

Validação de um método prático para determinação de níveis de amoxicilina em águas naturais por CLAE-UV e sua aplicação na qualidade ambiental

Validation of a practical method for determination of amoxicillin contents in natural waters by means of HPLC-UV and its application in the environmental quality

RIALA6/1670

Caio Matheus da Rocha Couqueiro Monteiro de OLIVEIRA*, Kaíque Mesquita CARDOSO, Milena Mendes de SOUZA, José Soares dos SANTOS, Maria Lúcia Pires dos SANTOS

*Endereço para correspondência: Laboratório de Química Analítica e Ambiental, Departamento de Ciências Naturais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Estrada do Bem Querer, km 4, Vitória da Conquista, BA, Brasil. CEP: 45031-900. E-mail: caiocouqueiro@yahoo.com.br

Recebido: 02.04.2015 - Aceito para publicação: 06.10.2015

RESUMO

A amoxicilina é penicilina sintética de uso em ambiente hospitalar, residencial e veterinário. O uso indiscriminado deste medicamento pode acarretar prejuízos sociais e ambientais. O presente trabalho determinou os níveis de amoxicilina em dois rios localizados no sudoeste do estado da Bahia, rios Água Fria e Verruga. Uma metodologia analítica foi desenvolvida, otimizada e validada para efetuar a determinação de resíduos de amoxicilina, empregando-se a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector UV-visível (CLAE-UV). A avaliação do mérito do método foi baseada nos parâmetros cromatográficos de validação: linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e seletividade. Devido à inexistência de valores máximos de amoxicilina aceitáveis para a água de consumo, os resultados obtidos podem constituir um indicativo dos níveis de contaminação dos recursos hídricos por este medicamento. As maiores concentrações, superiores a 11 mg.L⁻¹ deste antibiótico, foram detectadas nas zonas onde recebem aportes dos deflúvios urbanos. Os parâmetros de validação demonstraram que o método apresentou capacidade de detecção de baixos valores dos limites de quantificação (2,7 mg.L⁻¹) e de detecção (0,7 mg.L⁻¹), boa precisão (DPR 7 %) e exatidão (96,75 %), constituindo-se em uma importante ferramenta na avaliação de teores de amoxicilina.

Palavras-chave. antibiótico, cromatografia, recurso hídrico.

ABSTRACT

Amoxicillin is a synthetic penicillin used in the hospital, residential and veterinary surroundings. The indiscriminate use of such medication may cause social and environmental damages. This study aims at determining the amoxicillin contents in water of two rivers located in State of Bahia, the Água Fria and Verruga rivers. An analytical method was developed, optimized and validated for determining the amoxicillin residue, by using the high performance liquid chromatography coupled with UV-Visible detector (HPLC-UV). The study was performed according to the chromatographic parameters validation. Considering that the maximum acceptable values of amoxicillin for drinking water were nonexistent, the found results might be considered as an indicator of contamination by this substance. The occurrence of this antibiotic in the two rivers analyzed in this study indicated a heavy contamination in the urban areas where the increased surface water runoffs occur; and their concentrations were higher than 11 mg.L⁻¹. The validation parameters indicated that the method showed the capacity for detecting low values of quantification limits (2.7 mg.L⁻¹) and of detection (0.7 mg.L⁻¹), good precision (DSR 7 %) and accuracy (96.75 %), thus it turned to be an important tool for assessing amoxicillin contents.

Keywords. antibiotic, chromatography, water resource.

INTRODUÇÃO

Medicamento é todo produto farmacêutico que tem por finalidade ações profiláticas, curativas, paliativas ou para fins de diagnósticos¹. São inúmeras as classes de medicamentos existentes devido ao elevado grau de patologias, seja na população urbana ou rural. Independentemente do que se destina a ação do fármaco, uma vez administrado seguirá uma série de etapas, chamada farmacocinética. Sua ação é dividida em absorção, distribuição, metabolização e excreção. É na excreção, etapa final da farmacocinética, que o medicamento será expelido do organismo em quase sua totalidade².

Como as necessidades fisiológicas da maioria da humanidade são realizadas em vasos sanitários domésticos, os dejetos podem seguir caminhos diferentes. Podem ser lançados tanto em rede de esgoto, atingindo as estações de tratamento e fossas sépticas, ou ainda ser despejados diretamente em recurso hídrico, entrando assim em contato com o meio ambiente.

Como muitos fármacos são produtos advindos das indústrias, uma vez lançados no meio ambiente persistem por muito tempo, devido à ausência de micro-organismo para sua degradação³. Os locais para detectar a presença de fármacos no ambiente aquático são inúmeros, pois uma vez lançado no ambiente, a ação da chuva pode solubilizar o medicamento em mananciais de superfície ou drená-lo para o lençol freático⁴.

Existem diversas classes de antibióticos, entre as quais a penicilina e seus derivados, como a amoxicilina, por exemplo, que é largamente utilizada tanto em ambiente hospitalar quanto doméstico. Trata-se de um medicamento listado na RENAME (Relação Nacional dos Medicamentos Essenciais), que estabelece quais medicamentos que devem ser utilizados no Sistema Único de Saúde (SUS), por municípios, estados e pela união⁵. De acordo com sua farmacocinética, a amoxicilina é excretada quase em sua totalidade na forma não metabolizada por via renal².

Muitos trabalhos na área da análise de medicamentos utilizam a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a cromatografia gasosa com espectrometria de massas (CG-EM), seguida por etapas de pré-concentração, principalmente por serem consideradas técnicas sensíveis, seletivas,

confiáveis e práticas. A cromatografia é um método de separação que permite de forma ampla a identificação e determinação de componentes químicos de misturas complexas. Entre as técnicas analíticas de separação, a cromatografia líquida de alta eficiência é uma das mais utilizadas, devido à sensibilidade, adaptação e adequação para determinação e separação de espécies não-voláteis ou tecnicamente frágeis, com ampla aplicabilidade às substâncias de interesses para muitos campos da ciência⁶.

Assim, o presente estudo teve como objetivo, otimizar e validar um método analítico qualitativo e quantitativo para investigação da possível presença de amoxicilina nos rios Água Fria e Verruga na região de Vitória da Conquista/BA por CLAE-UV, bem como realizar um estudo da contaminação do ambiente aquático pelo analito.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e armazenamento das amostras

Foram coletadas 8 amostras de água de rios da cidade, sendo quatro pontos no rio Verruga e quatro pontos no rio Água Fria, em novembro de 2012, período caracterizado como estação seca na região.

As coletas de água foram realizadas de acordo com as recomendações da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), por meio do guia de coleta e preservação de amostras de água⁷, em triplicata, utilizando frascos estéreis de polietileno com capacidade de 1.000 mL, tendo sido mantidas todas as amostras armazenadas a 4 °C até o momento da análise.

Todas as vidrarias e frascos de polietileno utilizados foram previamente imersos em solução de HNO₃ 10 % (v/v) por 24 h e enxaguados com água deionizada ultrapura.

Local de estudo

Os pontos de coleta no rio Verruga foram determinados para avaliar os níveis de contaminação por amoxicilina ao longo de seu trajeto pelo município de Vitória da Conquista. O ponto A1 correspondeu ao Poço Escuro, uma reserva florestal e nascente do rio; os pontos

B1 e C1 estavam localizados na zona urbana e o ponto D1 foi referente à estação de tratamento de esgoto (Figura 1).

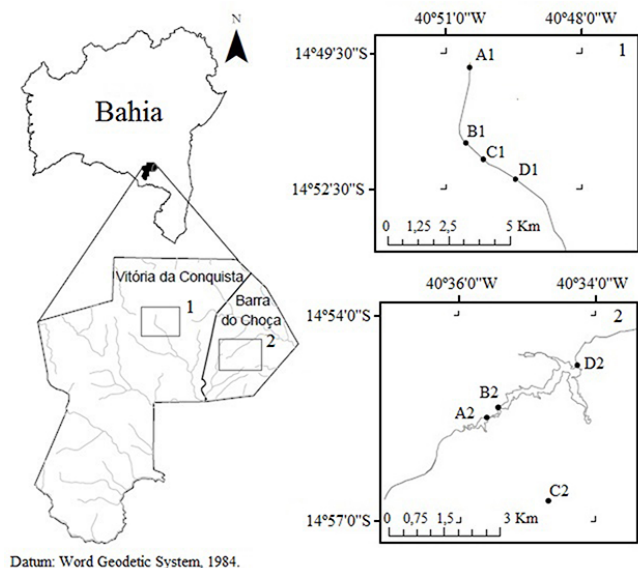


Figura 1. Pontos de coleta nas áreas em estudo: 1 (rio Verruga) e 2 (sistema Água Fria)

Os pontos de coleta referente ao rio Água Fria foram escolhidos para que englobassem os dois reservatórios de água da cidade de Vitória da Conquista (Água Fria I e Água Fria II), de forma que demonstrassem os níveis do fármaco anterior à contribuição citadina. O ponto A2 correspondeu ao reservatório Água Fria I e o B2, ao término do reservatório Água Fria II; o ponto C2 correspondeu ao açude da zona rural e D2, ao reservatório Água Fria II.

A barragem de Água Fria I foi criada em 1970 e ampliada pela primeira vez na década de 80 com a construção da barragem de Água Fria II, na confluência dos rios Monos e Água Fria, responsáveis pelo abastecimento da região de Vitória da Conquista. Por estar localizado em uma área rural, o sistema Água Fria pode sofrer contaminação por agrotóxicos devido à lavoura de café e contaminação por medicamentos de uso veterinário, devido à atividade pecuária⁸.

O rio Verruga nasce em uma área de reserva florestal situada na área urbana de Vitória da Conquista, no sudoeste do estado da Bahia.

O clima é característico das zonas de transição, apresentando médias de temperatura e chuva em torno de 23 °C e 900 mm, respectivamente. A área correspondente do município é de 3743 km², com uma população estimada em 260 mil habitantes. Nas últimas décadas, o município apresentou um aumento populacional o que demanda um planejamento urbano adequado no sentido de evitar uma série de impactos ambientais⁹.

Após a nascente, o trajeto superior do rio Verruga flui para uma área metropolitana. Mesmo com os problemas decorrentes da expansão urbana, a cabeceira do córrego encontra-se protegida por uma floresta de vegetação densa. Contudo, após o percurso canalizado, o córrego começa a receber em vários pontos ao longo do seu leito, despejos de esgoto sanitário e águas pluviais drenados por um sistema de coleta combinado através de galerias e emissários¹⁰.

Reagentes e Soluções

Para determinação da amoxicilina por CLAE-UV, utilizou-se padrão de amoxicilina (Vetranal[®], 99,3 % de pureza), adquirido da empresa Sigma-Aldrich[®] (São Paulo, SP, Brasil). A fase móvel utilizada foi composta de fosfato de potássio monobásico, KH₂PO₄ (Vetec[®], São Paulo, Brasil, 99 % de pureza), acetonitrila, CH₃CN (Merck[®] KGaA, Darmstadt, Alemanha, grau de pureza 99,9 %) e hidróxido de potássio, KOH (Nuclear[®], São Paulo, Brasil, 85 % de pureza).

Todas as soluções foram preparadas utilizando água ultrapura, obtida pelo sistema de purificação Millipore[®] (São Paulo, Brasil).

Preparo das amostras

As amostras coletadas foram filtradas, a vácuo, em membrana de borossilicato 0,47 µm. Após a filtração, 200 mL de cada amostra foram introduzidos em evaporador rotativo (Quimis[®], Q344M2), a temperatura de 79 °C, para se obter um volume de 10 mL, ou seja, uma pré-concentração de 20 vezes. Posteriormente à pré-concentração, as amostras foram filtradas por filtros de microsseringa e armazenadas em geladeira, entre 2 e 8 °C.

Preparo das soluções analíticas

Alíquota de 0,1 g do padrão de amoxicilina foi dissolvida em 100 mL de mistura de solventes $H_2O:CH_3CN$ (1:1 v/v), para obter solução estoque com 1.000 mg.L^{-1} . Esta solução foi armazenada em frasco de polietileno embalado com papel alumínio para evitar contato com a luz. Posteriormente, foi preparada uma solução intermediária da amoxicilina de concentração 100 mg.L^{-1} e sob as mesmas condições, o preparo das soluções de trabalho nas concentrações de 5, 10, 20, 40 e 80 mg.L^{-1} .

Parâmetros Cromatográficos

O sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizado foi composto de uma bomba série 200, válvula de amostragem, loop de $20\ \mu\text{L}$ e um detector de ultravioleta de comprimento de onda variável (série 200 UV/VIS, Perkin Elmer®, EUA).

A separação do analito foi realizada utilizando coluna RP-C18 ($250\text{ mm} \times 4,6\text{ mm}$; $5\ \mu\text{m}$ de tamanho de partícula, Thermo®, EUA). A amostra injetada foi submetida a uma eluição isocrática com água ultrapura, acetonitrila e solução aquosa de fosfato de potássio monobásico a $136,1\text{ g.L}^{-1}$ na proporção 83:16:1 (v/v/v), fluxo de $1,2\text{ mL.min}^{-1}$ e detecção a 242 nm . A fase móvel foi submetida a uma agitação ultrassônica (lavadora ultrassônica, modelo USC-1800) por vinte minutos.

Validação

A validação de métodos deve garantir, através de dados experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados¹¹. Realizou-se a validação com base nos parâmetros de linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão (recuperação), limites de detecção e quantificação e seletividade, seguindo o protocolo proposto pela ANVISA e INMETRO¹¹⁻¹⁵.

A linearidade corresponde à capacidade que o método possui em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação^{16,17}. A curva de calibração foi

construída utilizando o método de padronização externa com cinco pontos, com concentrações variando de 5 a 80 mg.L^{-1} . Para cada concentração (5, 10, 20, 40 e 80 mg.L^{-1}), foram preparadas três soluções no dia da análise, com injeções em triplicata de cada concentração.

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas^{12,16}. Em validação de métodos, o número de determinações é geralmente pequeno e o que se calcula é a estimativa do desvio padrão absoluto (s). A repetibilidade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas do mesmo método, realizadas sob as mesmas condições de medição. A repetibilidade envolve várias medições da mesma amostra, em diferentes preparações^{18,19}. Foram feitos ensaios com a matriz em branco fortificada em três concentrações distintas ($10, 20$ e 40 mg.L^{-1}) ($n=3$), sendo que, para cada concentração foram preparadas três soluções.

A precisão intermediária demonstra o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias ou analistas ou diferentes equipamentos ou a combinação destes fatores¹⁴. A precisão intermediária é estabelecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório e a mais aconselhável de ser adotada. Com amostras em concentrações semelhantes à repetibilidade, as injeções foram em triplicata e os valores foram expressos sob a forma de desvio padrão relativo (% DPR).

A exatidão é um parâmetro o qual faz um comparativo entre os valores obtidos em uma análise com valores ditos como verdadeiros, reais^{12,16}. É válido ressaltar que os valores ditos como verdadeiros ou exatos são obtidos através de medições extremamente rigorosas e meticulosas o qual é indeterminado por natureza²⁰. A recuperação deve ser avaliada na faixa de concentração esperada para o composto de interesse²¹. A exatidão do método foi avaliada através do método da recuperação. Para tal, foi utilizado o evaporador rotativo como técnica de pré-concentração.

Os limites de detecção (LD) e quantificação

(LQ) determinam a menor quantidade que um determinado analito pode ser detectado e quantificado. O mesmo pode ser determinado de três formas: visual, sinal-ruído, parâmetros de curva analítica^{12,16}. Para a determinação do limite de quantificação foram feitas diluições sucessivas do padrão até se obter uma relação sinal/ruído 10:1. Já o limite de detecção foi obtido quando a relação sinal/ruído se encontrou em 3:1.

A seletividade é o primeiro parâmetro no desenvolvimento de validação de um método instrumental de separação e deve ser revista continuamente durante a validação e posteriormente, durante o uso do método. Algumas amostras como fármacos podem sofrer degradação formando compostos que possam eluir junto com o analito em interesse¹³. A seletividade da metodologia foi obtida através da comparação dos cromatogramas da solução padrão de amoxicilina com as amostras fortificadas e amostras em branco.

As análises estatísticas dos dados foram desempenhadas pelo programa SPSS 16.0 (*Statistical Package for Social Sciences*) da *Microsoft*[®]. Para a avaliação da linearidade da curva analítica foram feitos teste de homocedasticidade e análise dos resíduos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Otimização das fases móveis

Inicialmente, a primeira fase móvel utilizada foi aquela proposta pela Farmacopéia Brasileira, 5ª edição²², que consistiu em uma solução aquosa de KH_2PO_4 ($6,8 \text{ g.L}^{-1}$), ajustado o pH em $5,0 \pm 0,1$ com hidróxido de potássio 45 %, adicionada posteriormente de acetonitrila na proporção $\text{KH}_2\text{PO}_4:\text{CH}_3\text{CN}$ (96:4 v/v). Posteriormente, foi testada uma segunda fase móvel, composta por água ultrapura, solução aquosa de KH_2PO_4 ($136,1 \text{ g.L}^{-1}$) e acetonitrila na proporção 91:1:8 (v/v/v).

Com a primeira fase móvel, os resultados de medições sucessivas não apresentavam concordâncias e nem sempre foram obtidos sinais de resposta; todavia, quando o analito foi detectado, o tempo de retenção equivaleu a 6,2 min. Com a segunda fase móvel, observou-se

sinais de resposta em todos os ensaios; entretanto não possuíam repetibilidade, ou seja, as áreas dos picos de resposta para uma mesma concentração superavam um desvio padrão relativo de 20 %. Contudo, notou-se uma redução do tempo de retenção, diminuído a 4,2 minutos.

A fase móvel otimizada foi composta por água ultrapura, solução aquosa de KH_2PO_4 ($136,1 \text{ g.L}^{-1}$) e acetonitrila na proporção $\text{H}_2\text{O}:\text{KH}_2\text{PO}_4:\text{CH}_3\text{CN}$ (83:1:16 v/v/v). O tempo de retenção obtido foi de 2,4 min. Para se confirmar que as áreas dos picos não iriam sofrer alterações ao aumentar a concentração da acetonitrila, foi realizado teste da fase móvel com acetonitrila em 20 %, notou-se que as áreas correspondiam as mesmas ao utilizar 16 %, com pequenas variações no tempo de retenção, porém por uma questão de economia de solvente, optou-se pelo uso do eluente na concentração de 16 %.

Linearidade

O coeficiente de correlação e a equação da reta podem ser observados na Figura 2a. Demonstra-se uma forte correlação, com aumento das áreas dos picos de resposta à medida que aumenta a concentração do analito¹³. Para verificar a não ocorrência de tendência, procedeu-se à análise de resíduos, sendo que o gráfico de dispersão dos resíduos em função dos valores preditos mostrou-se aleatório (Figura 2b).

Para garantir a avaliação da linearidade da curva foi feito um teste de homocedasticidade pelo teste de Cochran ($k = 5$; $n = 3$; $\alpha = 0,05$), com o propósito de verificar a homogeneidade da variância^{14,23,24}. O comportamento das variáveis foi homocedástico (Tabela 1).

Precisão

Repetibilidade (precisão intra-dia)

Expressaram-se os resultados na forma de desvio padrão relativo (% DPR), sendo 7,25; 4,78 e 8,97 % para as concentrações de 10, 20 e 40 mg.L^{-1} , respectivamente. Indica-se uma precisão aceitável para a validação quando inferior a 20 %²⁵.

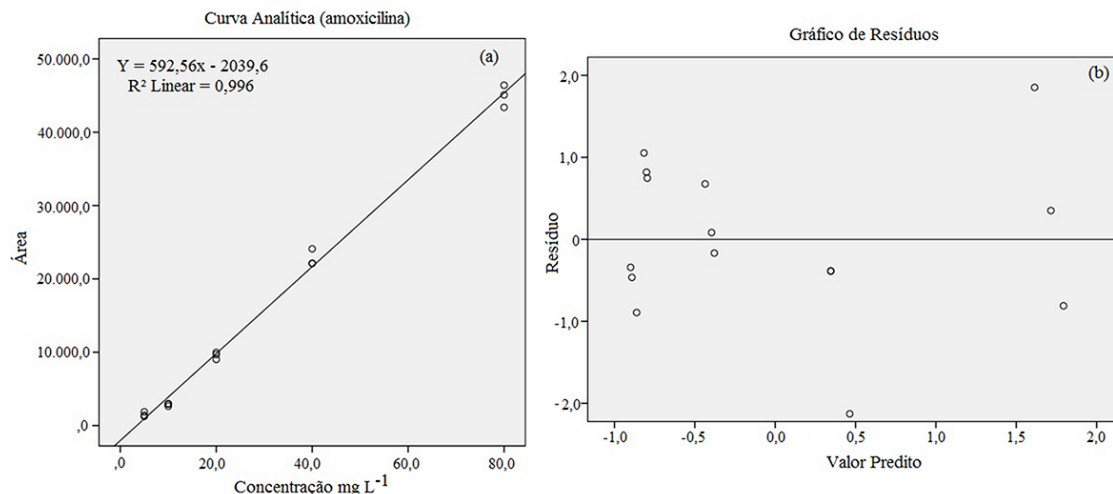


Figura 2. Modelo referente à curva analítica com 5 níveis em triplicata (a) e o gráfico de resíduos (b)

Tabela 1. Avaliação da linearidade (Teste de Cochran)

Concentração mg.L ⁻¹	Resposta		Cálculos	
	Replicata	Área	Média	Variância
5	1	1245,300	1500,123	107898,521
	2	1384,230		
	3	1870,840		
10	1	2638,800	2842,933	32970,916
	2	2903,550		
	3	2986,450		
20	1	9017,540	9560,623	241321,797
	2	9690,330		
	3	9974,000		
40	1	22124,050	22782,563	1300544,114
	2	22124,240		
	3	24099,400		
80	1	43387,650	44962,197	2293375,817
	2	45090,700		
	3	46408,240		
Avaliação				
Variância	Maior	2293375,817	Resultado	
	Somatório	3976111,166		
C de Cochran	Calculado	0,577	Homocedástico	
	Tabelado	0,684		

Precisão intermediária (precisão inter-dias)

O teste para tal parâmetro foi realizado com uma semana de intervalo. A precisão intermediária para as concentrações de 10, 20 e 40 mg.L⁻¹ foi de 8,88; 5,13 e 7,76 %, respectivamente. Para ter validade o desvio padrão relativo não deve ultrapassar 20 %²⁵.

Exatidão (Recuperação)

A recuperação obtida apresentou-se na faixa aceitável para validação de métodos (91,74; 103,95 e 94,57 % para as concentrações de 10, 20 e 40 mg.L⁻¹ respectivamente), que para análise de resíduos compreende entre 70 e 120 %¹⁰. A boa recuperação dos analitos indica que não ocorreram degradações significativas da amoxicilina, na rotaevaporação das amostras

a temperatura de 79 °C durante o processo de extração.

Limite de Quantificação e Detecção (LD e LQ)

Esses parâmetros demonstraram-se satisfatórios, uma vez que foi obtido valores baixos para ambos. Assim, LQ= 2,7 mg.L⁻¹ e LD= 0,7 mg.L⁻¹.

Seletividade

O método foi seletivo, visto que não existem compostos próximo ao tempo de retenção do analito (Figura 3). Para garantir que o sinal de resposta não sofreria sobreposição, realizaram ensaios com a corrida cromatográfica de 20 minutos, a qual não foi constatada interferentes.

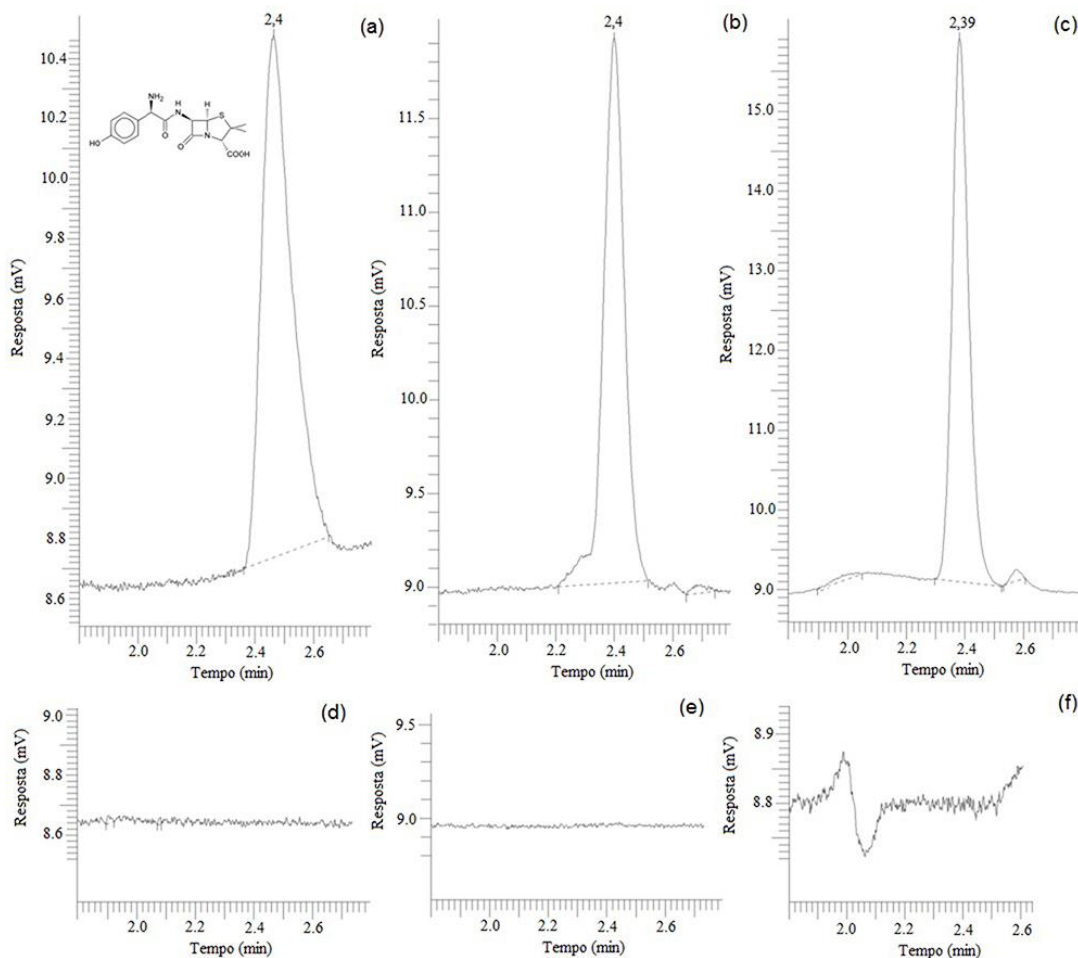


Figura 3. Cromatogramas: (a) Solução-padrão de amoxicilina a 40 mg.L⁻¹; (b) Amostra fortificada a 40 mg.L⁻¹; (c) Amostra da estação de tratamento do rio Verruga pré-concentrada 20 vezes; (d) Água ultrapura e acetoneitrila 1:1 (v/v); (e) Água ultrapura; (f) Amostra do reservatório Água Fria I pré-concentrada 20 vezes

Aplicação

Pode-se observar que as maiores concentrações de amoxicilina, na faixa de 11,24 mg.L⁻¹ a 16,55 mg.L⁻¹ se encontram nos pontos da zona urbana (Tabela 2), estes valores podem ser atribuídos devido principalmente a proximidade desse trecho a uma unidade hospitalar, como também por esta área ser um local de lançamento direto de esgoto bruto da cidade.

Por outro lado, nas águas coletadas no ponto A1, área de reserva ambiental e nascente do rio Verruga, foram encontrados teores de amoxicilina superiores aos detectados nas amostras oriundas do trecho do rio próximo a estação de tratamento de esgoto, ponto D1 (Tabela 2). Tal fato pode ser explicado em virtude de possíveis descartes ilegais de medicamentos na área localizada à montante do recurso hídrico. Ou então, devido à visitação frequente de pessoas no local para recreação. O descarte indevido de fármacos no lixo doméstico e/ou o lançamento na rede de esgoto, podem provocar a contaminação dos solos, bem como, das águas superficiais e subterrâneas. Tal comportamento pode se constituir em um importante fator gerador de impactos da saúde das populações e provocar danos ao meio ambiente²⁶. Ao contrário do que se esperava, observou-se que o efluente da

estação de tratamento de esgoto (ETE), não impactou as águas do rio Verruga com relação aos níveis de amoxicilina. As amostras de água coletadas próximo ao local de despejo do efluente da ETE, ponto D1, apresentaram os níveis mais baixos de amoxicilina. Isso ocorreu provavelmente devido ao grande número de tributários localizados à montante ao ponto de coleta, os quais provocam uma elevada vazão das águas do rio, refletindo-se assim na diluição dos teores de amoxicilina.

No sistema Água Fria, por se tratar de um recurso hídrico localizado em zona rural, esperava-se níveis de amoxicilina inferiores. Contudo, o fato da amoxicilina ser um medicamento de uso humano e veterinário, atribui-se os níveis desse analito ao uso veterinário, devido ao manejo de animais na área.

A literatura especializada apresenta níveis de amoxicilina em estações de tratamento de água na Alemanha com concentrações de 28 a 82,7 µg.L⁻¹, Itália na ordem de 120 µg.L⁻¹ e nos EUA em água de rio com concentração de 10 ng.L⁻¹ ²⁷⁻²⁹. Desta forma, percebe-se que os níveis de fármacos no ambiente aquático de Vitória da Conquista, embora elevados nos pontos de aporte, tende a se esvaecer à medida que se distancia do local de fonte poluidora.

Tabela 2. Concentrações médias de amoxicilina (em mg.L⁻¹ ± desvio padrão) das amostras de água

Local de Estudo			
Rio Água Fria		Rio Verruga	
Pontos	Concentrações	Pontos	Concentrações
A2 (Reservatório I)	< LD	A1 (Nascente)	3,70 ± 0,15
B2 (Término do Reservatório II)	1,10 ± 0,08	B1 (Zona Urbana)	16,55 ± 2,10
C2 (Zona Rural)	< LD	C1 (Zona Urbana)	11,24 ± 1,40
D2 (Reservatório II)	< LD	D1 (Estação de Tratamento)	1,50 ± 0,30

CONCLUSÃO

O método otimizado para avaliação de amoxicilina em água mostrou-se eficiente. Apresentou baixos valores dos limites de quantificação e detecção, precisão e exatidão satisfatórias, constituindo-se em uma importante ferramenta na avaliação de teores de amoxicilina nos recursos hídricos.

Os resultados mostraram que as concentrações mais elevadas de amoxicilina foram detectadas nas águas que sofrem influência das atividades urbanas. O trecho urbano do rio Verruga apresenta as maiores concentrações, que tendem a diminuir à medida que se distancia dos deflúvios da cidade.

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Decreto-lei nº 5991, de 17 de dezembro de 1973. Dispõe sobre o controle sanitário do comércio de drogas, medicamentos, insumos farmacêuticos e correlatos, e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 17 dez. 1973. [acesso 2013 Jun 22]. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L5991.htm].
2. Harvey RA, Champe PC. Farmacologia ilustrada. 2ª ed. Porto Alegre (RS): Artmed; 1988.
3. Crestana GB, Silva JH. Fármacos residuais: panorama de um cenário negligenciado. *Rev Int Direito Cidadania*. 2011;9(2):55-65.
4. Bila DM, Dezotti M. Fármacos no meio ambiente. *Quim Nova*. 2003;26(4):523-30. [DOI: 10.1590/S0100-40422003000400015].
5. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais – RENAME. Elenco de medicamentos e insumos da RENAME 2014. [acesso 2013 Agosto 12]. Disponível em: [http://www.saude.sp.gov.br/resources/ses/perfil/gestor/assistencia-farmacutica/renome_2014.pdf].
6. Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR. Fundamentos de química analítica. 8ªed. São Paulo (SP): Cengage Learning; 2011.
7. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo – CETESB. Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos. [acesso 2013 Mar 17]. Disponível em: [http://www.clean.com.br/downloads/Guia_Nacional_de_Coleta_e_Preservacao_de_Amostras_.pdf].
8. Alexandrino DM. Avaliação sazonal de metais (Ca, Mg, Na e K) e metais traços (Cu, Zn, Cd e Pb) sob influência de atividades agrícolas na bacia de drenagem do reservatório Água Fria, Barra do Choça – BA [dissertação de mestrado]. Vitória da Conquista (BA): Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia; 2008.
9. Santos JS, Oliveira E, Massaro S. Avaliação da salinização de açudes no semiárido brasileiro por ICP-AES. *Quim. Nova*. 2000;23(4):453-6. [DOI: 10.1590/S0100-404220000400004].
10. Santos MLP, Santos JS, Santos JR, Oliveira LB. Efeitos dos escoamentos urbanos e rurais na qualidade das águas do córrego verruga em Vitória da Conquista - Bahia, Brasil. *Quim Nova*. 2008;31(8):1997-2003. [DOI: 10.1590/S0100-40422008000800016].
11. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 02 de julho de 2003. [acesso 2013 Mar 28]. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE_899_2003_De+termina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9to+dos+anal%C3%ADticos+e+bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES].
12. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial - INMETRO. Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos - DOQ-CGCRE-008. [acesso 2013 Mar 28]. Disponível em: [http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_02.pdf].
13. Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSE, Melo LFC. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim Nova*. 2004;27(5):771-80. [DOI: 10.1590/S0100-40422004000500017].

14. Ribeiro FAL, Ferreira MMC, Morano SC, Silva LR, Schneider RP. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. *Quim Nova*. 2008;31(1):164-71. [DOI: 10.1590/S0100-40422008000100029].
15. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA. Manual de garantia da qualidade analítica. Secretaria de Defesa Agropecuária. [acesso 2013 Out 15]. Disponível em: [http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Manual_Garantia_Analitica.pdf]
16. International Conference on Harmonisation – ICH. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). [acesso 2013 Jun 13]. Disponível em: [http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf]
17. Swartz ME, Krull IS. Validação de métodos cromatográficos. *Pharm Technol*. 1998;2(3):12-20.
18. Green JM. A practical guide to analytical method validation. *Anal Chem News Features*. 1996;68(9):305A-9A.
19. Shabir GA. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: understanding the differences and similarities between validation. *J Chromatogr A*. 2003;987(1-2):57-66. [DOI: 10.1016/S0021-9673(02)01536-4].
20. Salmon JE. Ion-Exchange in analytical chemistry: problems and prospects. *Pure Appl Chem*. 1971; 25(4):797-809.
21. Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas – GARP. Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos (apostila). São Paulo: GARP, 1999.
22. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Farmacopéia Brasileira, 5ª edição. [acesso 2013 jun 13]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/volume1%2020110216.pdf]
23. Cardoso MHWM, Gouvêa AV, Nóbrega AW, Abrantes SMP. Validação de método para determinação de resíduos de agrotóxicos em tomate: uma experiência laboratorial. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2010;30(Supl.1):63-72.
24. Pimentel MF, Neto BB. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. *Quim Nova*. 1996;19(3):268-77.
25. Berg RG, Murta ALM, Kugler W. O método das adições padrão aplicado à análise cromatográfica quantitativa de fenóis em águas residuais. *Quim Nova*. 1988;11(2):288-91.
26. Pinto GMF, Silva KR, Pereira RFAB, Sampaio SI. Estudo do descarte residencial de medicamentos vencidos na região de Paulínia (SP), Brasil. *Eng Sanit Ambient*. 2014;19(3): 219-24. [DOI: 10.1590/S1413-41522014019000000472].
27. Andreozzi R, Caprio V, Ciniglia C, de Champdoré M, Lo Giudice R, Marotta R, et al. Antibiotics in the Environment: Occurrence in Italian STPs, Fate, and Preliminary Assessment on Algal Toxicity of Amoxicillin. *Environ Sci Technol*. 2004;38(24):6832-38. [DOI: 10.1021/es049509a].
28. Cha JM, Yang S, Carlson KH. Trace determination of beta-lactam antibiotics in surface water and urban wastewater using liquid chromatography combined with electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2006;1115(1-2):46-57. [DOI: 10.1016/j.chroma.2006.02.086].
29. Christian T, Schneider RJ, Färber HA, Skutlarek D, Meyer MT, Goldbach HE. Determination of antibiotic residues in manure, soil, and surface waters. *Acta Hydrochim Hydrobiol*. 2003;31(1):36-44. [DOI: 10.1002/ahch.200390014].