

METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE COCAÍNA E BENZOILECGONINA EM ÁGUAS SUPERFICIAIS

Helena Miho Shihomatsu¹, Elaine Arantes Jardim Martins², Marycel Elena Barboza Cotrim³, Daniel Temponi Lebre⁴, Maria Aparecida Faustino Pires⁵

Abstract — An analytical method for the determination of cocaine (COC) and benzoilecgonine (BEZ) in surface waters has been developed and validated. The method is based on extraction and purification of target compounds by solid phase extraction (SPE) followed by liquid chromatography reversed phase coupled to a tandem mass spectrometer (LC-MS/MS). Quantitative analysis was performed in a MRM (Multiple Reaction Monitoring) mode. For each analyte, two transitions between the precursor ions and ions two most abundant products were monitored; the most abundant one used for the quantitation and the other one for confirmation. Average matrix spike recoveries at three different spiking levels were 77-102 % for COC and 73-91 % for BEZ. The method quantitation limit (MQL) was 3 ng L⁻¹ for COC and 1.2 ng L⁻¹ for BEZ. The developed method has been applied to the analysis in the waters of public supply Guarapiranga Dam (SP, Brazil).

Index Terms — cocaine, benzoilecgonine, SPE, LC-MS/MS, surface water.

INTRODUÇÃO

A cocaína (COC) é um potente estimulante do sistema nervoso central e o seu consumo pela sociedade não deve ser ignorado. Nas últimas décadas, no Brasil, o consumo de cocaína tem sido crescente e segundo a Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas [1], com significativas consequências socioeconômicas na saúde e na incidência criminal. Portanto, para as políticas públicas é importante o conhecimento do nível de uso, locais de utilização e distribuição para subsidiar projetos de campanhas de prevenção e estratégias de execução.

O método convencional para estimar o consumo de drogas baseia-se nos dados de entrevistas ao consumidor, registros médicos, estatísticas de criminalidade (por exemplo, número de prisões e detenções), produção de drogas e de taxas de apreensão [2]. A estimativa do consumo de droga também utiliza os dados de testes pessoais

realizados, durante o monitoramento de abstinência e estudos toxicológicos, nas amostras de plasma, soro, urina, saliva, suor e cabelo [3]. Portanto, os métodos são dispendiosos, demorados e alguns obtidos por método invasivo.

Recentemente, um novo conceito [4] foi introduzido onde os resíduos de drogas ilícitas e seus metabólitos de uso humano, de modo similar aos produtos farmacêuticos, podem ser detectados no ambiente aquático, após a excreção pela urina. Com este método é possível obter dados de uma comunidade em tempo real para permitir adoção imediata de medidas adequadas por parte das autoridades responsáveis, quando necessárias. Além disso, esses dados podem ser obtidos de modo anônimo evitando conflitos de privacidade.

Seguindo este conceito, Zucato e colaboradores [5] desenvolveram um método que permite estimar o consumo de drogas analisando a concentração de COC e seu principal metabólito, BEZ, em amostras de esgoto urbano e de águas superficiais do norte da Itália. Desde então, vários pesquisadores [6,7] têm desenvolvido métodos analíticos para a determinação de drogas de abuso em amostras de esgoto e em águas superficiais utilizando principalmente a extração em fase sólida (SPE) seguida pela cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS).

O presente estudo apresenta a validação e aplicação de um método para determinação de COC e BEZ utilizando a SPE seguida de LC-MS/MS em amostras de água da Represa Guarapiranga. A Represa Guarapiranga é um dos principais reservatórios urbanos da Região Metropolitana de São Paulo (RMSP), Estado de São Paulo (Brasil) destinado ao abastecimento público de aproximadamente 4 milhões de pessoas.

EXPERIMENTAL

Área de Estudo

A Represa Guarapiranga é um dos maiores e mais ameaçados mananciais urbanos, situado ao sul da principal

¹ Helena Miho Shihomatsu, Pesquisadora, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPÊN-CNEN/SP, Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, Cidade Universitária – 05508-000, São Paulo/SP, Brasil, hmatus@ipen.br

² Elaine Arantes Jardim Martins, Pesquisadora e Orientadora, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPÊN-CNEN/SP, Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, Cidade Universitária – 05508-000, São Paulo/SP, Brasil, elaine@ipen.br

³ Marycel Elena Barboza Cotrim, Pesquisadora e Orientadora, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPÊN-CNEN/SP, Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, Cidade Universitária – 05508-000, São Paulo/SP, Brasil, mecotrim@ipen.br

⁴ Daniel Temponi Lebre, Centro de Espectrometria de Massas, Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, Cidade Universitária – 05508-000, São Paulo/SP, Brasil, daniel.lebre@cemsalab.com.br

⁵ Maria Aparecida Faustino Pires, Pesquisadora e Orientadora, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPÊN-CNEN/SP, Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, Cidade Universitária – 05508-000, São Paulo/SP, Brasil, mapires@ipen.br

megalópole da América do Sul, a RMSP, abastecendo cerca de quatro milhões de pessoas, com uma área máxima da superfície do lago de 33 km². Na Figura 1 é apresentada a localização da Represa Guarapiranga. A Tabela 2 descreve as coordenadas geográficas (GPS) referentes aos pontos de coleta. As amostras de água foram coletadas em garrafas de van Dorthn e transferidas para frascos de vidro âmbar. No laboratório as amostras foram filtradas a vácuo em membrana de 0,45 µm e armazenadas em refrigerador. A extração (SPE) dos analitos foi realizada em até 7 dias após a coleta.

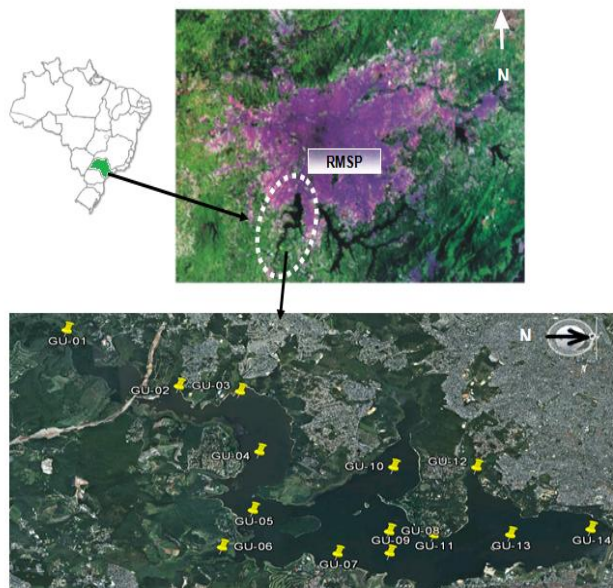


FIGURA 1
LOCALIZAÇÃO DA REPRESA GURAPIRANGA E DOS PONTOS DE COLETA

Reagentes

Neste estudo foram empregados acetonitrila (ACN), metanol (MeOH) e isopropanol grau LC/MS de procedência J. T. Baker, ácido fórmico e acetato de amônio grau P. A. de procedência Sigma-Aldrich. A água ultrapura de baixa condutância (tipo 1), utilizada em todo o procedimento, foi purificada no sistema “EasyPure”, Barnstead. Os padrões de COC e BEZ foram adquiridos da Cerilliant. As soluções de trabalho para construção da curva analítica foram preparadas por diluições sucessivas das soluções padrão com concentrações de 3.000 e 1.500 µg L⁻¹ de COC e BEZ, respectivamente. As concentrações das soluções das curvas analíticas foram preparadas na faixa de 5,04 a 500,40 µg L⁻¹ e 5,01 a 199,50 µg L⁻¹ para COC e BEZ, respectivamente.

Extração em fase sólida

A extração em fase sólida (SPE) foi baseada no trabalho de Barrek e colaboradores [8] com algumas modificações. O procedimento foi realizado com o cartucho de SPE StrataX (Phenomenex). O condicionamento do cartucho foi realizado

com 3 mL de ACN; 3 mL de MeOH/Isopropanol/ACN (1:1:1; v/v/v) e 4 mL de água. Em seguida, a amostra (250 mL) foi percolada pelo cartucho com uma vazão de aproximadamente 5 mL min⁻¹. A eliminação de impurezas foi realizada com 3 mL de água, seguida pela passagem de ar durante 10 minutos para eliminar a água do cartucho. A eluição dos analitos foi realizada com 3 mL de MeOH/Isopropanol/ACN (1:1:1; v/v/v) e 3 mL de ACN. Os analitos eluídos foram evaporados até a secura com fluxo de ar, retomados com 250 µL de ACN/H₂O (5:95; v/v) e analisados por LC-ESI-MS/MS.

Quantificação por LC-MS/MS

As separações cromatográficas dos analitos presentes em 10 µL da amostra foram realizadas na coluna de fase reversa Eclipse XDB-C18, 4,6x50 mm, 1,8 µm da Agilent (USA) com auxílio do HPLC da Agilent (Agilent Technologies, Waldbronn, AL) composto de bomba quaternária, desgaseificador (modelo 1260), forno de coluna mantido a 25 °C e injetor automático (modelo 1290). Na separação foi utilizada como fase móvel A, a água com 0,1% de ácido fórmico e como fase móvel B, a ACN. O gradiente de eluição, com vazão de 0,7 mL min⁻¹, foi iniciado com 95% da fase móvel A, diminuindo linearmente para 5% em 5 min., condição esta mantida durante 1 min., para em seguida aumentar linearmente para a condição inicial (95% de A) em 2 min., que também foi mantida durante 1 min. antes de iniciar a próxima injeção.

A detecção e a quantificação dos analitos foram realizadas no espectrômetro de massas triploquadropolo híbrido ION TRAP 3200 QTRAP, ABSciex (Sciex, Toronto, CA), com fonte de ionização Turbo VTM atuando no modo de ionização TurboIonSpray[®] (“electrospray” – ESI) e equipado com bomba de infusão Harvard Apparatus (Holliston, MA, EUA). As análises de COC e BEZ foram realizadas com a fonte ESI no modo positivo (ESI⁺). A otimização dos parâmetros, dependente do composto (Tabela 1), foi realizada com a infusão individual das soluções padrão de COC e BEZ (1,0 µg mL⁻¹) no espectrômetro de massas. A vazão da infusão foi de 10 mL min⁻¹. Os parâmetros dependentes da fonte de ionização adotados neste trabalho foram: voltagem da ESI a 5500 V, temperatura da fonte a 650 °C, gás do nebulizador a 45 a. u., gás de aquecimento a 65 a. u. e gás da interface a 20 a. u.. A quantificação dos analitos por LC-MS/MS foi realizada no modo “Multiple Reaction Monitoring” (MRM), onde os analisadores de massas Q1 e Q3 selecionam os íons precursores e produtos, respectivamente, definindo uma transição de *m/z* específica. Neste método foram escolhidos os dois íons produto mais intensos, sendo o primeiro mais intenso usado na quantificação e o segundo na confirmação. A aquisição dos dados foi realizada com o software Analyst[®] versão 1.5.2.

TABELA 1

Valores dos parâmetros dependentes da COC e BEZ otimizados para detecção por ESI(+) - MS/MS

Composto	Íon	Íon	DP	EP	CEP	CE	CXP
	Precursor	Produto	(V)	(V)	(V)	(V)	(V)
Cocaína	304,2	182,2	36	4,0	14	27	4
		105,1	36	4,0	14	39	4
Benzoilecgonina	290,2	168,2	31	3,5	14	25	4
		105,1	31	3,5	14	37	4

DP=potencial de orifício; EP=potencial de entrada; CEP=potencial de entrada na cela de colisão; CE=energia de colisão; CXP=potencial de saída da cela de colisão.

Validação

A validação da metodologia apresentada foi realizada utilizando os parâmetros de seletividade, faixa de trabalho e linearidade, limite de detecção do método (LDM), limite de quantificação do método (LQM), precisão, exatidão e recuperação seguindo as orientações do INMETRO [9,10].

Para avaliar os parâmetros de validação foram preparadas curvas analíticas externas com solventes (sem matriz) e com matriz. Uma amostra de água superficial da Represa Guarapiranga, pertencente a um local mais preservado (GU106-04 - Figura 1, Tabela 2), foi escolhida para preparar a curva analítica com a matriz. As soluções eluídas (extratos) das 4 extrações de 250 mL foram coletadas no mesmo recipiente e divididas em 9 partes iguais, sendo uma para a determinação do branco da matriz e as outras para a adição das soluções mistura de padrões em 8 níveis de concentrações citados no item 'Reagentes'. As soluções das curvas analíticas sem e com matriz foram evaporadas até a secura e retomadas em 250 µL de ACN:H₂O (5:95, v/v). Todas as soluções das curvas analíticas preparadas sem matriz e com matriz foram analisadas 7 vezes por LC-ESI-MS/MS.

TABELA 2

COORDENADAS GEOGRÁFICAS DOS PONTOS DE COLETA DE AMOSTRA NA REPRESA GUARAPIRANGA.

Amostragem	Local de Amostragem (FIG.1)	Coordenada Geográfica	
GU000-01	GU-01	23°46.496' S	46°47.220' W
GU000-02	GU-02	23°45.295' S	46°46.187' W
GU000-03	GU-03	23° 44.522' S	46°46.136' W
GU106-04	GU-04	23°44.446' S	46°45.258' W
GU000-05	GU-05	23°44.575' S	46°44.242' W
*GU107-06	GU-06	23°45.012' S	46°43.615' W
GU108-07	GU-07	23°43.647' S	46°43.423' W
GU000-08	GU-08	23°42.969' S	46°43.612' W
GU109-09	GU-09	23°43.046' S	46°43.340' W
*GU105-10	GU-10	23°42.899' S	46°44.687' W
GU104-11	GU-11	23°42.534' S	46°43.449' W
GU103-12	GU-12	23°41.885' S	46°44.673' W
GU102-13	GU-13	23°41.580' S	46°43.573' W
*GU000-14	GU-14	23°40.782' S	46°43.559' W

*Áreas de monitoramentos da Companhia Estadual de Abastecimento de Água do Estado de São Paulo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

VALIDAÇÃO

As análises quantitativas foram realizadas no modo MRM monitorando 2 transições mais intensas para cada composto (Tabela 1) seguindo a orientação do guia da Comissão Européia [11] para obter um método sensível e seletivo. Segundo a literatura [12], a intensidade relativa dos íons produtos não deve ser superior a 20% e o tempo de retenção não varie mais do que 2%, quando comparados com os do padrão de referência. Neste estudo foram obtidas variações iguais ou inferiores a 8% e 0,8% para os desvios das razões de intensidades dos íons produtos e dos tempos de retenção, respectivamente. Portanto, a detecção por espectrometria é altamente seletiva sem identificação falsa dos compostos estudados. As determinações por LC-ESI-MS/MS são fortemente afetadas pelas ionização das impurezas da matriz (matéria orgânica natural, contaminantes não alvo, etc), que podem ocasionar um aumento ou supressão de sinal fornecendo menos sensibilidade e resultados imprecisos [13]. Para minimizar estas interferências foram confrontadas as curvas analíticas externas, sem matriz e com matriz. A Figura 2 mostra que as curvas analíticas da COC e BEZ apresentam uma diferença na inclinação, sendo mais acentuada para COC, o que indica a existência do efeito da matriz. Segundo Jelic e colaboradores [13], o efeito da matriz pode ser minimizado com a utilização de padrão interno substituto e marcado para cada analito. Nesse trabalho, devido à indisponibilidade desses padrões o efeito da matriz foi minimizado utilizando a curva analítica com matriz.

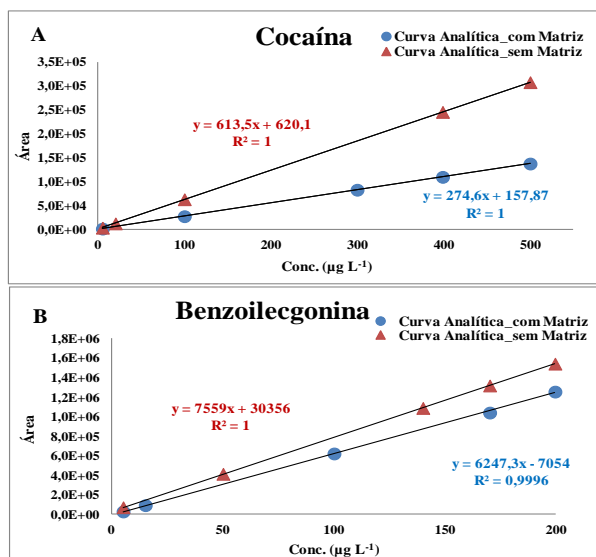


FIGURA 2

CURVA ANALÍTICA EXTERNA PREPARADA EM SOLVENTE E COM EXTRATO DA MATRIZ PARA COC (A) E BEZ (B).

A linearidade foi avaliada de acordo com os coeficientes de determinação (r^2) das curvas analíticas da COC e BEZ preparadas com matriz. A regressão linear foi obtida com 5 pontos e cada ponto com no mínimo 3 replicatas. Na faixa de concentração de 5,04 a 500,40 $\mu\text{g L}^{-1}$ para COC e 5,01 a 199,50 $\mu\text{g L}^{-1}$ para BEZ foram encontrados r^2 de 1,0000 tanto para a COC e o BEZ (Figura 2). Os valores de r^2 encontrados demonstram que o método é linear na faixa de trabalho apresentada, uma vez que o INMETRO [9] recomenda valores superiores a 0,90 para evidenciar um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão.

O LDM foi calculado pelo desvio padrão obtido nas 7 medidas do ponto de menor concentração da curva analítica do analito alvo, com matriz, multiplicado pelo o valor da abscissa *t-Student* para 6 graus de liberdade e 95% de confiança (2,447) [9]. O LDM determinado foi de 3 e 1,2 ng L^{-1} para COC e BEZ, respectivamente. O LQM foi calculado utilizando a média das 7 medidas do ponto de menor concentração da curva analítica do analito alvo, com matriz, mais cinco vezes o desvio padrão dessa média. O LQM obtido foi de 12 e 7,7 ng L^{-1} para COC e BEZ, respectivamente.

A precisão do método foi avaliada por meio dos valores do coeficiente de variação (CV%) em três níveis de concentração da curva analítica dos analitos, com matriz. Os níveis de concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$) e os respectivos CV%, em parênteses, determinados foram 50,00 (5%); 200,00(4%) e 500,40 (3%) para COC e 15,00 (1%); 100,00 (2%) e 199,50 (2%) para BEZ. Valores de CV% encontrados, $\text{CV}\% \leq 5$, evidenciam o bom desempenho do método proposto, uma vez que $\text{CV} < 20\%$ indicam métodos ideais para análises de traços [14].

A exatidão do método foi avaliada pelo índice Z (Z-score) onde valores de $Z < 2$ indicam resultados satisfatórios

[4]. Os valores obtidos para Z de 0,1 e 0,3 para COC e BEZ, respectivamente, evidenciam a exatidão do método proposto.

A recuperação do método foi estimada pela análise da amostra (GU106-04) fortificada com a solução padrão de COC e BEZ, em três níveis de concentrações. A amostra fortificada foi submetida ao procedimento proposto e a concentração determinada foi confrontada com o valor esperado. Na Tabela 3 estão os valores das concentrações adicionadas à amostra e a porcentagem de recuperação obtida para cada nível de concentração. Os valores de recuperações encontrados foram de 77 a 102% para COC e 73 a 91% para BEZ, que são aceitáveis para análises de resíduos [9].

TABELA 3
RESULTADOS DOS ESTUDOS DE RECUPERAÇÃO EM MATRIZ REALIZADOS EM TRÊS NÍVEIS DE FORTIFICAÇÃO.

Composto	Conc. (ng mL^{-1})	Recuperação (%)
Cocaína	20,04	102
	99,90	83
	399,00	77
Benzoilecgonina	15,00	82
	70,05	73
	170,10	91

Aplicação da Metodologia

Para demonstrar a aplicabilidade do método, amostras de água foram analisadas para investigar a ocorrência e a distribuição de COC e BEZ nas águas da Represa Guarapiranga. As amostras foram coletadas, em 14 pontos (Tabela 2), nas épocas de inverno (setembro de 2012) e verão (abril de 2013). A Tabela 4 apresenta as concentrações médias de COC e BEZ de 3 extrações e os respectivos valores das incertezas associadas, estimadas seguindo as orientações da EURACHEM [15].

TABELA 4
CONCENTRAÇÃO MÉDIA DE 3 EXTRAÇÕES E O VALOR DA INCERTEZA ASSOCIADA DE COC E BEZ NAS AMOSTRAS COLETADAS NAS ÉPOCAS DE INVERNO E VERÃO.

Ponto de Coleta	Inverno - Agosto de 2012		Verão - Abril de 2013	
	Cocaína (ng L^{-1})	Benzoilecgonina (ng L^{-1})	Cocaína (ng L^{-1})	Benzoilecgonina (ng L^{-1})
GU000-01	19±1	< LQM	26±2	< LQM
GU000-02	41±3	8,7±0,3	< LQM	< LQM
GU000-03	23±2	21±1	22±2	7,9±0,3
GU106-04	< LQM	26±1	< LQM	9±1
GU000-05	< LQM	27±1	35±3	16±1
GU107-06	94±8	58±3	44±3	21±1
GU108-07	197±8	71±4	70±3	29±2
GU000-08	74±5	42±1	< LQM	22±1
GU109-09	< LQM	40±1	32±2	15±1
GU105-10	< LQM	53±3	25±2	22±1
GU108-11	< LQM	41±2	18±1	18±1
GU103-12	530±28	139±7	261±8	42±3
GU102-13	< LQM	33±2	19±1	17±1
GU000-14	< LQM	31±1	13±1	16,7±0,3

LQM para COC=12 ng L^{-1}

LQM para BEZ=7,7 ng L^{-1}

Os perfis de ocorrência da COC e BEZ (Figuras 2) nas amostras de água da Represa de Guarapiranga coletadas nas épocas de chuva (verão) e seca (inverno) apresentaram o mesmo comportamento.

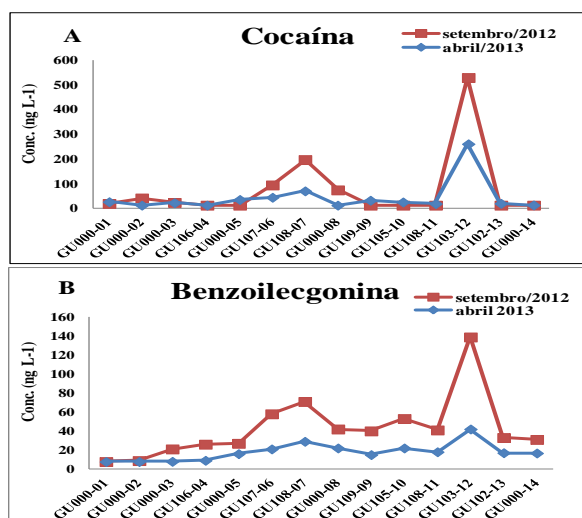


FIGURA 2

PERFIL DE OCORRÊNCIA DA COC (A) E BEZ (B) NAS AGUAS DA GUARAPIRANGA, NAS ÉPOCAS DE INVERNO E VERÃO.

Observa-se que o ambiente aquático da Represa Guarapiranga apresenta característica diferenciada que pode estar diretamente relacionada com o uso e ocupação do solo [16]. Os resultados quanto à ocorrência e distribuição da COC e BEZ dão indicação de que as áreas com maior descarga de esgoto e consequentemente maiores ocupação populacional e descarga de esgotos clandestinos são próximas às regiões do ponto de coleta entre GU107-06 a GU109-08 e GU108-11 a GU102-13. Os valores encontrados para a COC e BEZ foram maiores no período de seca provavelmente devido à diminuição do efeito de diluição predominante no verão chuvoso [17].

CONCLUSÃO

O método analítico apresentado mostrou-se adequado e sensível na determinação de cocaína e de seu principal metabólito (benzoilecgonina) em água superficial, podendo ser aplicado no monitoramento, de modo rotineiro e não invasivo, do consumo de cocaína dentro de uma comunidade. As análises das amostras de água coletadas na Represa Guarapiranga permitiram uma avaliação da ocorrência e distribuição da COC e BEZ. A presença da COC e BEZ em 64% e 79%, respectivamente, nas amostras de águas demonstra a existência de consumo de drogas, principalmente em duas regiões. Essas informações poderão ajudar na delimitação de região com necessidade de campanhas de prevenção ao uso de cocaína e auxiliar na avaliação do efeito dessa campanha com análise regular das águas em questão.

AGRADECIMENTO

Os autores desse trabalho agradecem a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio aos Projetos 2009/53898-9 e 2011/51064-3.

REFERÊNCIA

- SECRETARIA NACIONAL DE POLÍTICAS SOBRE DROGAS (Senad). Relat. Brasileiro sobre drogas. Brasília, 2009. Disponível em: <http://www.obid.senad.gov.br/portais/OBID/biblioteca/documentos/Relatorios/328379.pdf>
- KAROLAK, S.; NEFAU, T.; BAILLY, E.; SOLGADI, A.; LEVI, Y. *Estimation of illicit drugs consumption by wastewater analysis in Paris area (France.)* Forensic Science International, 200, 2010, 153-160.
- BONES, J.; THOMAS, K. V.; PAULL, B. *Using environmental analytical data to estimate levels of community consumption of illicit drugs and abused pharmaceuticals.* Journal of Environmental Monitoring, 9, 2007, 701-707.
- DAUGHTON, C. G.. In: DAUGHTON, C.G., JONE-LEPP, T.L. (Eds.). *Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Scientific and Regulatory Issues.* American Chemical Society, Washington, DC, 2001, 348-364.
- ZUCATO, E.; CHIABRANDO, C.; CASTIGLIONI, S.; CALAMARI, D.; BAGNATI, R.; SCHIAREA, S; FANELLI, R. *Cocaine in surface waters: a new evidence-based tool to monitor community drug abuse.* Environ Health, 4:14, 2005; 7 p.
- MATHIEU, C.; RIECKERMANN, J.; BERSET, J.D.; SCHURCH, S.; BRENNEISEN, R. *Assessment of total uncertainty in cocaine and benzoylecgonine wastewater load measurements.* Water Research, 45, 2011, 6650-6660.
- JURADO, A.; MASTROIANNI, N.; VÁSQUEZ-SUNÉ, E.; CARRERA, J.; TAUBAU, I.; PUJADES, E.; POSTIGO, C.; ALDA, M. L. DE; BARCELÓ, D. *Drugs of abuse in urban groundwater. A case study: Barcelona.* Science of the Total Environment, 424, 2012, 280-288.
- BARREK, S., CREN-OLIVÉ, C., WIEST, L., BAUDOT, R *Multi-residue analysis and ultra-trace quantitation of 36 priority substances from the European Water Framework Directive by GC-MS and LC-FLD-MS/MS in surface waters.* Talanta, 79, 2009, 712-722.
- INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Industrial. *Orientação sobre validação. de métodos de ensaios químicos.* Rio de Janeiro. DOQ-CGCRE-008. Revisão 04. Fev. 2011.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. *Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos.* Química Nova, 27: 5, 2004, 771-780.
- OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN COMMUNITIES L221, Commission Decision (2002/657/EC) of 12 August 2002 *Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results.* Brussels, Belgium.
- LÓPEZ-SERNA, R.; PETROVIC, M. BARCELÓ, D. *Development of a fast instrumental method for the analysis of pharmaceuticals in environmental and wastewaters based on ultra high performance liquid chromatography (UHPLC)-mass spectrometry (MS/MS).* Chemosphere, 85, 2011, 1390-1399.
- JELIC, A.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. *Multi-residue method for trace level determination of pharmaceuticals in solid samples using pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry.* Talanta, 80, 2009, 363-371.

- [14] HORWITZ, W.; ALBERT, R. *The Horwitz ratio (HorRat): a useful index of method performance with respect to precision*. Journal of AOAC International, 89:4, 2006
- [15] EURACHEM *.Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*, 3rd Edition. 2012
- [16] POSTIGO, C.; ALDA, M. J. L. de, BARCELÓ, D. *Analysis of drugs of abuse and their human metabolites in water by LC-MS2: a non-intrusive tool for drugs abuse estimation at the community level*. Trends in Anal. Chem., 27:11, 2008, 1053-1069.
- [17] SODRÉ, F. F.; MONTAGNER, C. C.; LOCATELLI, M. A. F.; JARDIM, W. F. *Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos em águas superficiais da região de Campinas (SP, Brasil)*. J. Braz. Soc. Ecotoxicol., 2, 2007, 187-196.