



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
MESTRADO EM QUÍMICA

MÔNICA ARAUJO DAS NEVES

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA (CLAE/FL)
PARA DETERMINAÇÃO DE FLUOROQUINOLONAS EM SEDIMENTO
ESTUARINO DA ILHA DO MARANHÃO**

São Luís
2014

MÔNICA ARAUJO DAS NEVES

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA (CLAE/FL)
PARA DETERMINAÇÃO DE FLUOROQUINOLONAS EM SEDIMENTO
ESTUARINO DA ILHA DO MARANHÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Maranhão para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Gilmar Silvério da Silva

Coorientador: Prof. Dr. Edmar Pereira Marques

São Luís
2014

Neves, Mônica Araujo das

Desenvolvimento e aplicação de metodologia analítica (CLAE/FL) para determinação de fluoroquinolonas em sedimento estuarino da ilha do Maranhão / Mônica Araujo das Neves. – São Luís, 2014.

54f.: il.

Impresso por computador (fotocópia).

Orientador: Gilmar Silvério da Silva.

Coorientador: Edmar Pereira Marques.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós Graduação em Química, 2014.

1.Fluoroquinolonas – Análise química. 2.Sedimento. 3. Extração assistida por ultrassom.

CDU 543.645.7

MÔNICA ARAUJO DAS NEVES

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA (CLAE/FL)
PARA DETERMINAÇÃO DE FLUOROQUINOLONAS EM SEDIMENTO
ESTUARINO DA ILHA DO MARANHÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Maranhão para a obtenção do título de Mestre em Química.

Apresentada em _____ / _____ / _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Gilmar Silvério da Silva
DAQ/IFMA

Prof. Dr. Edmar Pereira Marques
DEQUI/UFMA

Profa. Dra. Natilene Mesquita Brito
DAQUI/IFMA

AGRADECIMENTOS

Quero aqui deixar algumas palavras de agradecimento a todos àqueles que de alguma maneira foram imprescindíveis na realização deste trabalho.

Começo por agradecer a Deus, que me ajudou a seguir em frete quando os obstáculos me faziam desanimar.

Aos meus familiares, pelo companheirismo.

À Lanna Karinny e Karla Caroline, grandes amigas que me socorreram durante os momentos mais tumultuados deste trabalho.

Ao professor Gilmar Silvério que me acolheu como aluna, confiado no meu trabalho e pela orientação sempre consistente.

Aos professores Natilene Mesquita e Ozelito Amarante, os quais sempre se mostraram disponíveis a colaborar e aconselhar quando algo não queria colaborar. Entretanto, devo agradecer especialmente a Natilene Mesquita pelo apoio e imensa colaboração de co-orientação extraoficial e confiança depositada mais uma vez em mim.

Ao professor Edmar Marques pela paciência, compreensão e colaboração.

Ao IFMA e a UFMA por terem possibilitado o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao CNPq pelo apoio financeiro concedido na forma de bolsa.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível”.

Charles Chaplin

RESUMO

É crescente a utilização de fármacos no planeta nas últimas décadas. Tais compostos podem causar impacto negativo nos ecossistemas. Logo, métodos analíticos mais eficazes são fundamentais para o estudo de novos poluentes, especialmente em compartimentos cujas matrizes são muito complexas como sedimentos de manguezal. Sendo assim, este trabalho teve por objetivo aprimorar um método analítico para avaliar a ocorrência de antibióticos fluoroquinolônicos, ciprofloxacino (CIP), levofloxacino (LEV) e norfloxacino (NOR), em amostras de sedimento do rio Paciência localizadas na ilha do Maranhão utilizando a técnica de extração assistida por ultrassom, extração em fase sólida e a cromatografia líquida (CLAE/FL). Segundo o estudo, o método mostrou-se linear ($r^2 > 0,99$), recuperação variando 73,73-88,85%, preciso (DPR < 20%), seletivo e sensível (Limite de detecção para CIP, LEV e NOR de 9,32; 17,78 e 4,42 $\mu\text{g}.\text{kg}^{-1}$, respectivamente e limite de quantificação de 20 $\mu\text{g}.\text{kg}^{-1}$ para todos os três analitos) para quantificação de fluoroquinolonas em sedimento estuarino. Outros aspectos relevantes do método desenvolvido nesse trabalho foram à simplicidade, o baixo custo e ausência de interferentes para uma matriz ambiental muito complexa como são os sedimentos de manguezal. Ao avaliar o sedimento em vários pontos do rio observou-se contaminação em três pontos por CIP variando entre 56,55–70,45 $\mu\text{g}.\text{kg}^{-1}$. Esses resultados são similares ao encontrados ao redor do planeta para regiões poluídas e são motivos de preocupação em função dos efeitos desses antibióticos no ecossistema.

Palavras-chaves: Fluoroquinolonas; Sedimento; Extração assistida por ultrassom (UAE); CLAE/FL.

ABSTRACT

Drugs in the planet have increased during last decades. Such compounds can cause adverse impact on ecosystems. Soon, more effective analytical methods are essential for the study of new pollutants, especially in magazines whose headquarters are very complex as mangrove sediments. Therefore, this study aimed to improve an analytical method to assess the occurrence of fluoroquinolone antibiotics, ciprofloxacin (CIP), levofloxacin (LEV) and norfloxacin (NOR), in sediment samples from the Paciência river located on the Maranhão island using the technique of ultrasound-assisted extraction, extraction phase solid and liquid chromatography (HPLC/FD). According to the study, the method was linear ($r^2 > 0.99$), recovery ranging from 73.73 to 88.85%, precise (RSD <20%), selective and sensitive (detection limit for CIP, LEV and NOR 9.32; 17.78 and 4.42 $\mu\text{g}.\text{kg}^{-1}$, respectively, and limit of quantitation of 20 $\mu\text{g}.\text{kg}^{-1}$ for all three drugs) for quantification of fluoroquinolones in estuarine sediments. Other relevant aspects of the method developed in this work were the simplicity, low cost and absence of interfering to a very complex environmental matrix as are the mangrove sediments. When evaluating the sediment at various points of the river there was contamination at three points by CIP ranging from 56.55 to 70.45 $\mu\text{g}.\text{kg}^{-1}$. These results are similar to those found around the planet to polluted regions and they are of concern due to the effects of these antibiotics in the ecosystem.

Keywords: Fluoroquinolones; Sediment; Ultrasound-assisted extraction (UAE); HPLC/FD.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura molecular do ácido nalidíxico, norfloxacino, ciprofloxacino e levofloxacino. Em azul o átomo de flúor e em vermelho o grupo piperazinil (Fonte: Adaptado de SILVA, 2006) ...	17
Figura 2.	Equilíbrio ácido-base de uma fluoroquinolona. Molécula carregada positivamente em meio ácido (a), molécula na forma de íon dipolar em pH 7,4 (b) e molécula carregada negativamente em meio básico (c). Fonte: ARAUJO 2013 apud LEAL, 2012	18
Figura 3.	Rotas de exposição de fármacos no ambiente. Fonte: ARAUJO 2013 apud HIRSCH et al, 1998	22
Figura 4.	Localização da bacia do rio Paciência na ilha do Maranhão/Maranhão/Brasil	30
Figura 5.	Soluções estoque e soluções de trabalho	33
Figura 6.	Pontos de amostragem ao longo da bacia do rio Paciência.....	39
Figura 7.	Comparação dos valores de extração do CIP, LEV e NOR, frente aos quatro procedimentos de extração	40
Figura 8.	Cromatogramas obtidos a partir da extração (método3) do branco da matriz (vermelho) e da matriz fortificada com CIP, LEV e NOR na concentração de 200 $\mu\text{g}.\text{kg}^{-1}$ (azul) com detecção por CLAE/FL	42
Figura 9.	Curvas analíticas para os compostos CIP, LEV e NOR. Condições cromatográficas: coluna Luna (250 x 4,6 mm; 5 μm), fase móvel MeOH/tampão fosfato ($\text{NaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,04 M ajustado à pH 3 com H_3PO_4 85%), na proporção 30/70 (v/v), modo isocrático, fluxo de 1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{ems}} = 450\text{nm}$	43

LISTA DE TABELAS E EQUAÇÕES

Tabela 1.	Propriedades físico-químicas gerais dos antibióticos fluoroquinolônicos	18
Tabela 2.	Métodos para determinação de fluoroquinolonas em diversas matrizes	25
Tabela 3.	Condições cromatográficas estabelecidas por autores para detecção de fluoroquinolonas via CLAE	27
Tabela 4.	Parâmetros de validação segundo USP, ICH, FDA, Anvisa e Inmetro	28
Tabela 5.	Parâmetros de validação quanto à natureza	29
Tabela 6.	Parâmetros de validação quanto ao propósito	30
Tabela 7.	Padrões utilizados no desenvolvimento do estudo	32
Tabela 8.	Características físico-químicas da amostra controle de sedimento	34
Tabela 9.	Condições analíticas otimizadas por Araujo (2013)	34
Tabela 10.	Procedimentos de extração propostos para uso no método	35
Tabela 11.	Características físico-químicas das amostras de sedimento da bacia do rio Paciência	39
Tabela 12.	Padrões utilizados no desenvolvimento do estudo	43
Tabela 13.	Recuperações percentuais e coeficiente de variação dos compostos analisados por CLAE/FL	44
Tabela 14.	Valores de LD e LQ para as três fluoroquinolonas investigadas ..	44
Tabela 15.	Concentrações das três fluoroquinolonas investigadas no rio Paciência	45
Tabela 16.	Concentrações de fluoroquinolonas encontradas em outras regiões	46
Equação 1.	Limite de detecção instrumental	37
Equação 1.	Limite de quantificação Instrumental	38
Equação 3.	Limite de detecção do método	38
Equação 4.	Desvio padrão combinado das recuperações	38

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo Geral	15
2.2	Objetivos Específicos	15
3	REVISÃO DA LITERATURA	16
3.1	Fluoroquinolonas	16
3.2	Propriedades das Fluoroquinolonas	17
3.3	Fluoroquinolonas no ambiente e principais vias de entrada	20
3.4	Metodologias de análise de fluoroquinolonas em matrizes ambientais sólidas	22
3.4.1	<i>Preparação da Amostra</i>	23
3.4.2	<i>Detecção da Amostra</i>	25
3.5	Validação	28
3.6	Local de Estudo	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1.	Padrões, Solventes e Reagentes	32
4.2.	Preparo e Armazenamento de Soluções Estoque e Soluções de Trabalho	33
4.3.	Amostra testemunha de sedimento estuarino	33
4.4.	Equipamento de Cromatografia a Líquido (CL)	34
4.5.	Otimização das Condições Cromatográficas	34
4.6.	Extração das amostras de sedimento	34
4.7	Purificação das amostras de sedimento	35
4.8	Validação do método otimizado	36
4.8.1.	<i>Seletividade</i>	36
4.8.2.	<i>Linearidade</i>	36
4.8.3.	<i>Exatidão</i>	37
4.8.4.	<i>Precisão</i>	37
4.8.5.	<i>Limite de detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).....</i>	37
4.9.	Coleta, transporte e acondicionamento das amostras reais	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	40

5.1	Otimização do procedimento de extração	40
5.2	Validação do método	42
5.3	Ocorrência de Fluoroquinolonas em sedimento do rio Paciência	45
6	CONCLUSÃO	48
	REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

Produtos químicos são amplamente utilizados na sociedade moderna, sendo produzidos mundialmente em larga escala para as mais variadas aplicações. No entanto, uma das grandes desvantagens da produção e utilização de tais produtos está na geração de resíduos, sejam eles derivados diretamente das atividades industriais ou produzidos após seu consumo pela sociedade, que podem impactar de forma negativa o ambiente. Esses resíduos são conhecidos atualmente como poluentes orgânicos emergentes ou simplesmente contaminantes emergentes (BILA, DEZOTTI, 2003; SILVA, COLLINS, 2011).

Ao contrário dos poluentes orgânicos persistentes, os contaminantes emergentes não necessitam ser persistentes para causarem efeitos negativos no ambiente uma vez que sua entrada acontece de forma continuada como resultado de processos industriais, descartes de produtos comerciais diretamente nos corpos d'água, rede de esgotos, solos e sedimentos, ou ainda devido à excreção de seres humanos ou animais na forma não metabolizada ou metabolizada no caso dos fármacos (SILVA, COLLINS, 2011).

Ao longo dos últimos anos, agências ambientais regulatórias dos países desenvolvidos vêm tentando estabelecer procedimentos de caracterização e controle de substâncias prejudiciais ao ambiente e mais especificamente à saúde humana (HUTZINGER, 2006). A grande preocupação é que muitos contaminantes emergentes ainda não são contemplados em legislações ambientais ao redor do mundo, apenas alguns compostos isolados vêm sendo regulamentados, embora a grande maioria ainda permaneça sem definições legais quanto sua presença nas diferentes matrizes (TADEO et al., 2012). Ao mesmo tempo, alguns trabalhos vêm abordando o problema enfocando tanto na presença destes contaminantes quanto os efeitos agudos e crônicos sobre os organismos vivos (KEMPER, 2008; KÜMMERER, 2010; TADEO et al., 2012; DORIVAL-GARCÍA et al., 2013).

Como uma das classes de contaminantes orgânicos emergentes, os antibióticos têm atraído cada vez mais atenção devido aos seus efeitos indesejáveis sobre os variados ecossistemas e saúde dos seres humanos e animais (KEMPER, 2008; SAPKOTA et al, 2008; KÜMMERER, 2010). Os antibióticos são substâncias utilizadas mundialmente para inibir o crescimento de determinados microrganismos, podendo ser utilizados para tratar enfermidades (finalidade terapêutica), prevenir

contra doenças causadas pela presença de microrganismos patogênicos no corpo humano ou animal (profilático) e como promotores de crescimento (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; SANTOS, 2011).

As Fluoroquinolonas representam uma importante classe de agentes antibacterianos utilizadas em praticamente todo o mundo. Foram projetadas para alargar o espectro de atividade e melhorar as propriedades farmacocinéticas em comparação com seus compostos originários, as quinolonas, atuando tanto contra bactérias gram-positivas como bactérias gram-negativas (SILVA, 2006; GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). Seu principal impacto para a saúde pública e ambiental ocorre devido à possibilidade de surgimento de cepas altamente resistentes aos antibióticos convencionais, inclusive com a detecção de cepas multirresistentes (DEPIZZOL, 2006).

De acordo com a Vigilância Europeia de Consumo de Antibióticos (ESAC), a utilização de fluoroquinolonas no mundo vem excedendo as doses diárias definidas para 1000 habitantes/dia, sendo o ciprofloxacino o medicamento, desta classe de antibiótico, mais prescrito seguido do ofloxacino, levofloxacino, lomefloxacino e norfloxacino (FERECH, et al., 2006; PICÓ, ANDREU, 2007).

Após a administração, os antibióticos não são completamente absorvidos sendo eliminados na sua forma ativa ou inativa através da urina e/ou fezes para o esgoto alcançando assim as Estações de Tratamento de Esgotos (ETE). Estas são consideradas por alguns autores os principais contribuintes da presença de produtos farmacêuticos para o ambiente além dos hospitais, já que através destes os diversos fármacos podem atingir águas superficiais, subterrâneas e sedimentos dos rios nos quais seus efluentes desembocam (PICÓ, ANDREU, 2007; KÜMMERER, 2010; DORIVAL-GARCÍA, 2013).

Existem poucos métodos descritos na literatura para a análise de fluoroquinolonas em matrizes ambientais sólidas, tais como solo e sedimento de rio. Grande parte das metodologias descritas são para matrizes ambientais aquosas. Geralmente a CLAE/UV, a CLAE/FL e CLAE/EM têm sido as técnicas analíticas mais citadas. Com relação ao preparo das amostras, a técnica de extração em fase sólida (EFS) tem sido a de escolha com a utilização de diversos tipos de sorventes. Técnicas tradicionais (agitação mecânica e extração por Soxhlet) e alternativas (extração por líquido pressurizado (PLE), também conhecida por extração acelerada por solventes (ASE), extração assistida por micro-ondas (MAE) e extração assistida

por ultrassom (UAE)) para o preparo de amostras sólidas tem sido estudadas com o objetivo de melhorar o desempenho da extração dos analitos (PICÓ; ANDREU, 2007; SEIFRTOVÁ et al., 2009; SILVA; COLLINS, 2011; SPELTINI et al., 2011; TADEO, 2012).

Devido ao exposto, o objetivo deste trabalho foi otimizar uma metodologia analítica de fácil e rápida execução para análise do antibiótico fluoroquinolônicos, em especial o ciprofloxacino (CIP), levofloxacin (LEV) e norfloxacin (NOR), em amostras de sedimento do rio Paciência localizado na Ilha do Maranhão já que estes antibióticos estão entre os mais prescritos e esta matriz ambiental caracteriza-se por ter uma ampla capacidade de acumular vários tipos de poluentes, dentre eles os fármacos, tornando-se assim um verdadeiro testemunho dos impactos ambientais sofridos pelos ecossistemas aquáticos ao longo do tempo.

2 OBJETIVOS

2.1. Geral

Determinar antibióticos fluoroquinolônicos (CIPRO, LEVO e NORF) em amostras de sedimento estuarino da ilha do Maranhão por CLAE/FL.

2.2 Específico

- a) Definir parâmetros cromatográficos para determinação de fluoroquinolonas em sedimentos;
- b) Desenvolver um método de extração e definir as melhores condições de *clean-up* para a determinação de antibióticos no sedimento;
- c) Avaliar a concentração (perfil horizontal) dos antibióticos fluoroquinolônicos nos sedimentos estuarinos amostrados;

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Fluoroquinolonas

Antibióticos são definidos como compostos naturais, sintéticos ou semissintéticos, cuja finalidade é prevenir ou tratar doenças infecciosas causadas por microrganismos patogênicos, tanto nos seres humanos como nos animais (KEMPER, 2008).

Visto que não são totalmente metabolizados durante o uso terapêutico, os antibióticos estão presentes no esgoto doméstico principalmente como resultado da excreção humana. Além disso, o uso na pecuária contribui, também, para introdução no ambiente, como resultado de processos da manufatura, disposição irregular ou excreção metabólica. (RODRIGUES-SILVA et al., 2014).

Existem aproximadamente onze diferentes classes de antibióticos, que se diferenciam por sua estrutura química ou mecanismos de ação no tratamento específico a determinado patógeno. Como uma das classes de antibióticos, as quinolonas, antibióticos sintéticos, são eficientes no tratamento de infecções causadas por bactérias gram-positivas e gram-negativas e são largamente empregadas tanto na medicina humana como veterinária. (CISNEROS-FARRAR; PARSONS, 2007).

A primeira quinolona, o ácido nalidíxico, foi sintetizada em 1962 a partir da cloroquina (um fármaco destinado ao tratamento da malária). Desde então, subsequentes alterações no núcleo da quinolona, por meio da adição de diferentes substituintes deram origem aos demais agentes antimicrobianos dessa classe de compostos (RODRIGUES-SILVA et al., 2014).

Este grupo tornou-se de escolha no combate às doenças urinárias de difícil tratamento, devido à eficiência contra a maioria das *Enterobacteriaceae*. No entanto, nenhum destes compostos possuía qualquer atividade contra *Pseudomonas*, anaeróbios e bactérias Gram-positivas (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Na década de 1980, após intensas pesquisas realizadas a partir destas primeiras quinolonas, uma das principais mudanças na estrutura das quinolonas foi à adição de um átomo de flúor na posição C-6, que ampliou o espectro de ação das

quinolonas para as bactérias Gram-positivas, originando assim as fluoroquinolonas (CISNEROS-FARRAR; PARSONS, 2007; RODRIGUES-SILVA et al., 2014).

Quimicamente, as fluoroquinolonas (FQS) diferem das anteriores por possuírem a combinação de um átomo de flúor e um grupo piperazinil (Figura 1). A adição de um segundo átomo de flúor na posição C-8 resultou no aumento da absorção e aumento da meia-vida da quinolona no organismo humano; no entanto, aumentou a fototoxicidade do composto. A adição de um grupo piperazina na posição C-7 ampliou a ação contra as bactérias aeróbias gram-negativas (LEYVA; LEYVA, 2008).

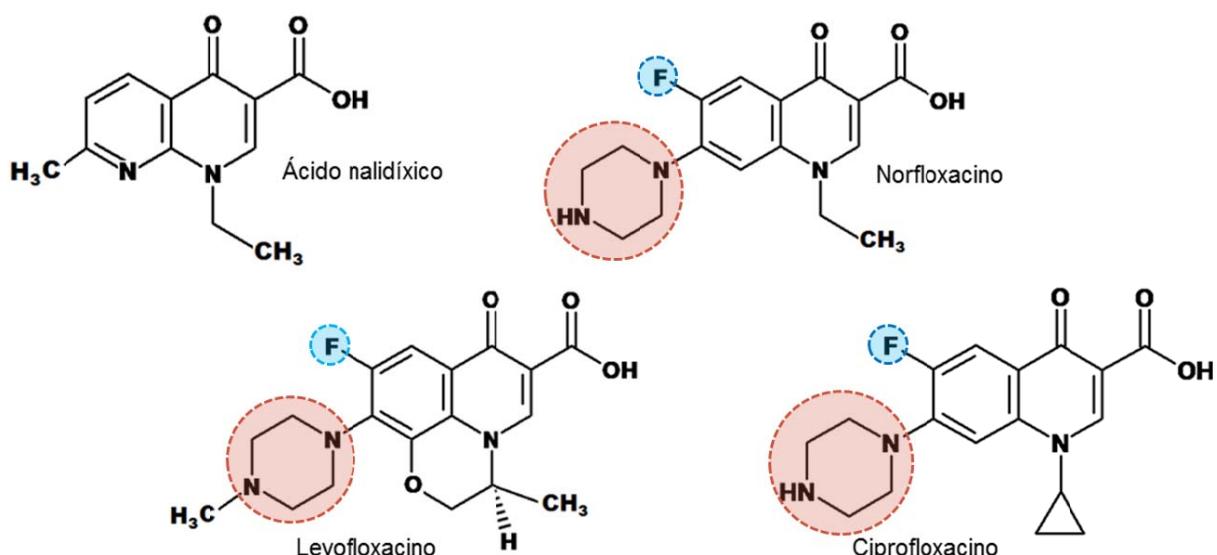


Figura 1. Estrutura molecular do ácido nalidíxico, norfloxacino, ciprofloxacino e levofloxacino. Em azul o átomo de flúor e em vermelho o grupo piperazinil (Fonte: Adaptado de SILVA, 2006).

Não é totalmente claro na literatura como as quinolonas são classificadas com relação às gerações, uma vez que cada autor emprega um método diferente. A única divisão aceita universalmente é a separação entre compostos com flúor (também denominadas como fluoroquinolonas) das quinolonas de primeira geração, que não possuem flúor em sua composição (RODRIGUES-SILVA et al., 2014).

3.2 Propriedades das Fluoroquinolonas

O conhecimento das propriedades físicas e químicas dos fármacos, tais como as constantes de dissociação, capacidade para complexar íons metálicos, e o seu caráter hidro/lipofílico podem ser essenciais para fins práticos e de interpretação

do seu destino nos mais variados tipos de matrizes. As propriedades físico-químicas dos FQS mais utilizadas, que podem ser de interesse para o desenvolvimento de procedimentos analíticos ou na determinação do seu comportamento e destino no ambiente, estão listadas na Tabela 1 (PICÓ; ANDREU, 2007).

Tabela 1. Propriedades físico-químicas gerais dos antibióticos fluoroquinolônicos.

Grupo farmacológico	*MM (g.mol ⁻¹)	*S _w (mg.L ⁻¹)	*Log K _{ow}	pK _a (25°C)	Pressão de vapor (mmHg)
Fluoroquinolonas	229,50 a 417,6	3,2 a 17790	-1 a -1,6	8,6	2,1x10 ⁻¹³ a 8,4x10 ⁻¹⁴

*MM = massa molar; *S_w = solubilidade em água; *Log K_{ow} = coeficiente de partição octonal/água.
Fonte: Adaptado de SARMAH; MEYER e BOXALL, 2006.

A presença de um grupo ácido (grupo carboxílico) e de um grupo básico (amina terciária) atribui aos compostos fluoroquinolônicos propriedades anfotéricas podendo, deste modo, existir mais de uma espécie presente em solução. A atividade antibacteriana destes compostos é também dependente do pH, porque estes fármacos atuam por inibição de DNA girase bacteriana, um processo que depende tanto do pH como da concentração do ácido (PARK; KIM; BARK, 2002).

Dependendo do pH do meio, as fluoroquinolonas podem existir sob as formas catiônica, aniônica, neutra ou de íon dipolar (Figura 2). A pH 7,4 (fisiológico), as fluoroquinolonas encontram-se total ou parcialmente ionizadas, sendo a espécie predominante a forma de íon dipolar podendo, no entanto, coexistir com as formas aniônica e catiônica (PARK; KIM; BARK, 2002).

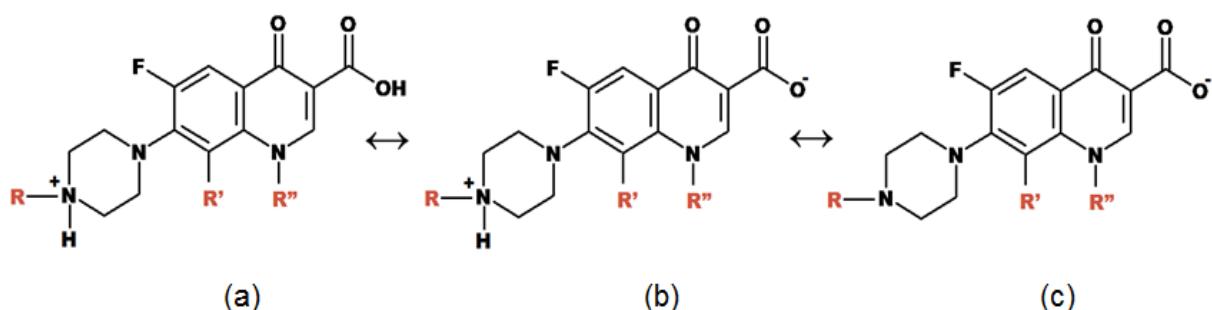


Figura 2. Equilíbrio ácido-base de uma fluoroquinolona. Molécula carregada positivamente em meio ácido (a), molécula na forma de íon dipolar em pH 7,4 (b) e molécula carregada negativamente em meio básico (c). Fonte: Araujo 2013 apud LEAL, 2012.

De acordo com as constantes de acidez e diferentes estruturas, as fluoroquinolonas irão exibir diferentes ações antibacterianas. Sendo as porinas uma das principais vias de entrada das fluoroquinolonas nas células bacterianas gram-

negativas, a hidrofobicidade, o peso molecular, e a forma iônica em pH fisiológico são propriedades que irão dificultar a interação destes fármacos (SOUSA, 2007).

No caso das bactérias gram-positivas, como estas não possuem uma membrana externa, onde se encontram os canais porínicos, a difusão através da membrana celular será o local de entrada dos antibacterianos na célula bacteriana e, neste caso, a hidrofobicidade do composto é a propriedade mais importante (SOUSA, 2007).

Drogas podem persistir em matrizes ambientais sólidas por um longo tempo. A persistência depende principalmente da sua fotoestabilidade vinculada a sua capacidade de adsorção, taxa de degradação e lixiviação pela água. A maioria dos FQS são quimicamente muito estáveis à hidrólise e a temperaturas elevadas, mas sofrem fotólise pela luz UV. A reação fotoquímica mais comum é desfluoração. (THIELE-BRUHN, 2003).

Fármacos fortemente adsorvidos, como as tetraciclinas e fluoroquinolonas, tendem a se acumular nos solos e sedimentos (TOLLS, 2001). Para avaliar a adsorção de FQS em matrizes sólidas utiliza-se o coeficiente de sorção (K_d), o qual é definido como a razão entre as concentrações de um analito no solo e na água no estado de equilíbrio. Este coeficiente é difícil de calcular e varia substancialmente, dependendo das condições de um determinado tipo de solo (TOLLS, 2001; THIELE-BRUHN, 2003).

Outra opção é o coeficiente de sorção normalizado pelo carbono (K_{oc}), que se correlaciona fortemente com o coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}) e determina a natureza das interações hidrofóbicas entre as FQ e o solo. A enrofloxacina é o composto mais lipofílico, com um K_{oc} de $15.800 \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1}$. Ciprofloxacino, enrofloxacina, e ofloxacino têm altos valores de K_d ($496 - 61,000 \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1}$) (TOLLS, 2001; THIELE-BRUHN, 2003).

Eles movem-se rapidamente a partir do compartimento de água para sólidos, principalmente devido a sua lipofilicidade, embora outras interações específicas com o solo, como por exemplo, com argila, matéria orgânica e óxidos metálicos são susceptíveis. De acordo com uma classificação de mobilidade de pesticida no solo, estas FQS pode ser considerado imóvel (TOLLS, 2001).

FQS e quinolonas formam complexos estáveis com vários iões divalentes e trivalentes de metais. Entre estes, Ca^{2+} , Mg^{2+} , e Al^{3+} conduzem a complexos com os maiores constantes de estabilidade. Estes complexos 1: 1 são formados por

interação iônica com o dipolo de oxigénio 4-ceto e o grupo ácido 3-carboxílico ionizado (PARK; KIM; BARK, 2002; TURIEL; MARTÍN-ESTEBAN; TADEO, 2006).

3.3 Fluoroquinolonas no ambiente e principais vias de entrada

Após a descoberta dos antibióticos, em 1928, houve uma mudança significativa no controle das doenças infecciosas, principalmente de origem bacteriana, com impactos positivos para a saúde pública e a qualidade de vida da população. Atualmente, os antibióticos ou antimicrobianos têm uma elevada demanda, tanto na medicina humana quanto no setor de produção animal, como por exemplo, na bovinocultura, nas produções avícolas e suínas e na aquicultura (THIELE-BRUHN, 2003).

Entretanto, o uso indiscriminado dos antibióticos vem causando grande impacto na área de saúde pública e ambiental, devido à possibilidade de surgimento de cepas altamente resistentes aos antibióticos convencionais, inclusive com a detecção de resistências múltiplas a determinados antibióticos, e ocorrência de casos fatais de infecções hospitalares, adquiridas com patógenos polirresistentes (DEPIZZOL, 2006).

O fenômeno da resistência a antibióticos decorre, principalmente, da seleção de cepas bacterianas em ambientes que apresentam concentrações destes quimioterápicos, tal como ocorre no intestino de humanos, onde indivíduos submetidos a tratamento intensivo e com elevadas dosagens de antibióticos liberam microrganismos resistentes nas fezes juntamente com antibióticos excretados. Estes microrganismos, patogênicos ou não, presentes nas fezes, em conjunto com a urina e produtos de degradação destes quimioterápicos são lançados em pias e/ou ralos (esgoto sanitário) podendo alcançar o ambiente (DEPIZZOL, 2006).

De acordo com a Vigilância Europeia de Consumo de Antibióticos (ESAC), o consumo de fluoroquinolonas no mundo vem excedendo as dosagens diárias definidas para 1000 habitantes/dia sendo o ciprofloxacino o medicamento, dentro desta classe de antibiótico, mais prescrito (FERECH, et al., 2006).

Observa-se uma série de estudos recentes indicando a presença destas substâncias, em pequenas concentrações (ng.L^{-1} ou $\mu\text{g.L}^{-1}$), em diversas matrizes ambientais, tais como excretos animais, lagoas de tratamento de resíduos de origem

animal, solos, sedimentos, lamas de esgoto, águas superficiais e subterrâneas (PENG, 2008).

A ocorrência destes compostos no ambiente pode impactar negativamente organismos aquáticos e terrestres (toxicidade crônica e aguda), além de exercer possível influência no aumento da resistência de microrganismos aos antibióticos (KEMPER, 2008). Estudos sobre os impactos ecotoxicológicos de antibióticos em organismos alvos e não alvos não têm sido amplamente estimados (SANTOS et al, 2011).

De acordo com Mulroy (2001), entre 50% a 90% da dosagem de um fármaco são excretada na sua forma inalterada pelos humanos e animais através da urina e/ou fezes alcançando assim, as Estações de Tratamento de Esgotos (ETE). Estas são consideradas para a maioria dos autores os principais contribuintes da presença de produtos farmacêuticos para o ambiente além dos hospitalares, já que através destes os diversos fármacos podem atingir águas superficiais e assim contaminar sedimentos estuarinos (KÜMMERER, 2010; DORIVAL-GARCÍA, 2013).

Outro agravante para a geração de fármacos residuais para o meio ambiente é o descarte inadequado dos antimicrobianos, pois quando não consumidos, normalmente, ficam às suas sobras, que são acumulados até a perda da validade tornando-se “lixo”, que comumente, não é tratado, e têm como destino o ambiente (SANTOS; PIZZOLATO; CUNHA, 2007).

As vias urbanas (residência e principalmente hospitalares) são os grandes geradores e disseminadores de fármacos residuais, através de seus efluentes carregados de fármacos e metabolitos farmacologicamente ativos. Além das vias urbanas, as vias rurais, que fazem uso de medicamentos para o tratamento de animais, também contribuem para a geração de fármacos residuais (REZAEE et al, 2005; GAUTAM et al, 2007).

Estudos têm estimado que 70 a 80% das drogas administradas em fazendas são lançadas ao meio ambiente. Tal fato levou, por exemplo, a países como a Suécia a proibir uso de antibióticos como promotores de crescimento em animais, restringindo as vendas às prescrições veterinárias (SANDERSON et al, 2004).

Hirsch e colaboradores (1998) sugeriram um esquema geral, apresentado na Figura 3, sobre as possíveis rotas de exposição de fármacos de uso humano e veterinário no ambiente.

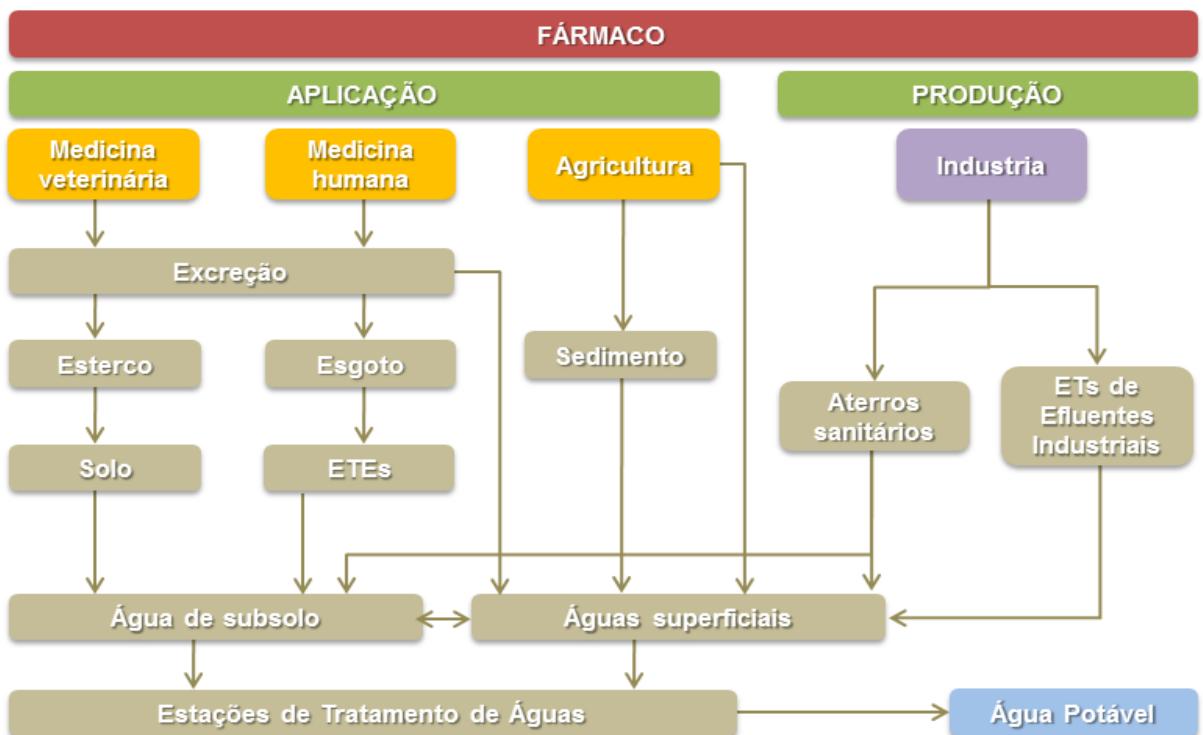


Figura 3. Rotas de exposição de fármacos no ambiente. Fonte: ARAUJO 2013 apud HIRSCH et al., 1998.

A presença de fármacos em matrizes ambientais tem sido alvo de questionamentos e pesquisas nas áreas de saúde pública e ambiental devido, principalmente, ao potencial desenvolvimento de bactérias resistentes e sua persistência no meio ambiente (DEPIZZOL, 2006). Contudo, grande parte dos esforços destas pesquisas está focada na ocorrência e destino destes compostos em matrizes ambientais aquosas e raramente em amostras sólidas (SEIFROVA et al., 2009; KÜMMERER, 2010).

3.4 Metodologias de análise de Fluoroquinolonas em matrizes ambientais sólidas

A análise de antibióticos no ambiente representa uma tarefa difícil devido tanto a alta complexidade das matrizes analisadas quanto as concentrações normalmente baixas (ng.L^{-1}) destes analitos (SPELTINI et al., 2011). Por esta razão, o desenvolvimento de métodos analíticos mais sensíveis torna-se cada vez mais necessário e desejável para o monitoramento antibióticos nos mais diversos níveis de concentração (LANÇAS, 2009).

De acordo com Bila e Dezotti (2003) diferentes métodos são reportados na literatura para análise de fármacos os quais são principalmente válidos para

análise em matrizes biológicas como sangue, tecido e urina. Eles destacam que algumas modificações nestes métodos podem ser adequadas para detecção de concentrações na faixa de $\mu\text{g.L}^{-1}$ e ng.L^{-1} destes compostos em amostras ambientais.

Existem poucos métodos descritos na literatura para a análise de fluoroquinolonas em matrizes ambientais sólidas, tais como sedimento de rio. Contudo, alguns métodos desenvolvidos para análise de fluoroquinolonas em amostras biológicas e alimentos podem ser de grande ajuda para o desenvolvimento de procedimentos analíticos adequados e eficientes para amostras ambientais sólidas. Aquelas matrizes têm características químicas diferentes, mas são tão complexas como as amostras de solo e sedimento sendo assim um ponto de partida atrativo para o desenvolvimento de novos métodos de análise aplicáveis a estas amostras (PICÓ; ANDREAU, 2007; SILVA; COLLINS, 2011; TADEO et al., 2012).

3.4.1 Preparação da Amostra

A etapa do preparo da amostra representa o ponto crítico de um protocolo analítico por envolver maior tempo e cuidado do analista com a mesma, já que em alguns casos as amostras apresentam concentrações relativamente baixas, podendo chegar à ordem de ng L^{-1} (LANÇAS, 2009).

Frequentemente, diversas etapas são empregadas (digestão, extração, limpeza e concentração) até que uma alíquota da amostra em estudo seja introduzida no equipamento para análise e sua escolha deve levar em consideração a utilização de procedimentos simples, baixo manuseio da amostra, pouco gasto com solventes, alta precisão, boa recuperação e menor geração possível de resíduos para o meio ambiente (MOREAU; SIQUEIRA, 2010)

Os métodos tradicionais de preparação da amostra sólidas (agitação mecânica e extração por Soxhlet) são trabalhosos, demorados e geralmente envolvem grandes quantidades de solventes. Como consequência, uma variedade de métodos alternativos de preparação de amostras sólidas foram desenvolvidos ao longo dos últimos anos, com o objetivo de melhorar o desempenho da extração de poluentes orgânicos, tais como os antibióticos fluoroquinolônicos, de matrizes ambientais sólidas, bem como também reduzir o tempo e baixar o custo global da análise (SILVA, COLLINS, 2011; TADEO et al., 2012).

Extração por líquido pressurizado (PLE), também conhecida por extração acelerada por solventes (ASE), extração assistida por micro-ondas (MAE) e extração assistida por ultrassom (UAE) são técnicas que podem ser utilizadas em vez da agitação mecânica ou extração por Soxhlet, pois são técnicas rápidas em comparação com as várias horas necessárias para extração de Soxhlet e/ou agitação e, por sua vez, muito menos solvente são utilizados (WILGA, KOT-WASIK, NAMIESNIK, 2008; TADEO et al., 2010; SILVA, COLLINS, 2011; TADEO et al., 2012).

Sequencialmente à extração da amostra segue a etapa de concentração e limpeza do analito e para isso uma das técnicas mais empregadas para análise de fluoroquinolonas em matrizes complexas é a extração em fase sólida (EFS) sendo também a micro extração em fase sólida (MSPD) uma técnica alternativa utilizada quando a EFS não apresenta resultados satisfatórios (YANG, J. et al, 2010; ZHOU, L. et al., 2011, TADEO et al., 2012, PAVLOVIC et al, 2012).

A extração em fase sólida (EFS) é uma técnica de separação líquido-sólido baseada nos mecanismos de separação da cromatografia líquida de baixa pressão. Do ponto de vista prático, a EFS comporta-se como uma cromatografia líquida empregando uma pequena coluna aberta, usualmente denominada de cartucho de extração, que contém a fase sólida (sorvente) (LANÇAS, 2009).

Diversos cartuchos, tais como o Lichrolute PT, C18, HLB, SAX, Strata-X, MCP, WCX tem sido utilizados para extrair antibióticos de estações de tratamento de águas, água de superfície, águas subterrâneas, esgoto, solos e sedimentos. Os cartuchos do tipo HLB são os mais amplamente utilizados devido à ampla gama de pH que podem suportar e sua característica de interação mista hidro/lipofílica compatível com os diversos tipos de antibióticos (WILGA, KOT-WASIK, NAMIESNIK, 2008; YANG, J. et al, 2010; ZHOU, L. et al., 2011, TADEO et al., 2012)

Além disso, métodos de SPE em conjunto (geralmente utilização de cartuchos tipo SAX e HLB) têm sido reportado quando o objetivo da análise é remover a matéria orgânica em excesso em um catucho (SAX) e reter os agentes antibacterianos de interesse em outro (HLB) para facilitar as análises (USLU et al., 2008). A Tabela 2 mostra uma revisão dos trabalhos presentes na literatura envolvendo métodos analíticos para determinação de fluoroquinolonas em matrizes ambientais sólidas utilizando procedimentos de EFS para limpeza e concentração das amostras.

Tabela 2. Métodos para determinação de fluoroquinolonas em diversas matrizes

Matriz	Método de extração	Cartucho de EFS	Rec %	Referência
Sedimento	MSPD	C ₁₈ e Florisil	29,8–100,9	PAVLOVIC et al, 2012
Solo	UAE	C ₁₈ e SAX	61-94	LI et al., 2011
Sedimento	UAE	SAX e Oasis HLB	102-193	ZHOU et al., 2011
Solo	UAE	SAX e Oasis HLB	61-100	USLU, M.Ö et al, 2008
Solo Sedimento	PLE	Oasis HLB	71-86 no solo 74-84 no sedimento	VAZQUEZ-ROIG et al, 2010
Sedimento	UAE	Oasis HLB	61.8–160.4	YANG et al, 2010
Sedimento	Agitação	Oasis HLB	33-128	KIM e CARLSON, 2007
Logo de esgoto Solo	PLE	MCP	75-94	GOLET et al, 2002
Solo	UAE	MISPE	75-85	TURIEL et al., 2007

3.4.2 Detecção da Amostra

Muitos métodos vêm sendo desenvolvidos para determinar antibióticos em várias matrizes (PENG, 2008). Geralmente a CLAE/UV, a CLAE/FL e CLAE/EM têm sido as técnicas analíticas mais citadas (SILVA; COLLINS, 2011).

A utilização da detecção por UV foi mais empregada nos primeiros trabalhos que envolveram a determinação de fluoroquinolonas, enquanto que a FL vem se destacando atualmente devido as propriedades fluorescentes das fluoroquinolonas, por apresentar maior seletividade e melhor a detectabilidade em relação ao detector de UV (PASCHOAL, 2007).

O detector de EM apresenta alta seletividade em relação aos outros detectores sendo normalmente usada em análises confirmatórias de identidade. No entanto, a difusão do seu emprego ainda é limitada pelo alto custo dos equipamentos (PASCHOAL, 2007).

As colunas analíticas mais usadas em técnicas cromatográficas de CLAE são as de fase reversa à base de sílica, funcionalizadas com grupos alquila principalmente octil (C₈) e octadecil (C₁₈). Devido aos grupos silanóis residuais e

impurezas metálicas dos materiais de recheio dessas colunas, as mesmas podem levar a problemas de assimetrias dos picos cromatográficos (efeito cauda). Aliado a esse fato tem-se que as fluoroquinolonas possuem caráter anfótero, o que prejudica a separação destes compostos nesse tipo de coluna (HERNANDEZ; SANCHO; GUERRERO, 2007).

Para tanto, métodos mais recentes de separação de fluoroquinolonas por CLAE têm feito uso de colunas capeadas ou de sílica de alta pureza, tais como Inertsil, Kromasil, Puresil, Versapack, Wakosil, L-column, Luna ou Zorbax RX, que são livres de traços metálicos responsáveis pelas propriedades ácidas dos grupos silanóis (HERNÁNDEZ-ARTESEROS et al, 2002; STOLKER; BRINKMAN, 2005).

A grande maioria dos métodos de CLAE, empregando fase estacionária reversa para determinação de fluoroquinolonas, faz uso de misturas para compor a fase móvel contendo acetonitrila (ACN) ou metanol (MeOH), ou uma mistura de ambos os solventes com soluções aquosas (PASCHOAL, 2007; SILVA; COLLINS, 2011).

Ainda com o objetivo de melhorar a simetria dos picos cromatográficos, agentes redutores de cauda do pico são adicionados. O pH geralmente é mantido em três ou muito próximo deste valor, para que haja uma redução da ionização de silanóis e minimizar suas interações com as fluoroquinolonas (HERNANDEZ; SANCHO; GUERRERO, 2007).

Embora soluções de tampão fosfato sejam as mais utilizadas para o ajuste de pH (RAMOS et al, 2003), outras soluções, tais como ácido cítrico (BAILAC et al, 2004), ácido fosfórico (ROUDAUT e YORKE, 2002) ou ácido oxálico (HERNÁNDEZ-ARTESEROS et al, 2002) são também usadas. A Tabela 3 apresenta várias condições cromatográficas utilizadas para análises por CLAE de algumas fluoroquinolonas.

Tabela 3. Condições chromatográficas estabelecidas por autores para detecção de fluoroquinolonas via CLAE

Método	Condições chromatográficas		Referência
	Coluna	Fase móvel, fluxo e *λ	
CLAE/FL	Apollo C ₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 µm), pré-coluna C ₁₈ (4,6 x 7,5 mm, 5 µm) á 40°C	0,04 M de tampão fosfato (pH=3,0)/ACN (82/18, v/v); fluxo de 1 mL·min ⁻¹ , λ _{exc} = 278 nm e λ _{ems} = 450 nm	CHOI et al, 2010
CLAE/FL	Synergi® Max-RP C ₁₂ (150 x 4,6 mm, 4 µm), pré-coluna LiChrospher® RP-8 C ₈ (10 x 4,6 mm, 5 µm) a 40°C	ácido orto-fosfórico (0,025 M)/MET/ACN (13/12/75, v/v) e pH = 3,0 ajustado com trietilamina; fluxo de 1 mL·min ⁻¹ , λ _{exc} = 278 nm e λ _{ems} = 450 nm	MUCHOHI et al, 2010
CLAE/UV	C ₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 µm)	ACN/ brometo de tetrabutilamônio 0,02M (8/92, v/v; pH=2,60); fluxo de 1 mL·min ⁻¹ , λ = 277 nm	QIAO; SUN, 2010
CLAE/FL	C ₁₈ (150 x 2,1 mm, 3,5 µm), pré-coluna Alltima C ₁₈ (7,5 x 2,1 mm, 5 µm)	ACN/MeOH/0,025M cloreto de tetrabutilamônio/ácido trifluoroáctico (75/25/899/1 e 150/50/799/1, v/v), fluxo de 0,25 mL·min ⁻¹ , λ _{exc} = 279 nm e λ _{ems} = 442 nm	SMET et al, 2008
CLAE/FL CLAE/EM	Zorbax SB-C ₈ (150 x 2,1 mm, 3,5 µm), pré-coluna SB-C ₈ (12,5 x 2,1 mm, 5 µm)	ACN/MeOH/ácido fórmico/H ₂ O (6/12/0,5/81,5, v/v), fluxo de 0,2 mL·min ⁻¹ , λ _{exc} = 278 nm e λ _{ems} = 445 nm	LEE et al, 2007
CLAE/FL	C ₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 5µm)	ACN/0,4% trietilamina ajustado para pH 2,5 com ácido fosfórico 85% (14/86, v/v) , fluxo de 1,2 mL·min ⁻¹ , λ _{exc} = 294 nm e λ _{ems} = 500 nm	GONZÁLEZ et al, 2006
CLAE/FL	C ₁₈ (250 x 4,6 mm, 5µm)	MeOH/ 5,0 mmol·L ⁻¹ de brometo de tetrabutil amônio (70/30, v/v) e pH 2,4 ajustado para por ácido fosfórico 0,01 mol·L ⁻¹ , fluxo de 1 mL·min ⁻¹ , λ _{exc} = 277 nm e λ _{ems} = 453 nm	GUO et al, 2005
CLAE/FL	Luna C ₁₈ , Phenomenex® (250 x 4,6 mm, partículas de 5 µm)	MeOH/tampão fosfato (NaHPO ₄ ·H ₂ O á 0,04 M pH 3 com H ₃ PO ₄ 85%), na proporção 30/70 (v/v), fluxo de 1 mL·min ⁻¹ , λ _{exc} = 280 nm e λ _{ems} = 450 nm	ARAUJO, 2013

*λ: comprimento de onda; λ_{exc}: comprimento de onda de excitação e λ_{ems}: comprimento de onda de emissão

3.5. Validação

A validação de um método analítico é definida como as várias etapas que um método deve ser submetido, para obter a sua qualificação e atender às exigências estabelecidas para seu uso. O objetivo de validar um procedimento analítico é demonstrar que está adequado ao que se propõem (BRITO, 2003).

Em geral, a validação avalia se o método é adequado para a proposta dentro de um intervalo de concentração e materiais teste aos quais será aplicado. Resultados analíticos não confiáveis não só podem ser contestados, mas também podem levar a equívocos legais ou a tratamentos incorretos de pacientes (PETERS; MAURER, 2002).

É essencial que os estudos de validação sejam representativos e conduzidos de modo que a variação de faixa de concentração e os tipos de amostras sejam adequados (PETERS; MAURER, 2002).

Os órgãos United States Pharmacopoeia (USP), International Conference on Harmonisation (ICH), Food and Drug Administration (FDA), Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro), definem quais os parâmetros devem ser avaliados e seus critérios de aceitação de acordo com objetivos do método. O tabela 4 demonstra alguns parâmetros recomendados por órgãos, como guias ou resoluções.

Tabela 4. Parâmetros de validação segundo USP, ICH, FDA, Anvisa e Inmetro.

USP	ICH	FDA	Anvisa	Inmetro
Especificidade	Especificidade	Especificidade	Especificidad e/ Seletividade	Especificidade/ Seletividade
Exatidão	Exatidão	Exatidão	Faixa de trabalho	Faixa de trabalho
Precisão Repetitividade Precisão intermediária Reprodutividade	Precisão Repetitividade Precisão intermediária Reprodutividade	Precisão Repetitividade Precisão intermediária Reprodutividade	Linearidade	Linearidade
Limite de Detecção	Limite de Detecção	Limite de Detecção	-	Curva de calibração
Limite de Quantificação	Limite de Quantificação	Limite de Quantificação	Limite de detecção	Limite de detecção
Linearidade	Linearidade	Linearidade	Limite de Quantificação	Limite de Quantificação

Robustez	Robustez	Robustez	Sensibilidade	-
Faixa de trabalho	Faixa de trabalho	Faixa de trabalho	Exatidão	Exatidão
-	-	Sensibilidade	Precisão Repetitividade Precisão intermediária Reprodutividade	Precisão Repetitividade Precisão intermediária Reprodutividade
-	-	Recuperação	Robustez	Robustez
-	-	Estabilidade	Incerteza de medição	-
-	-	<i>System suitability</i>	-	-

A validação total deve ser desenvolvida quando é implementado um método novo, todavia a validação parcial pode ser aplicada em casos em que o método originalmente validado foi modificado. Tais modificações podem incluir, entre outras, transferências entre laboratórios, mudanças de equipamento ou software, mudanças na matriz em que será analisado o analito (SHAH et al., 2000).

Segundo Brito (2003), os critérios a serem aplicados para validação de determinado método depende da sua natureza e propósito. Um método para um determinado analito requer um critério de aceitação e uma abordagem diferente de um método desenvolvido para outro analito.

Usa-se a distinção entre método "novo", "padrão" e "modificado" para caracterizar sua natureza. Método padrão, nessa definição, é o método completamente validado (com todos os parâmetros estabelecidos). Com relação ao propósito do método, os mesmos são classificados em qualitativo, quando destinados apenas a acusar a presença do analito, e quantitativos, podendo ser para análise traços ou componente majoritário na matriz de interesse. A validação requerida para tais métodos está resumida nos tabela 5 e 6 (BRITO, 2003).

Tabela 5. Parâmetros de validação quanto à natureza.

Método	Precisão	Exatidão	LD	LQ	Linearidade	Especificidade
Novo	▲	▲	▲	●	●	▲
Padrão	▲	▲	▲	●	●	■
Modificado	▲	▲	▲	●	■	■

LD: Limite de Detecção, LQ: Limite de Quantificação.

▲ Sempre, ● Se relevante, ■ Não necessário.

Tabela 6. Parâmetros de validação quanto ao propósito.

Método	Precisão	Exatidão	LD	LQ	Linearidade	Especificidade
Identificação	■	■	▲	■	■	▲
Dosagem do p.a.	▲	▲	■	■	▲	▲
Dosagem de impurezas	▲	▲	■	▲	▲	▲

LD: Limite de Detecção, LQ: Limite de Quantificação, p.a.: princípio ativo.

▲ Sempre, ■ Não necessário.

3.6 Local de Estudo

A Bacia Hidrográfica do Rio Paciência localiza-se no Brasil, estado do Maranhão, na porção nordeste da ilha do Maranhão (Figura 4). O rio Paciência nasce na chapada do Tirirical e desemboca na baía de São Marcos, no golfão maranhense. É o principal curso d'água que banha a zona leste da ilha do Maranhão, possuindo 27,3 Km de extensão e uma área de 143,7 Km². Distribui-se pelos quatro municípios integrantes da ilha: São Luis, São José de Ribamar, Paço do Lumiar e Raposa. A área restrita a este trabalho é uma parte do grande estuário (estuário médio) que se encontra situada dentro do município de Paço do Lumiar (MENDES FILHO, 2009; IMESC, 2011).

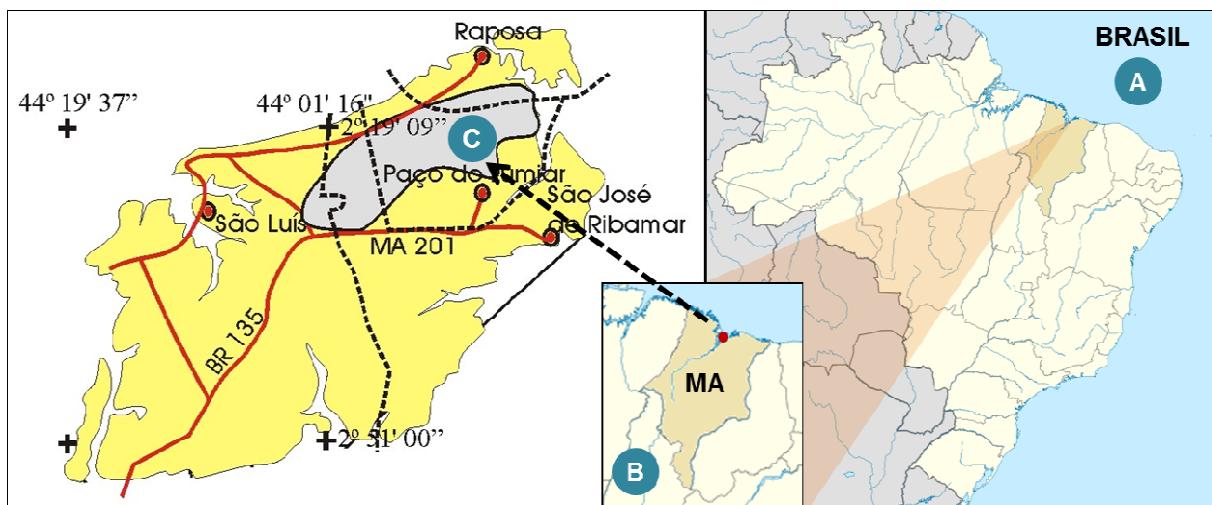


Figura 4. Localização da bacia do rio Paciência na ilha do Maranhão/Maranhão/Brasil

A entrada de água doce no estuário em estudo resulta do fluxo do manguezal e dos afluentes Saramantha e Miritiua (maiores e principais formadores

da bacia), rio Itapiracó, riacho Gangan, igarapé Cumbique, igarapé São Bernardo, igarapé da Cohab e igarapé do Cohatrac. Além desses fluxos conta-se com a precipitação pluviométrica local, todavia, os processos dinâmicos de águas subterrâneas locais também podem influenciar nas características físico-químicas desse estuário durante os ciclos das marés (MENDES FILHO, 2009).

Nas ultimas décadas, a bacia do Rio Paciência foi extremamente agredida pelo grande crescimento populacional acarretando sérios problemas de degradação ambiental implicando no gradativo desaparecimento do leito deste rio e seus afluentes. O leito do rio Paciência é receptor de grande quantidade de efluentes oriundos dos esgotos domésticos *in natura* provenientes de todos os conjuntos habitacionais e residenciais implantados na área do entorno da bacia (IMESC, 2011). Outro problema ambiental configurado dentro da bacia do rio Paciência é a presença de lixões a céu aberto que recebem os resíduos sólidos do município de Paço do Lumiar (IMESC, 2011). Apesar da grande poluição, o Rio Paciência é carente de estudos e iniciativas para minimizar a devastação que vem sofrendo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

As etapas de otimização e validação do método para a detecção dos três antibacterianos fluoroquinolônicos em amostras de sedimento estuarino foram realizadas no laboratório do Grupo de Estudos Ambientais (GEA) do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão (IFMA), em parceria com o laboratório do Grupo de Pesquisa em Biogeoquímica de Poluentes (GPBP) da mesma instituição.

4.1. Padrões, Solventes e Reagentes

Os padrões utilizados foram cedidos pelo GEA do IFMA. Conforme apresentado na Tabela 7, eles foram das marcas Fluka® e Sigma®, ambos da Sigma Aldrich®, com pureza mínima de 98%, tendo sido adquiridos em estado sólido, sob forma de pó ou de pequenos cristais amarelados.

Tabela 7. Padrões utilizados no desenvolvimento do estudo

Padrões	Fabricante	Pureza	CAS
Cloreto de Ciprofloxacino monohidratado	Fluka®	≥ 98,0%	86393-32-0
Levofloxacino	Sigma®	≥ 98,0%	100986-85-4
Norfloxacino	Fluka®	≥ 98,0%	70458-96-7

Todos os solventes orgânicos grau HPLC utilizados (metanol, acetonitrila e diclorometano) foram da Merck (Darmstadt, Alemanha) e todos os demais reagente grau padrão analítico empregados (nitrato de magnésio hexahidratado, hidróxido de amônio, ácido orto fosfórico, ácido fórmico, fosfato de sódio monobásico, fosfato de potássio monobásico, EDTA dissódico, ácido cítrico, citrato de sódio) foram da Isofar (Rio de Janeiro, Brasil). A água ultrapura utilizada foi obtida através de sistemas Milli-Q da Merck Millipore (Darmstadt, Alemanha).

Deve-se ressaltar que todas as vidrarias utilizadas para manuseio dos padrões, reagentes, solventes e soluções foram previamente lavadas com solução de Extran® alcalino 5% e depois enxaguados com água potável, água destilada e ambientados com o solvente apropriado, respectivamente.

4.2 Preparo e Armazenamento de Soluções Estoque e Soluções de Trabalho

Partindo dos compostos sólidos dos padrões dos antibacterianos fluoroquinolónicos em estudo, foram preparadas soluções estoque de 100 mg.L^{-1} de cada analito. O CIPRO e o LEVO foram diluídos em metanol e o NORF em acetonitrila. As soluções estoque foram armazenadas em frasco âmbar sob refrigeração, ao abrigo de luz em temperatura de 4°C e renovadas a cada 30 dias, segundo recomendações de Leal et al. (2012).

Para o preparo das soluções de trabalho, partiu-se primeiramente da mistura de alíquotas iguais das diferentes soluções padrão e em seguida, diluiu-se esta mistura com a fase móvel escolhida para análise, como representado na Figura 5. Todas as soluções de trabalho foram armazenadas em frasco âmbar e renovadas diariamente.

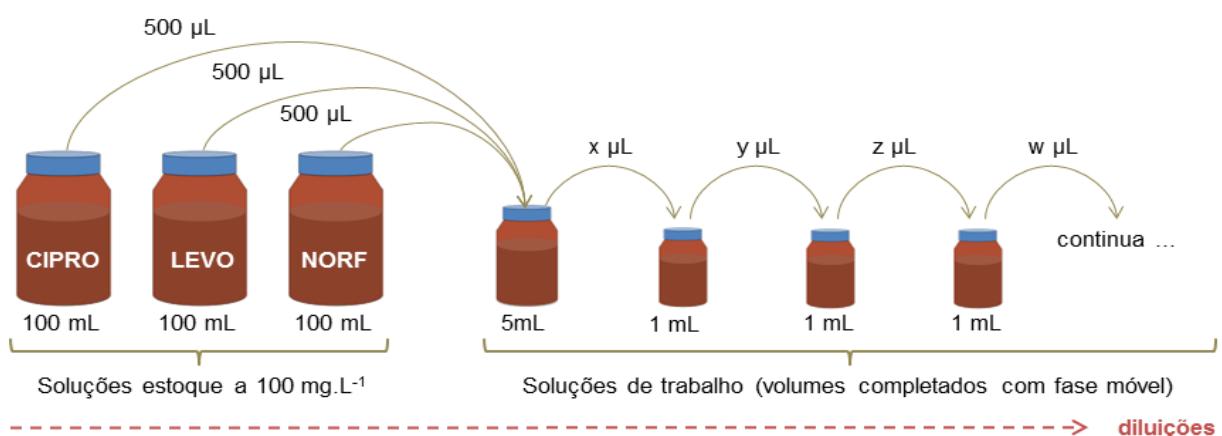


Figura 5. Soluções estoque e soluções de trabalho.

4.3 Amostra testemunha de sedimento estuarino

Para a otimização da metodologia analítica deste estudo, foi utilizada amostra controle de sedimento coletada no estuário do rio Tibiri o qual fica localizado na porção sudoeste da Ilha do Maranhão.

Após coletada, a amostra de sedimento foi congelada, liofilizada, peneirada (peneira de 2,0 mm) e mantida a temperatura ambiente e ao abrigo de luz. A tabela 8 descreve os parâmetros físico-químicos da amostra utilizada neste estudo.

Tabela 8. Características físico-químicas da amostra controle de sedimento.

Parâmetro	Valor
pH	7,9
CTC* (cmol _c .Kg ⁻¹)	28,4
MO* (%)	16,3
Silt (%)	59
Argila (%)	40

*CTC = Capacidade de troca catiônica; MO = Matéria orgânica.

4.4 Equipamento de Cromatografia a Líquido (CL)

O sistema cromatográfico de CL usado pertencente à marca Shimadzu® LC 20AT Prominence, do modelo DGU-20A com duas bombas de alta pressão acopladas a um detector de fluorescência, modelo RF-10AXL também da Shimadzu®, e injetor com capacidade de 20 µL. Para o controle do equipamento e obtenção dos dados, fez-se uso de um microcomputador e do software LCsolution® da Shimadzu.

4.5 Otimização das Condições Cromatográficas

Os ensaios para a otimização e validação da metodologia deste trabalho foram realizadas segundo critérios estabelecidos nos estudos de Araujo (2013) (Tabela 9).

Tabela 9. Condições analíticas otimizadas por Araujo (2013)

Parâmetro	Condições
Coluna	Luna C ₁₈ , Phenomenex® (250 x 4,6 mm, partículas de 5 µm)
Fase móvel	MeOH/tampão fosfato (NaHPO ₄ .H ₂ O á 0,04 M pH 3 com H ₃ PO ₄ 85%), na proporção 30/70 (v/v)
Vazão	1 mL.min ⁻¹
λ _{exc} e λ _{ems}	280 nm e 450nm

4.6 Extração das amostras de sedimento

O procedimento de extração de amostras de sedimentos consistiu em duas etapas (a) extração dos antibióticos do sedimento por ultrasonicação e (b) limpeza e enriquecimento (purificação) do extrato por extração em fase sólida (EFS).

Diferentes condições experimentais foram testadas a fim de se otimizar uma extração simultânea dos três antibióticos (CIP, LEV e NOR) a partir do sedimento como representado na Tabela 10.

Tabela 10. Procedimentos de extração propostos para uso no método

Parâmetros	Método 1*	Método 2**	Método 3***	Método 4***
Solução extratora	Tampão fosfato 0,2 M (pH 3,0) e metanol 50:50 (v/v)	Tampão citrato 0,2 M (pH 4,0) e acetonitrila 50:50 (v/v)	Solução aquosa de Mg(NO ₃) ₂ (29%, p/v), e amônia 4%	Solução aquosa de Mg(NO ₃) ₂ (29%, p/v), e amônia 4%
Volume (mL)	10	10	10	10
Nº de ciclos	3	3	3	1
Tempo (min)	15	15	15	30
Etapa EFS	Sim	Sim	Sim	Não

*Adaptado de Uslu et al, 2008, **Adaptado de Yang et al, 2010, ***Adaptado de Turiel, 2006.

Para cada método, amostras de sedimento (1 g cada) foram pesados, em duplicata, em tubos de Falcon e fortificadas com 200 uL de solução de trabalho mista dos padrões (1,0 mg.L⁻¹) sendo em seguida mantidos no escuro a 4°C durante uma noite para a evaporação completa do solvente. Depois de realizada as etapa descrita na tabela 10 para cada método, os extrato das amostras foram centrifugadas a 3000 rpm a 25°C e os sobrenadantes obtidos combinados e transferidos para frasco âmbar de 250 mL antes de proceder a etapa de purificação por EFS. Apenas o método 4 não seguiu para a etapa de purificação sendo seu extrato apenas filtrado através de membrana de nylon 0,22 µm (Chrom Tech, Minnesota, EUA) para remoção de partículas antes da análise por CLAE/FL.

4.7 Purificação das amostras de sedimento

Extratos aquosos das amostras de sedimento foram limpos e enriquecidos por meio de cartuchos Oasis HLB (60 mg, 3 mL, Waters, EUA). Antes da EFS, os extratos combinados foram diluídos até 200 mL com água Milli-Q. Os cartuchos Oasis HLB foram tratados segundo metodologia descrita por Araujo (2013), ou seja, foram pré-condicionados com 5 mL de diclorometano, 5 ml de metanol e 10 ml de água Milli-Q ajustada com H₃PO₄ a pH 3, sucessivamente. Posteriormente, os extratos aquosos de sedimentos percolaram os cartuchos na

vazão de 1 mL·min⁻¹. Depois de todos os extratos terem sido completamente percolados, cada cartucho foi lavado com 10 ml de solução de água Milli-Q ajustada com H₃PO₄ a pH 3 à 5% de metanol (v/v) para remover as impurezas fracamente ligadas ao sorvente. Antes da eluição, os cartuchos foram secos durante 0,5 horas sob vácuo. A eluição dos antibióticos a partir dos cartuchos foi feita com 6 mL de solução metanólica à 2% de ácido fórmico (v/v) (ARAUJO, 2013). Os eluatos contendo os compostos alvos foram evaporados quase até à secura sob corrente suave de argônio, e dissolvida novamente com 1 mL de fase móvel seguida por filtração através de membrana de nylon 0,22 µm (Chrom Tech, Minnesota, EUA) para remoção de partículas antes da análise por CLAE/FL.

4.8 Validação do método otimizado

4.8.1 Seletividade

A seletividade do método foi verificada pela análise de possíveis interferentes experimentais nos mesmo tempos de retenção (t_R) das fluoroquinolonas em estudo. Desta forma, comparou-se cromatogramas provenientes após realização do procedimento de extração e purificação do branco da matriz (sedimento) e da matriz fortificada com os analitos (AMARANTE Jr et al., 2001; BRITO et al., 2003).

4.8.2 Linearidade

No estudo de linearidade foi avaliado se a faixa de trabalho usada apresentava-se linear para as fluoroquinolonas estudadas. Para isso, foram preparadas triplicadas de seis níveis de concentração (20, 25, 50, 100, 200 e 500 µg·kg⁻¹). Cada curva analítica foi construída através da relação entre o sinal analítico apresentado e a concentração da substância de interesse. Os valores desta razão foram usados para obter a equação de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. O coeficiente de correlação quadrado (r^2) foi utilizado para avaliar a adequação da representação do modelo matemático expresso pela equação de reta. Um valor de r^2 maior que 0,995 foi requerido para considerar o modelo linear

(AMARANTE Jr et al., 2001; BRITO et al., 2003; RIBANI et al., 2004; LANÇAS, 2009).

4.8.3 Exatidão

A exatidão foi avaliada a partir de ensaios de recuperação utilizando o método de extração proposto neste trabalho para as três fluoroquinolonas. Para a realização dos processos de recuperação, foram adicionadas alíquotas de solução de trabalho mista que possuíam CIP, LEV e NOR em amostras de sedimento em três níveis de fortificação: 20; 200 e 500 µg.kg⁻¹. No mínimo cinco análises foram realizadas para cada um dos três níveis de fortificação estudados. O percentual de recuperação foi calculado através da relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente (AMARANTE Jr et al., 2001; BRITO et al., 2003; RIBANI et al., 2004; LANÇAS, 2009).

4.8.4 Precisão

A precisão foi determinada em níveis de repetibilidade a partir da análise de três níveis de concentração (20; 200 e 500 µg.kg⁻¹) com no mínimo cinco análises cada, no mesmo dia e nas mesmas condições experimentais. Os resultados foram expressos através da estimativa do desvio padrão relativo (DPR, %) (AMARANTE Jr et al., 2001; BRITO et al., 2003; RIBANI et al., 2004; LANÇAS, 2009).

4.8.5 Limites de detecção e de quantificação

Os Limites de Detecção e Quantificação Instrumental (LDI e LQI) foram estabelecidos a partir do branco da matriz (sedimento). O desvio padrão foi obtido injetando-se no mínimo cinco vezes o branco da amostra para posterior aplicação nas equações (1 e 2) correspondentes ao LDI e LQI, respectivamente (AMARANTE Jr et al., 2001; BRITO et al., 2003).

$$LDI = \frac{3 \times s}{S} \quad \text{equação (1)}$$

$$LQI = \frac{10 \times s}{S} \quad \text{equação (2)}$$

Onde: s = desvio padrão do branco e S = coeficiente angular da curva analítica.

Para a determinação do LD do método utilizou-se dados obtidos do branco da matriz e dos parâmetros da curva analítica, e estimou-se conforme estabelece a seguinte equação (AMARANTE Jr et al., 2001; BRITO et al., 2003):

$$LD = \frac{2 \times t_{n,95\%} \times S_{com}}{S} \quad \text{equação (3)}$$

Onde: $t_{n,95\%}$ = valor tabelado em função de n (número de análises); S = coeficiente angular da curva de calibração, e s_{com} = desvio padrão combinado das recuperações e desvio padrão do menor nível de fortificação, calculado através da equação 4.

$$S_{com} = \sqrt{\frac{(m-1)S_A^2 + (n-1)S_B^2}{m+n-2}} \quad \text{equação (4)}$$

Na qual, m = número de determinações do menor nível de fortificação; n = número de determinações do branco; S_A = desvio-padrão da amostra do menor nível de fortificação, e S_B = desvio-padrão do branco.

Já o LQ do método foi estabelecido como sendo o menor nível de fortificação com níveis aceitáveis de precisão e exatidão (AMARANTE Jr et al., 2001; BRITO et al., 2003; RIBANI et al., 2004).

4.9 Coleta, transporte e acondicionamento das amostras reais

As amostras de sedimento estuarino foram coletadas em agosto de 2014 em seis pontos da bacia do rio Paciência localizada na porção nordeste da Ilha do Maranhão em horário de maré baixa, momento que o mangue esteve exposto, com espaçamento de aproximadamente 21 m entre as coletas. O mapa da região da bacia do rio Paciência com a identificação dos pontos de amostragem está apresentado na Figura 6.



Figura 6. Pontos de amostragem ao longo da bacia do rio Paciência.

Após coletada, as amostras foram acondicionadas em sacos de polietileno, identificadas e transportadas sob arrefecimento para o laboratório. No laboratório foram congeladas em freezer a -18°C, liofilizadas, peneiradas (peneira de 2,0 mm) e armazenadas em frascos âmbar a temperatura ambiente e ao abrigo de luz até o momento da análise (YANG et al., 2010). A tabela 11 descreve os parâmetros físico-químicos das amostras utilizadas neste estudo.

Tabela 11. Características físico-químicas das amostras de sedimento da bacia do rio Paciência

Local	pH	*CTC _{efetiva} (cmolc.kg ⁻¹)	*CO (%)	*MO (g/dm ³)	Silt (%)	Argila (%)
Ponto 1	6,30	17,6	1,24	66	59	40
Ponto 2	6,90	19,8	1,31	70	64	36
Ponto 3	7,40	19,8	2,40	53	61	38
Ponto 4	7,20	22,0	2,50	69	60	40
Ponto 5	7,71	24,4	1,24	74	62	38
Ponto 6	7,91	22,0	1,50	69	61	37

*CTC = Capacidade de troca catiônica; CO = Carbono orgânico; MO = Matéria orgânica.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Otimização do procedimento de extração

A extração das fluoroquinolonas a partir de amostras ambientais sólidas requer a aplicação de condições exaustivas de extração para isolar os analitos de interesse, uma vez que estes compostos ligam-se firmemente a esta matriz (TOLLS, 2001; USLU et al., 2008; LEAL et al., 2012). Sendo assim, optou-se por otimizar uma técnica de extração assistida por ultrassom (UAE) para isolar as fluoroquinolonas CIP, LEV e NOR de amostras de sedimento estuarino, já que a mesma apresenta procedimento simples (sonicação seguida de centrifugação), fácil obtenção do equipamento, baixo custo e utiliza pouco solvente extrator (BLACKWELL, et al., 2004; TURIEL; MARTÍN-ESTEBAN; TADEO, 2006; TADEO et al., 2010; CARVALHO et al., 2013).

Como os compostos fluoroquinolônicos apresentam propriedades anfóteras devido a presença de dois grupos funcionais ionizáveis de relevância ambiental em sua estrutura, o grupo carboxílico ($pK_a \sim 6$) e o grupo amina ($pK_a \sim 8$) (PICÓ; ANDREU, 2007; LEYVA; LEYVA, 2008), diferentes misturas de soluções extratoras em pH ácido e básico foram avaliados a fim de encontrar uma solução adequada para a extração dos três antibióticos das amostras de sedimento. Os resultados destas experiências estão resumidos na Figura 7.

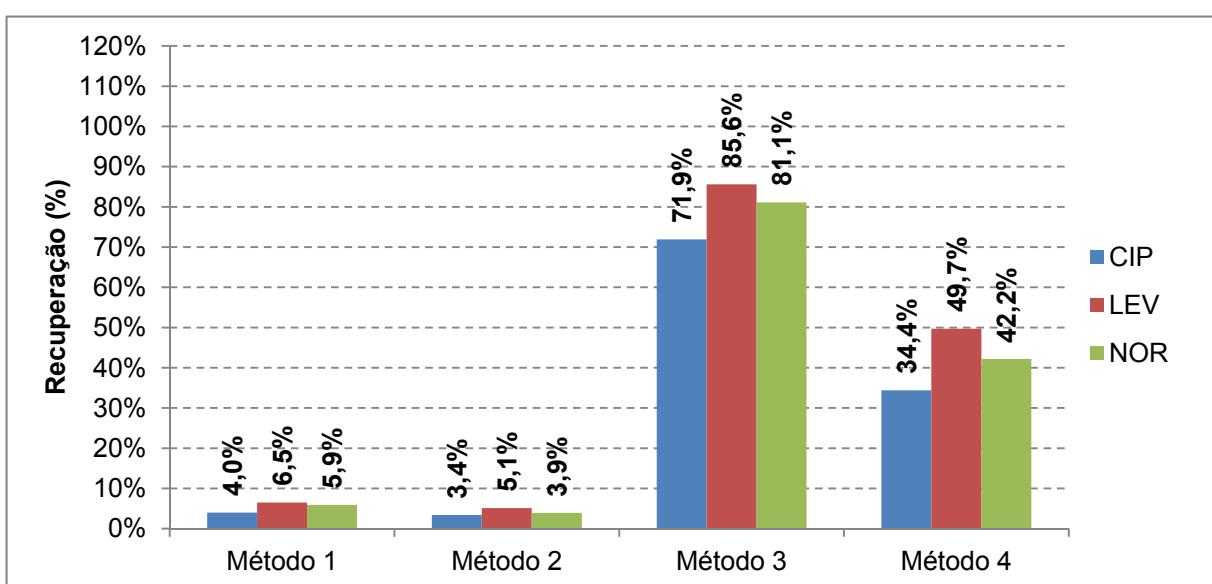


Figura 7. Comparaçao dos valores de extração do CIP, LEV e NOR, frente aos quatro procedimentos de extração

Diferentemente do que é preconizado na maioria dos trabalhos envolvendo a extração de antibióticos fluoroquinolonicos de matrizes ambientais sólidas, a qual expõe que a extração destes compostos melhora quando se realiza a pHs ácidos (GOLET et al., 2002; KIM; CARLSON, 2007; MARTÍNEZ-CARBALLO et al., 2007; USLU et al., 2008; YANG et al., 2010; ZHOU et al., 2011; DORIVAL-GARCÍA et al., 2013), pode-se concluir que, em geral, as fluoroquinolonas foram melhor extraídas do sedimento através da utilização de solução básica (TURIEL; MARTÍN-ESTEBAN; TADEO, 2006).

Visto que as fluoroquinolonas apresentam alta solubilidade em água e baixos valores de coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}) (TOLLS, 2001; PICÓ; ANDREU, 2007; LEYVA; LEYVA, 2008), provavelmente devido à presença de muitos grupos funcionais ionizáveis, elas são melhores solubilizadas em solventes mais polares, fato evidenciado pelos processos de extração 3 e 4 a qual não utilizaram misturas extratora de polaridades diferentes como os utilizados no método 1 (metanol) e 2 (acetonitrila).

O mecanismo envolvido nesta extração é baseado na formação do complexo antibiótico/cátion metálico, a qual é formado devido à utilização de 4% de amônia na solução extratora que torna o pH final da mesma básico (aproximadamente 8,1), valor onde há predomínio de espécies aniônicas das fluoroquinolonas, que sofrem repulsão eletrostática pelo complexo de troca do sedimento também carregado negativamente, possibilitando assim a formação de complexos estáveis entre a forma aniônica das fluoroquinolonas solubilizadas e os cátions metálicos de Mg (II) abundante na solução extratora (PARK et al., 2000; PARK; KIM; BARK, 2002; TURIEL; MARTÍN-ESTEBAN; TADEO, 2006).

Pode-se observar também que um único ciclo de extração de 30 minutos não foi suficiente para obterem-se boas recuperações. Recuperações maiores foram melhor alcançadas aumentando o número de ciclos de extração e associando a etapa de purificação por EFS com utilização de cartuchos Oasis HLB, pois como as concentrações dos antibióticos avaliados foram muito baixos, e a capacidade de troca catiônica efetiva e quantidade de matéria orgânica presente nas amostras de sedimento foram relativamente altas, mais exaustivo tornou-se o processo de extração para conseguir dessorver os antibióticos do sedimento. Logo o método 3 mostrou-se o mais adequado para extrair simultaneamente os três antibióticos a partir do sedimento.

5.2 Validação do método

Com o intuito de garantir a confiabilidade dos resultados analíticos algumas figuras de mérito foram determinadas visando garantir o sucesso da utilização da metodologia proposta, além de detectar erros de procedimento analítico e oferecer evidências comprovadas da eficiência do método.

A seletividade do método foi avaliada por meio da comparação dos cromatogramas obtidos, nas mesmas condições cromatográficas, do extrato do branco da matriz (amostra testemunha) e do extrato da matriz fortificado com as fluoroquinolonas, para a verificação da presença de algum interferente da matriz nos mesmos tempos de retenção dos analitos. Este procedimento foi necessário para averiguar se alterava ou não o método proposto de extração. A sobreposição dos cromatogramas está apresentada na Figura 8.

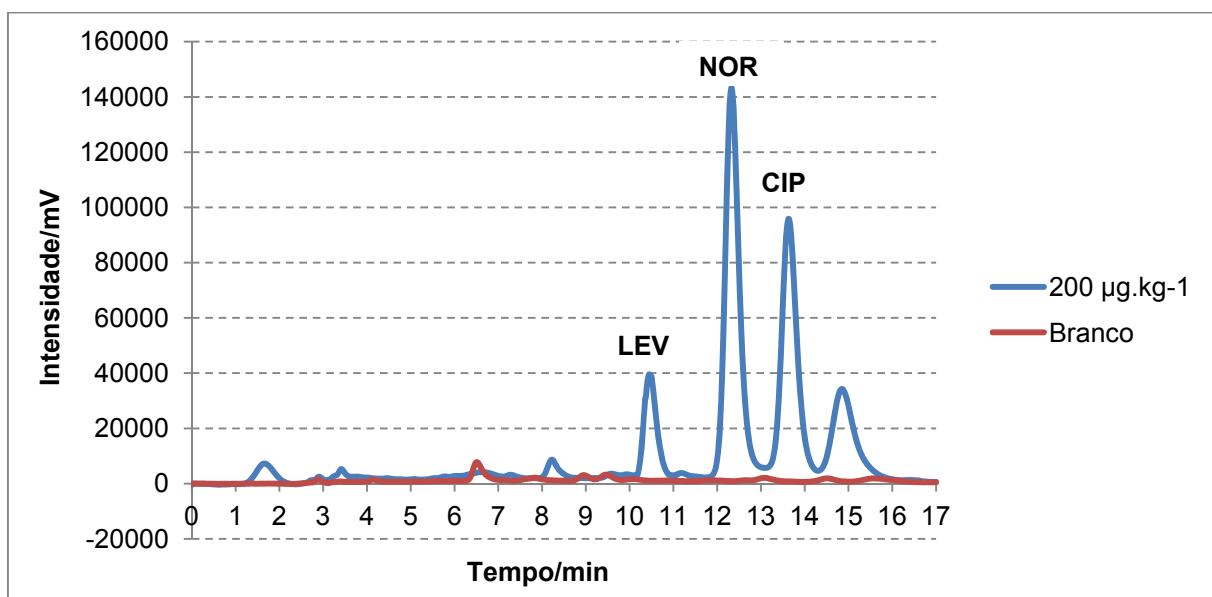


Figura 8. Cromatogramas obtidos a partir da extração (método3) do branco da matriz (vermelho) e da matriz fortificada com CIP, LEV e NOR na concentração de $200 \mu\text{g}.\text{kg}^{-1}$ (azul) com detecção por CLAE/FL.

Através da sobreposição dos cromatogramas observou-se que não houve interferentes que pudesse prejudicar a quantificação das fluoroquinolonas, pois a presença de co-extrativos provenientes da matriz não eluiram nos mesmos tempos de retenção dos analitos em estudo. Portanto, o método mostrou-se seletivo para análise dos antibióticos em amostras de sedimento (AMARANTE Jr et al., 2001; BRITO et al., 2003).

As curvas analíticas para as três fluoroquinolonas (Figura 9) mostraram-se linear ao longo da faixa de trabalho estudada, apresentando coeficientes de correlação (r^2) satisfatórios uma vez que foram obtidos valores maiores que 0,995 para o CIP, LEV e NOR, ou seja, correlação fortíssima (ANVISA, 2003; BRITO et al., 2003; INMETRO, 2010). Os dados das curvas analíticas estão simplificados na Tabela 12.

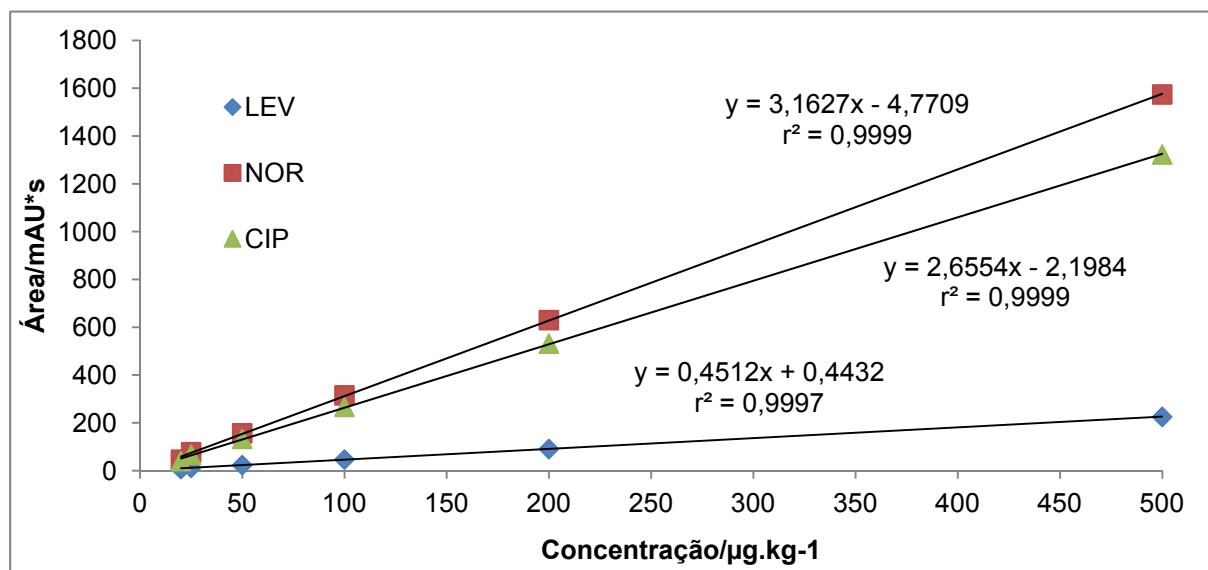


Figura 9. Curvas analíticas para os compostos CIP, LEV e NOR. Condições cromatográficas: coluna Luna (250 x 4,6 mm; 5 µm), fase móvel MeOH/tampão fosfato ($\text{NaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,04 M ajustado à pH 3 com H_3PO_4 85%), na proporção 30/70 (v/v), modo isocrático, fluxo de 1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{ems}} = 450 \text{ nm}$

Tabela 12. Padrões utilizados no desenvolvimento do estudo

Analito	t_r (min)	Faixa de trabalho ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	Equação da reta	* r^2
LEV	10,4	20–500	$y = 0,4512x + 0,4432$	0,9997
NOR	12,3	20–500	$y = 3,1627x - 4,7709$	0,9999
CIP	13,6	20–500	$y = 2,6554x - 2,1984$	0,9999

* r^2 = coeficientes de correlação das retas.

Para avaliar a exatidão do método foram realizados ensaios de recuperações em três níveis de fortificação e, para cada nível, efetuadas cinco determinações. Os percentuais de recuperação médios dos analitos estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Recuperações percentuais e coeficiente de variação dos compostos analisados por CLAE/FL

Analito	*C ($\mu\text{g}.\text{kg}^{-1}$)	*Rec (%) \pm DP	*CV(%)
CIP	20	76,67 \pm 6,74	8,79
	200	73,73 \pm 3,14	4,26
	500	76,43 \pm 2,75	3,60
LEV	20	85,73 \pm 2,15	2,51
	200	88,85 \pm 3,52	3,96
	500	87,64 \pm 5,76	6,57
NOR	20	81,52 \pm 3,84	4,71
	200	82,85 \pm 2,17	2,62
	500	85,63 \pm 5,56	6,49

*C = concentração; Rec = recuperação; CV = coeficiente de variação.

O método no geral foi considerado exato uma vez que apresentou recuperações compreendidas na faixa entre 70 e 120%, estabelecida pela literatura para análise de resíduos e seus valores se repetiram em todas as amostras, evidenciando a consistência do método (AMARANTE Jr et al., 2001; BRITO et al., 2003; RIBANI et al., 2004).

Para o estudo de precisão, cujos resultados estão expressos na Tabela 4, os coeficientes de variação (CV%) foram considerados adequados, pois se encontram dentro dos limites recomendados para análise de resíduos ($\leq 20\%$), indicando que o método desenvolvido é preciso dentro da faixa de concentração e das condições adotadas (AMARANTE Jr et al., 2001; BRITO et al., 2003; RIBANI et al., 2004; INMETRO, 2010).

Os valores de LDI, LQI, LD e LQ estão representados na tabela 14. Os valores reportados foram considerados satisfatórios, principalmente para o propósito do método, a qual avalia resíduos de antibióticos em amostras de complexas com o sedimento de rio, demonstrando assim a sensibilidade da metodologia para baixas concentrações dos fármacos (AMARANTE Jr et al., 2001; BRITO et al., 2003; RIBANI et al., 2004).

Tabela 14. Valores de LD e LQ para as três fluoroquinolonas investigadas

Analito	*LDI ($\mu\text{g}.\text{kg}^{-1}$)	*LQI ($\mu\text{g}.\text{kg}^{-1}$)	*LD ($\mu\text{g}.\text{kg}^{-1}$)	*LQ ($\mu\text{g}.\text{kg}^{-1}$)
CIP	1,105	3,685	9,32	20

LEV	3,33	11,1	17,78	20
NOR	0,26	0,867	4,42	20

*LDI = Limite de detecção instrumental; LQI = Limite de quantificação instrumental; LD = Limite de detecção; LQ = Limite de quantificação.

5.3 Ocorrência de Fluoroquinolonas em sedimento do rio Paciência

O sedimento é um compartimento ambiental que apresenta grande capacidade de acumular vários tipos de poluentes, dentre eles os fármacos, o que o torna um verdadeiro testemunho dos impactos ambientais sofridos pelos ecossistemas aquáticos ao longo do tempo (VAZQUEZ-ROIG et al., 2010; YANG et al., 2010; ZHOU et al., 2011)

Para avaliar a ocorrência de fluoroquinolonas em amostras de sedimento estuarino, seis pontos foram coletados ao longo na bacia do rio Paciência localizados na região nordeste da ilha do Maranhão. As concentrações encontradas nos sedimentos analisados estão apresentadas na Tabela 15.

Tabela 15. Concentrações das três fluoroquinolonas investigadas no rio Paciência

Localização	CIP ($\mu\text{g}.\text{kg}^{-1}$) \pm DP	LEV ($\mu\text{g}.\text{kg}^{-1}$) \pm DP	NOR ($\mu\text{g}.\text{kg}^{-1}$) \pm DP
Ponto 1	60,08 \pm 5,56	n.d	n.d
Ponto 2	n.d	n.d	n.d
Ponto 3	70,45 \pm 4,81	n.d	n.d
Ponto 4	n.d	n.d	n.d
Ponto 5	56,55 \pm 4,45	n.d	n.d
Ponto 6	n.d	n.d	n.d

n.d = não detectado.

Dos três antibióticos pesquisados apenas um, o ciprofloxacino, foi detectado em três dos seis pontos analisados. Uma vez que o ciprofloxacino é o antibiótico da classe das fluoroquinolonas mais prescritos no mundo, não é de se estranhar a presença deste em relação aos outros analitos estudados.

Como ao redor da bacia do rio Paciência ocorre ampla descarga de efluentes de esgotos domésticos não tratados provenientes das regiões dos povoados localizados no entorno desta bacia (São Luís, Raposa, Paço do Lumiar e São José de Ribamar) (IMESC, 2011), esta se torna, então a provável via de

contaminação do sedimento dessa região por resíduos do fármaco detectado. Vale ressaltar também que as regiões onde foram encontrados os resíduos de ciprofloxacino encontram-se localizadas próximo aos povoados da região da Raposa e do Paço do Lumiar.

Dados da literatura referente à contaminação de sedimentos por fluoroquinolonas reportam a mesma via de entrada e nível de contaminação semelhante ou até mais elevados (VAZQUEZ-ROIG et al., 2010; YANG et al., 2010; ZHOU et al., 2011). A tabela 16 apresenta um comparativo entre as concentrações encontradas de fluoroquinolonas em outros sedimentos ao redor do mundo.

Tabela 16. Concentrações de fluoroquinolonas encontradas em outras regiões

Região	FQ	Concentração	Referência
Valênciia, Espanha	CIP	5,95 ng.g ⁻¹	Vazquez-Roig et al, 2010
Rio Pearl, China	CIP NOR	9,02 – 197 µg.Kg ⁻¹ 19,2 – 1120 µg.Kg ⁻¹	Yang et al, 2010
Rios Yellow, Hai e Liao, China	CIP NOR	32.8, 1290, 28.7 ng.g ⁻¹ 141, 5770, 176 ng.g ⁻¹	Zhou et al, 2011
Lago Baiyangdian, China	CIP NOR	2,49 µg.Kg ⁻¹ 267 µg.Kg ⁻¹	Wenhui Li et al, 2012
Rio Paciência, São Luís/MA, Brasil	CIP	56,6 – 70,4 µg.Kg ⁻¹	Este trabalho

Estudos mostram que uma vez presente no sedimento este composto apresenta baixa mobilidade vertical em razão do seu elevado potencial de adsorção ($K_d > 5 \text{ L kg}^{-1}$), que varia conforme a composição do sedimento e a presença ou não de matéria orgânica, apresentando forte tendência de acumular-se apenas nas camadas mais superficiais dos mesmos (TOLLS, 2001; THIELE-BRUHN, 2003; VASUDEVAN et al., 2009).

Como as fluoroquinolonas apresentam a característica de se acumular (TOLLS, 2001; THIELE-BRUHN, 2003; PEREIRA et al., 2012), a introdução frequente destes resíduos na bacia do rio Paciência, já que a mesma não possui tratamento adequado de seus efluentes domésticos, pode causar sérios riscos ao ecossistema, desencadeando desequilíbrios ambientais visto que os organismos

vivos presentes nesta matriz quando expostos os resíduos desses antibióticos podem sofrer modificações em sua carga genética, resultando na resistência dos mesmos ao fármaco a qual foi exposto, além de poder afetar seriamente o processo de degradação da matéria orgânica existente no local (THIELE-BRUHN, 2003; PEREIRA et al., 2012; RODRIGUES-SILVA et al., 2014)

6 CONCLUSÃO

Mediante o conjunto dos resultados, foi possível verificar que o método cromatográfico desenvolvido mostrou-se simples e adequado para a análise dos três antibióticos fluoroquinolônicos em matrizes complexas como o sedimento de rio, já que satisfez as normas de compêndios oficiais tais como Anvisa e Inmetro para validação de métodos analíticos.

O método analítico para determinação do três antibióticos usando a extração assistido por ultrassom associado à extração em fase sólida utilizando cartuchos Oásis HLB e detecção por CLAE/FL apresentou recuperações dentro dos limites permitidos pela literatura (variando 73,73-88,85%), boa precisão (valores < 20%), boa sensibilidade (LD para CIP, LEV e NOR de 9,32; 17,78 e 4,42 $\mu\text{g}.\text{kg}^{-1}$, respectivamente e LQ de 20 $\mu\text{g}.\text{kg}^{-1}$ para todos os três analitos), e foi aplicado com sucesso na determinação dos antibióticos alvo nos sedimentos do rio Paciência.

Um antibiótico (CIP) dos três estudados foi detectado em três dos seis pontos coletados com concentrações variando entre 56,55–70,45 $\mu\text{g}.\text{kg}^{-1}$. Tal resultado demonstra a importância da realização de estudos mais aprofundados sobre a ocorrência e potencial impacto dessas substâncias no ambiente e provável risco para os organismos vivos, especialmente o ecossistema microbiano, uma vez que no Brasil pesquisas referentes ao comportamento de antibióticos no ambiente são reduzidas.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Guia para validação de métodos analíticos.** Anvisa, Brasília, Resolução nº 899, 29/05/2003.
- AMARANTE Jr, O. P. et al. Validação de métodos analíticos: uma breve revisão. **Caderno de pesquisa**, São Luís, v. 12, p. 116-131, 2001.
- ARAUJO, K. C. M. **Otimização e aplicação de metodologia analítica utilizando CLAE/FL para monitoramento de fármacos antibacterianos fluoroquinolônicos em águas do Rio Anil localizado na cidade de São Luís – MA.** São Luís, MA, 2013. 77p. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal do Maranhão, UFMA, 2013.
- BAILAC, S. et al. Determination of quinolones in chicken tissues by liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. **Journal of Chromatography A**, v.1029, p. 145-151, 2004.
- BILA D. M.; DEZOTTI M. Fármacos no Meio Ambiente. **Química Nova**, v. 26 nº 4, 2003.
- BLACKWELL, P.A. et al. Ultrasonic extraction of veterinary antibiotics from soils and pig slurry with SPE clean-up and LC–UV and fluorescence detection. **Talanta**, v.64, p.1058–1064, 2004.
- BRITO, N. M. et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Revista de ecotoxicologia e meio ambiente**, v.13, p.129-146, 2003.
- CARVALHO, P. N. et al. Multi-family methodologies for the analysis of veterinary pharmaceutical compounds in sediment and sludge samples: comparison among extraction techniques. **Anal. Methods**, v.5, p.6503–6510, 2013
- CHOI, J. et al. Development of a single-step precipitation cleanup method for the determination of enrofloxacin, ciprofloxacin, and danofloxacin in porcine plasma. **Food Chemistry**, v. 127, p. 1878–1883, 2010.
- CISNEROS-FARRAR, F.; PARSONS, L.C. Antimicrobials: classifications and uses in critical care. **Critical Care Nursing Clinics of North America**, v.19, n.1, p.43-51, 2007.
- DEPIZZOL, F. **Avaliação da resistência a antibióticos em isolados de Escherichia coli provenientes de esgotos hospitalar e sanitário.** Vitória, ES, 2006.145p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental). Universidade Federal do Espírito Santo, UFES, 2006.
- DORIVAL-GARCÍA, N. et al. Analysis of quinolone antibiotic derivatives in sewage sludge samples by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: Comparison of the efficiency of three extraction techniques **Talanta**, v.106, p.104–118, 2013.

- FERECH, M. et al. European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC): outpatient quinolone use in Europe. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.58, p.423–427, 2006.
- GAUTAM, A. K. et al. Preliminary study of physico-chemical treatment options for hospital wastewater. **Journal of Environmental Management**, v. 83, p. 298-306, 2007.
- GOLET, E. M. et al. Determination of Fluoroquinolone Antibacterial Agents in Sewage Sludge and Sludge-Treated Soil Using Accelerated Solvent Extraction Followed by Solid-Phase Extraction. **Anal. Chem.**, v.74, p.5455-5462, 2002.
- GONZÁLEZ, C. et al. A liquid chromatographic method, with fluorometric detection, for the determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in plasma and endometrial tissue of mares. **Analytica Chimica Acta**, v. 560, p. 227–234, 2006.
- GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M.T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, Vol. 33, No. 3, 667-679, 2010.
- GUO, L. et al. Pharmacokinetics of ciprofloxacin in eels by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Analytical Biochemistry**, v.341, p.275–279, 2005.
- HERNANDEZ, F.; SANCHO, J. V.; GUERRERO, M. I. C.; Antibiotic residue determination in environmental waters by LC-MS. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, p. 466-485, 2007.
- HERNÁNDEZ-ARTESEROS, J. A. et al. Analysis of quinolone residues in edible animal products. **Journal of Chromatography A**, v. 945, p. 1-24, 2002.
- HIRSCH, R. et al. Determination of antibiotics in different water compartments via liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.815, nº2, p.213-223, 1998.
- HUTZINGER, O. **The handbook of environmental chemistry**, v.1. Springer-Verlag: Berlim, 2006.
- IMESC. Instituto Maranhense de Estudos Socioeconômicos e Cartográficos. **Situação Ambiental da Ilha do Maranhão**. São Luís: IMESC, 2011.
- INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). **Orientações sobre validação de métodos analíticos**. DOQ-CGRE-008, 2010.
- KEMPER, N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. **Ecological Indicators**, v. 8, p. 1-13, 2008.

- KIM, S.C.; CARLSON, K. Quantification of human and veterinary antibiotics in water and sediment using SPE/LC/MS/MS. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v.387, n.4, p.1301 -1315, 2007.
- KÜMMERER, K. Significance of antibiotics in the environment. **Annual Review of Environment and Resources**, v.35, p.57-75, 2010.
- LANÇAS, F. M. **Cromatografia Líquida Moderna (HPLC/CLAE)**. 1^a ed. São Paulo: Editora Átomo, 2009.
- LEAL, R. M. P. et al. Occurrence and sorption of fluoroquinolones in poultry litters and soils from São Paulo State, Brazil. **Science of the Total Environment**, v.432, p.344–349, 2012.
- LEE, H.; PEART, T. E.; SVOBODA, M. L. Determination of ofloxacin, norfloxacin, and ciprofloxacin in sewage by selective solid-phase extraction, liquid chromatography with fluorescence detection, and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1139, p. 45–52, 2007.
- LEYVA, S; LEYVA, E. Fluoroquinolonas. Mecanismos de acción y resistencia, estructura, síntesis y reacciones fisicoquímicas importantes para propiedades medicinales. **Boletín de la Sociedad Química de México**, v.2, n.1, p.1-13, 2008.
- LI, Y.W. Investigation of sulfonamide, tetracycline, and quinolone antibiotics in vegetable farmland soil in the Pearl River Delta area, southern China. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, p.7268-7276, 2011.
- MARTÍNEZ-CARBALLO E. et al. Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. **Environmental Pollution**, v.148, n.2, p.570-579, 2007.
- MENDES FILHO, N. E. **Caracterização Química da Matéria Orgânica nos sedimentos do solo do manguezal e dinâmica de nutrientes nas águas superficiais e intersticiais no médio estuário do rio Paciência em Iguaíba – Paço do Lumiar (MA)**. João Pessoa, PB, 2009. 186p. Tese (Doutorado). Programa de Pós-graduação em Química. Universidade Federal da Paraíba, UFPB, 2009.
- MONREAU, R. L. M; SIQUEIRA, M. E. P. B. **Toxicologia Analítica**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2010.
- MUCHOHI, S. N. et al. Determination of ciprofloxacin in human plasma using high-performance liquid chromatography coupled with fluorescence detection: Application to a population pharmacokinetics study in children with severe malnutrition. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 146–152, 2010.
- MULROY, A. Monitoring and Analysis of Water and Wastes. **Journal of Water and Environment Technology**, v. 13, nº 2, p. 32-36, 2001.

PARK, H. R. et al. Ionization and divalent cation complexation of quinolone antibiotics in aqueous solution. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 21, n. 9, p. 849-854, 2000.

PARK, H. R.; KIM, T.H.; BARK, K.M. Physicochemical properties of quinolone antibiotics in various environments. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.37, p.443-460, 2002.

PASCHOAL, J. A. R. **Resíduos de antimicrobianos em peixe: depleção residual e desenvolvimento de métodos analíticos**. Campinas, SP, 2007.174p. Tese (Doutorado em Química). Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, 2007.

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

PENG, X. et al. Multiresidue determination of fluoroquinolone, sulfonamide, trimethoprim and chloramphenicol antibiotics in urban Waters in China. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, n. 1, p. 73-79, 2008

PEREIRA, L. A. et al. Ocorrência, comportamento e impactos ambientais provocados pela presença de antimicrobianos veterinários em solos. **Química Nova**, v. 35, n. 1, p.159-169, 2012.

PETERS, F. T.; MAURER, H. H. Bioanalytical method validation and its implication for forensic and clinical toxicology – a review. **Accreditation and Quality Assurance**, v.7, p.441-449, 2002.

PICÓ, Y.; ANDREU, V. Fluoroquinolones in soil—risks and challenges. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.387, p.1287–1299, 2007.

QIAO, F.; SUNA, H. Simultaneous extraction of enrofloxacin and ciprofloxacin from chicken tissue by molecularly imprinted matrix solid-phase dispersion. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 53, p. 795–798, 2010.

RAMOS, M. et al. Simple and sensitive determination of five quinolones in food by liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, v. 789, p. 373-381, 2003.

REZAEI, A. et al. Hospital wastewater treatment using an integrated anaerobic aerobic fixed film bioreactor. **American Journal of Environmental Sciences**, v.1 n°4, p.259-263, 2005.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroferéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

RODRIGUES-SILVA, C. et al. Ocorrência e degradação de quinolonas por processos oxidativos avançados. **Química Nova**, v.37, n.5, p.868-885, 2014.

ROUDANT, B.; YORKE, J. C. High-performance liquid chromatography method with fluorescence detection for the screening and quantification of oxolinic acid, flumequine and sarafloxacin in fish. **Journal of Chromatography B**, v. 780, p. 481-485, 2002.

SANDERSON, H. et al. Ranking and prioritization of environmental risks of pharmaceuticals in surfacewaters. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.39, nº 2, p. 158-183, 2004.

SANTOS, P. N. et al. Otimização e validação de método multirresíduo para determinação de sulfonamidas em camarão cultivado por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por UV. **Química. Nova**, v.34, n. 7, p.1265-1270, 2011.

SANTOS, J. H. Z.; PIZZOLATO, T. M.; CUNHA, A. C. B. Desenvolvimento de metodologia analítica para quantificação de fármacos em meio aquático por extração em fase sólida e HPLC. **Revistas de ciências ambientais**, v. 1, n. 2, p. 19-34, 2007.

SAPKOTA, A. et al. Aquaculture practices and potential human health risks: current knowledge and future priorities. **Environment international**, v.34, p.1215-1226, 2008.

SEIFRTOVÁ, M. et al. Determination of fluoroquinolone antibiotics in hospital and municipal wastewaters in Coimbra by liquid chromatography with a monolithic column and fluorescence detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, p. 799–805, 2008

SHAH, P. V. et. al. Bioanalytical methods validation: a revisit with a decade of progress. **Pharmaceutical Research**, v.17, n. 12, p. 1551-1557, 2000.

SILVA, P. **Farmacologia**. 7º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

SMET, J. et al. Pharmacokinetics of fluoroquinolones in critical care patients: A bioanalyticalHPLC method for the simultaneous quantification of ofloxacin, ciprofloxacin and moxifloxacin in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 877, p. 961–967, 2008.

SOUSA, I. C. **Interacção da Enrofloxacina com modelos biomembranares: influência das suas propriedades físicoquímicas**. Lisboa, Portugal, 2007. Dissertação (Mestrado em Tecnologia, Ciência e Segurança Alimentar). Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2007.

SPELTINI, A. et al. Analytical methods for the determination of fluoroquinolonas in solid environmental matrices. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 8, p. 1337-1350, 2011.

STOLKER, A. A. M.; BRINKMAN, U. A. T. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals – a review. **Journal of Chromatography A**, v. 1067, p. 15-53, 2005.

- TADEO, J. L. et al. Application of ultrasound-assisted extraction to the determination of contaminants in food and soil samples. **Journal of Chromatography A**, v.1217, p.2415–2440, 2010.
- TADEO, J. L. et al. Analysis of emerging organic contaminants in environmental solid samples Central. **European Journal of Chemistry**, v.10, n.3, p.480-520, 2012.
- THIELE-BRÜHN, S. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils – a review. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 166, n. 2, p. 145-167, 2003.
- TOLLS, J. Sorption of Veterinary Pharmaceuticals in Soils: A Review. **Environmental Science & Technology**, v.35, n.17, p.3397-3406, 2001.
- TURIEL, E.; MARTÍN-ESTEBAN, A.; TADEO, J. L. Multiresidue analysis of quinolones and fluoroquinolones in soil by ultrasonic-assisted extraction in small columns and HPLC-UV. **Analytica Chimica Acta**, v.562, p.30–35, 2006.
- USLU, M. O. et al. Analysis and sorption behavior of fluoroquinolones in solid matrices. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 190, n. 1-4, p. 55-63, 2008.
- VASUDEVAN, D. et al. pH-dependent ciprofloxacin sorption to soils: Interaction mechanisms and soil factors influencing sorption. **Geoderma**, v.151, p. 68–76, 2009.
- VAZQUEZ-ROIG, P. et al. Determination of pharmaceuticals in soils and sediments by pressurized liquid extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1217, n.16, p.2471-2483, 2010.
- WILGA, J.; KOT-WASIK, A.; NAMIESNIK, J. Studies of Human and Veterinary Drugs' Fate in Environmental Solid Samples-Analytical Problems. **Journal of Chromatographic Science**, v. 46, p.601-607, 2008.
- YANG, J. et al. Simultaneous determination of four classes of antibiotics in sediments of the Pearl Rivers using RRLC–MS/MS. **Science of the Total Environment**, v.408, n.16, p. 3424–3432, 2010.
- ZHOU, L. et al. Trends in the occurrence of human and veterinary antibiotics in the sediments of the Yellow River, Hai River and Liao River in northern China. **Environmental. Pollution**, v.159, p.1877–1885, 2011.