1)

\* Enc= Encontrado; \*\* Rec= recuperado;\*\*\*DP= Desvio Padrão, RSD= Desvio padrão relativo

Apendice 14 - Estudo de reprodutibilidade (Precisão Intermediária – inter-dia) de ansiolíticos e antiepilépticos em amostras de efluente do HUSM.

Tabela 26 – Estudo de reprodutibilidade (Precisão Intermediária – inter-dia) de ansiolíticos e antiepilépticos em amostras de efluente do HUSM utilizando HPLC-UV.

Analito	Real (ng L <sup>-1</sup> )	*Det. (ng L <sup>-1</sup> )	**Rec (%)	***DP (RSD)	Real	*Det. (ng L <sup>-1</sup> )	**Rec (%)	***DP (RSD)	Real	*Det. (ng L <sup>-1</sup> )	**Rec (%)	***DP (RSD)
Bromazepam	2500,0	2130,9	85,2	50,8(±2,4)		23581,0	94,3	264,2(±1,1)		49022,9	98,5	461,3(±0,9)
Carbamazepina	5000,0	4301,2	86,0	130,4(±3,0)		23476,7	93,9	328,7(±1,4)		48928,6	97,9	287,3(±0,6)
Clonazepam	2500,0	2123,2	84,9	57,5(±2,7)	25000,0	23408,2	93,6	281,7(±1,2)	50000,0	49048,4	98,1	347,7(±0,7)
Diazepam	10000,0	9072,4	86,7	432,8(±5,0)		23520,0	94,1	334,2(±1,4)		49805,7	98,1	334,7(±0,7)
Lorazepam	2500,0	2121,0	84,8	43,4(±2,0)		23459,6	93,8	458,0(±2,0)		49022,6	98,00	368,2(±0,8)

Tabela 27 – Estudo de reprodutibilidade (Precisão Intermediária – inter-dia) de ansiolíticos e antiepilépticos em amostras de efluente do HUSM utilizando LC-MS.

Analito	Real (ng L <sup>-1</sup> )	*Det. (ng L <sup>-1</sup> )	**Rec (%)	***DP (RSD)	Real	*Det. (ng L <sup>-1</sup> )	**Rec (%)	***DP (RSD)	Real	*Det. (ng L <sup>-1</sup> )	**Rec (%)	***DP (RSD)
Bromazepam		497,1	82,9	17,9(±1,8)		3673,8	91,8	58,9(±0,5)		9819,0	98,2	53,7(±0,1)
Carbamazepina		502,9	83,8	19,3(±1,6)		3647,1	91,2	34,5(±0,6)		9801,9	98,0	51,8(±0,1)
Clonazepam	600,0	497,1	82,9	21,7(±0,6)	4000,0	3663,8	91,6	43,7(±1,2)	10000,0	9808,6	98,1	42,3(±0,4)
Diazepam		497,6	82,9	20,2(±4,1)		3652,4	91,3	35,1(±0,2)		9808,2	98,1	36,9(±0,4)
Lorazepam		505,7	84,3	22,7(±4,5)		3645,7	91,1	34,3(±0,9)		9801,5	98,0	52,6(±0,5)

\*Det= Determinada (média de 3 dias); \*\*Rec= Recuperação (média de 3 dias); \*\*\*DP = desvio padrão; RSD= desvio padrão relativo

Apendice 15 - Estudo de reprodutibilidade (Precisão Intermediária – inter-dia) de ansiolíticos e antiepiléticos em amostras de efluente do HUSM.

Tabela 28 – Estudo de reprodutibilidade (Precisão Intermediária – inter-dia) de ansiolíticos e antiepiléticos em amostras de efluente do HUSM utilizando LC-MS/MS.

Analito	Real (ng L <sup>-1</sup> )	*Det. (ng L <sup>-1</sup> )	**Rec (%)	***DP (RSD)	Real	*Det. (ng L <sup>-1</sup> )	**Rec (%)	***DP (RSD)	Real	*Det. (ng L <sup>-1</sup> )	**Rec (%)	***DP (RSD)
Bromazepam	40,0	37,3	93,1	1,3(±1,6)	600,0	551,9	92,0	18,1(±3,3)	1200,0	1157,1	96,4	21,7(±1,9)
Carbamazepina	50,0	44,3	88,8	1,0(±0,8)	500,0	465,2	93,0	12,1(±1,2)	2000,0	1951,8	97,6	23,6(±0,4)
Clonazepam	40,0	36,1	90,3	1,5(±1,6)	600,0	554,8	92,5	16,6(±0,8)	1600,0	1547,5	96,7	13,9(±0,4)
Diazepam	50,0	44,3	88,4	1,0(±1,7)	500,0	464,8	93,0	13,6(±1,7)	2000,0	1961,3	98,1	16,4(±0,4)
Lorazepam	40,0	36,2	90,4	1,4(±1,4)	600,0	563,0	93,8	14,5(±1,0)	2000,0	1959,0	98,0	16,7(±0,3)

\*Det= Determinada (média de 3 dias); \*\*Rec= Recuperação (média de 3 dias); \*\*\*DP = desvio padrão; RSD= desvio padrão relativo