

Desenvolvimento de um método multi-resíduo para a determinação de poluentes emergentes por cromatografia líquida de ultra eficiência com deteção de massa, após extração em fase sólida



Departamento de Química e Bioquímica

Mestrado em Química

**2014**



Candidato: Inês Mafalda Oliveira Castro Ribeiro, Nº 200502736,  
200502736@fc.up.pt

Orientação FCUP: Paulo Almeida, pjalmeid@fc.up.pt

Orientação Empresa: Maria de Fátima Alpendurada, mfalpendurada@iaren.pt

Empresa: Instituto da Água da Região Norte - IAREN

**U.** PORTO

**FC** FACULDADE DE CIÊNCIAS  
UNIVERSIDADE DO PORTO

Departamento de Química e Bioquímica

Mestrado em Química

**2014**



*À minha família*



## *Agradecimentos*

À Professora Doutora Maria de Fátima Alpendurada, diretora do IAREN, pela oportunidade proporcionada, por todo o conhecimento, apoio e orientação concedidos.

Ao Professor Doutor Paulo Almeida, pela preciosa ajuda, paciência, apoio e orientação.

À Eng<sup>a</sup> Ana Guimarães pela supervisão, orientação, pelo conhecimento transmitido, pelo inestimável apoio, empenho e dedicação dispensados ao longo de todo o estágio.

Aos meus pais, Rui e Luísa, agradeço todo o esforço que foi feito para me proporcionar a educação a que tive acesso. Por sempre estarem presentes, pelo amor, carinho e apoio.

À minha irmã, Ana, por ser uma companheira de vida e me compreender como ninguém.

Ao meu namorado Daniel pelo amor, apoio incondicional e infinita paciência.

Às minhas amigas da FCUP, Ana, Amélia e Tânia que percorreram este caminho comigo e estiveram comigo nos bons e maus momentos.

À minha amiga Alda, agradeço para além da amizade de longa data, o incentivo e apoio ao longo desta etapa.

A todos os funcionários do IAREN, Vera, Cláudia, D<sup>a</sup> Lurdes, Marta Teixeira, Marta Lima, Juliana, Andreia, D<sup>a</sup> Maria José e Luís pela boa receção, amizade e simpatia.



## Resumo

*Neste trabalho, foi desenvolvido um método de determinação de 26 fármacos e estrogénios utilizando as técnicas de Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC) acoplada à deteção por espectrometria de massa (MS). Como os compostos estão presentes na água em concentrações muito baixas (na ordem dos  $\text{ng.L}^{-1}$ ) foi necessário utilizar a extração em fase sólida (SPE) de forma a estes poderem ser detetados e quantificados por MS. Para além da extração por SPE, foi também otimizado o método de determinação por on-line-SPE-UPLC-MS/MS, onde todo o processo de extração, separação e deteção é automatizado e acontece numa única etapa e em tempos mais curtos. Estes métodos otimizados foram aplicados em amostras de água do Rio Leça.*

*Na otimização do método de determinação dos compostos por UPLC-MS/MS, foram testadas as composições da fase móvel e modo de preparação das soluções de injeção. A fase móvel composta por água e metanol e a preparação da solução com acidificação com ácido fórmico (10mM) foram as condições testadas que permitiram melhores resultados de modo a obter a separação, deteção e quantificação dos analitos.*

*Na extração em fase sólida, a coluna escolhida e que providenciou a extração de todos os compostos foi a coluna com características de equilíbrio hidrofílico – lipofílico (HLB).*

*Na otimização do método on-line-SPE-UPLC-MS/MS foram testados, no UPLC, gradientes de fase móvel de metanol e água sendo a temperatura da coluna de 40°C. O eluente usado no SPE-online foi metanol 5% em água. Estas condições foram as que garantiram melhor separação dos 26 analitos estudados.*

*Pelo método de determinação por UPLC-MS/MS com prévia extração por SPE, foram detetados e quantificados, em amostras de água do Rio Leça, os fármacos ketoprofeno ; bezafibrato; diclofenac; azitromicina; bisoprolol; ibuprofeno; gemfibrozil e alprazolam. Os limites de deteção e quantificação para estes compostos variaram entre 0,0006 - 0,57  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e 0,002 – 0,8  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , respetivamente. A taxa média de recuperação para a extração destes compostos foi da ordem de 89,3%.*

*Para o método de determinação por on-line-SPE-UPLC-MS/MS, obtiveram-se limites de detecção e quantificação superiores, quando comparados com o anterior método – 0,01-0,16  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e 0,03 – 1,8  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , respetivamente. Os compostos detetados na mesma amostra para este método foram ketoprofeno; bezafibrato; diclofenac; bisoprolol; ibuprofeno; alprazolam; indapamida e a nimesulida. Comparativamente com o método de extração off-line, o método baseado no processo online permitiu encontrar a indapamida e nimesulida mas não possibilitou a identificação de azitromicina, paracetamol, gemfibrozil e diazepam. A taxa média de recuperação para este método de extração automatizada foi da ordem de 88,7%.*

## Abstract

*The aim of this project is to develop a method of determination of 26 drugs and estrogens, using Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) technics attached to a Mass Spectrometer detection mechanism. Since the compounds in the water, have such low concentrations (in the range of the  $\text{ng.L}^{-1}$ ), it was necessary to use a Solid Phase Extraction to be able to detect and quantify them through the MS.*

*Besides the SPE's extraction, the on-line-SPE-UPLC-MS/MS was also optimized. On the latest, the whole process of extraction, separation and detection is automated and occurs in a single step and shorter periods of time. These optimized methods, were implemented in water samples from the Leça's River.*

*Throughout the optimization of the method using UPLC-MS/MS, the mobile phase composition and separation methods of the injection solutions were tested. The mobile phase which consists of methanol and water and the preparation of the acidified solution with formic acid (10mM), were the ones that achieved the best results in the analytes' separation, detection and quantification.*

*In the solid phase extraction, the cartridge which provided the extraction of all the compounds was the one with hydrophilic and lipophilic retention characteristics (HLB).*

*During the method optimization of the on-line-SPE-UPLC-MS/MS were tested, in the UPLC, different mobile phase gradients consisting of metanol and water. The cartridge temperature was 40°C and the eluant used in the SPE-online was 5% methanol in water. These conditions were the ones that conceded the best separation of the 26 analytes.*

*Using the determination method by UPLC-MS/MS with prior extraction by SPE, were detected and quantified in Rio Leça's water, the pharmaceuticals: ketoprofeno ; bezafibrato; diclofenac; azitromicina; bisoprolol; ibuprofeno; gemfibrozil e alprazolam. The detection and quantification limits for these compounds were within the interval of 0,0006 - 0,57  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e 0,002 – 0,8  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , respectively. The average recovery rate ranged between 89.3 %.*

*For the determination method by on-line-SPE-UPLC-MS/MS, higher detection and quantification limits were obtained, when compared with the previous method - 0,01-0,16*

$\mu\text{g.L}^{-1}$  and  $0,03 - 1,8 \mu\text{g.L}^{-1}$ , respectively. The compounds detected in this method using the same sample were: *ketoprofeno; bezafibrato; diclofenac; bisoprolol; ibuprofeno; alprazolam; indapamide and nimesulide*. Comparing with the off-line extraction method, the one based in the online process, allowed us to find *indapamide and nimesulide*, however, it didn't identify the *azitromicine, paracetamol, gemfibrozil and diazepam*. The average recovery rate for this automated extraction method was 88.7 %.



# Índice

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>I</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>III</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>V</b>
<b>ÍNDICE</b> .....	<b>VIII</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>XI</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b> .....	<b>XIII</b>
<b>ACRÓNIMOS</b> .....	<b>XV</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
1.1. APRESENTAÇÃO ESTÁGIO.....	16
1.2. OBJETIVO DO TRABALHO.....	16
1.3. ESTRUTURA RELATÓRIO.....	17
<b>2 POLUENTES EMERGENTES</b> .....	<b>18</b>
<b>3 TÉCNICAS UTILIZADAS</b> .....	<b>24</b>
3.1. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA (UPLC-MS/MS).....	24
3.1.1. <i>UPLC-Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência</i> .....	25
3.1.2. <i>Deteção por Espectrometria de massa</i> .....	27
3.2. SPE – <i>SOLID-PHASE-EXTRACTION</i> – EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA.....	29
3.3. <i>ON-LINE-SPE-UPLC-MS/MS</i> .....	31
<b>4 EXECUÇÃO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>33</b>
4.1. PREPARAÇÃO E ACONDICIONAMENTO DE SOLUÇÕES.....	33
4.2. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE UPLC-MS/MS.....	34
4.2.1. <i>Otimização das condições de deteção</i> .....	34
4.2.2. <i>Otimização das condições de separação por UPLC-MS/MS</i> .....	36
4.3. OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO POR SPE.....	38
4.4. OTIMIZAÇÃO POR <i>ON-LINE-SPE-UPLC-MS/MS</i> .....	41
4.5. VALIDAÇÃO.....	42
4.5.1. <i>Linearidade/Gama de trabalho</i> .....	43
4.5.2. <i>Limite de deteção (LD) e Limite de quantificação (LQ)</i> .....	44
4.5.3. <i>Repetibilidade</i> .....	45
4.5.4. <i>Recuperação</i> .....	45

4.6. APLICAÇÃO DO MÉTODO A UMA AMOSTRA DO RIO LEÇA .....	45
4.6.1. <i>Recolha da amostra</i> .....	45
4.6.2. <i>Análise da amostra</i> .....	46
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>47</b>
5.1. OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE UPLC-MS/MS .....	47
5.2. OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO POR SPE (SOLID PHASE EXTRACTION) .....	49
5.2.1. <i>Escolha da coluna para extração por SPE</i> .....	50
5.2.2. <i>Avaliação do Volume de Rotura</i> .....	51
5.3. OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO <i>ON-LINE-SPE-UPLC-MS/MS</i> .....	53
5.3.1. <i>Escolha do Gradientes</i> .....	53
5.4. VALIDAÇÃO .....	55
5.4.1. <i>Linearidade/Gama de trabalho</i> .....	55
5.4.2. <i>Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)</i> .....	57
5.4.3. <i>Repetibilidade</i> .....	58
5.4.4. <i>Recuperação</i> .....	59
5.5. APLICAÇÃO DOS MÉTODOS A AMOSTRAS DO RIO LEÇA .....	61
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>63</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>66</b>
<b>ANEXO A. ....</b>	<b>69</b>
<b>ANEXO B. ....</b>	<b>73</b>



## Índice de Figuras

Figura 1 - Fluxograma representativo da via de chegada dos fármacos às águas de consumo (adaptado) <sup>5</sup> .....	19
Figura 2 - Classes terapêuticas detetadas no meio ambiente. Dados recolhidos de 134 artigos publicados entre 1997 e 2009. <sup>10</sup> .....	20
Figura 3 - Figura esquemática da composição geral de um sistema cromatográfico adaptado [19]25	
Figura 4 - Relação entre a altura de pratos teóricos e a velocidade linear para diferentes diâmetros das partículas de enchimento <sup>22</sup> .....	26
Figura 5 - Exemplos da estrutura do material de enchimento das colunas cromatográficas ACQUITY UPLC BEH C18 e C8, BEH Shield RP18 e BEH Phenyl .....	27
Figura 6 - Representação esquemática do funcionamento da ionização por Electrospray [20] .....	28
Figura 7 - Representação esquemática do analisador de Triplo Quadrupolo [20] .....	29
Figura 8 - Esquema representativo das diferentes fases da extração por SPE <sup>25</sup> .....	30
Figura 9 - Esquema do funcionamento do sistema de extração por SPE <i>on-line</i> .....	31
Figura 10 - Programa Intellistart ® usado na determinação dos parâmetros de espectrometria de massa .....	34
Figura 11 - Fotografia do sistema UPLC-MS/MS, Waters Corp .....	36
Figura 12 - Fotografia da coluna ACQUITY® UPLC BEH C18, 150 x 2,1 mm, 1,7 µm .....	37
Figura 13 - Gradiente e fases móveis utilizadas .....	37
Figura 14 – Esquema constituição dos adsorventes usados neste estudo, HLB e MAX, respetivamente <sup>33</sup> .....	38
Figura 15 - Fotografia do ASPEC XL - soild phase extraction autosampler, Gilson .....	39
Figura 16 - Fotografia do equipamento utilizado na secagem das colunas - VacElut SPS 24, Varian40	
Figura 17 - Fotografia das colunas Oasis HLB e Oasis MAX, respetivamente .....	40
Figura 18 - Fotografia do Sistema de colunas de extração por SPE <i>on-line</i> - Oasis HLB direct connect HP 20µm, 2.1x30 mm, Waters® .....	41
Figura 19 - Rio Leça – Ponte do Carro – local onde foi recolhida a amostra .....	46
Figura 20 - Fotografias do procedimento de recolha da amostra no Rio Leça e transporte da mesma. ....	46
Figura 21 - Comparação dos sinais obtido após extração com colunas HLB e MAX dos vinte e seis fármacos e estrogénios usados na escolha da coluna .....	51
Figura 22 - Gráfico sinal obtido para cada composto vs volume extraído, usado na determinação do volume de rotura.....	52



## Índice de Tabelas

Tabela 1 - Fármacos e estrogénios estudados neste trabalho, grupo terapêutico, fórmula molecular, massa molar, pKa e num CAS.....	22
Tabela 2 - Condições utilizadas no detetor de massa .....	35
Tabela 3 - Parâmetros de espectrometria de massa e iões monitorizados.....	35
Tabela 4 - Condições otimizadas para a extração dos 26 compostos pelo método de on-line-SPE-UPLC-MS/MS.....	42
Tabela 5 - Concentrações usadas nas curvas de calibração para o método de SPE <i>offline</i> para os compostos.....	43
Tabela 6 - Concentrações usadas nas curvas de calibração para o método de SPE <i>online</i> para os compostos.....	43
Tabela 7 - Composição das fases móveis testadas para a otimização do processo cromatográfico.....	48
Tabela 8 - Parâmetros obtidos da curva de calibração dos 26 fármacos e estrogénios pelo método de injeção direta.....	49
Tabela 9 - Método de extração por SPE <i>offline</i> utilizado neste estudo .....	50
Tabela 10 - Gradientes e condições de composição de eluente e temperatura da coluna testados no método de extração por on-line-SPE-UPLC-MS/MS .....	54
Tabela 11 - Gama de trabalho para os 26 fármacos e estrogénios, as equações da reta e coeficientes de correlação para a gama de linearidade obtida no método de extração por SPE <i>off-line</i> .....	55
Tabela 12 - Gama de trabalho para os 26 fármacos e estrogénios, as equações da reta e respetivos coeficientes de correlação para a gama de linearidade obtida no método de extração por SPE <i>on-line</i> .....	56
Tabela 13 - Valores dos limites de deteção e quantificação obtidos pelo método de SPE <i>off-line</i> e <i>on-line</i> .....	57
Tabela 14 - Resultados média concentração, desvio padrão e coeficiente de variação dos 26 compostos em estudo pelo método de extração por SPE <i>off-line</i> .....	58
Tabela 15 - Resultados média concentração, desvio padrão e coeficiente de variação dos 26 compostos em estudo pelo método de extração por SPE <i>on-line</i> .....	59
Tabela 16 - Percentagem de recuperação dos compostos usando o método de SPE <i>off-line</i> e desvio padrão relativo .....	60
Tabela 17 - Percentagem de recuperação dos compostos usando o método de SPE <i>on-line</i> e desvio padrão relativo .....	60
Tabela 18 - Valores da média das concentrações obtidas na amostra do rio Leça pelo método de SPE-on-line-UPLC-MS/MS.....	61



## Acrónimos

ACN	– Acetonitrilo
AINE	- Anti Inflamatórios Não Esteroides
APCI	– Ionização Química à Pressão Atmosférica ( <i>Atmospheric-Pressure Chemical Ionization</i> )
BSM	- Sistema de Solvente Binário ( <i>Binary Solvent Manager</i> )
ESI	– Ionização de Nebulização Eletrónica (Electro Spray Ionization)
FEDESA	– Federação Europeia de Saúde Animal
HLB	– Equilíbrio Hidrofílico - Lipofílico (Hydrophilic-Lipophilic-balanced)
HPLC	– Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (High Performance Liquid Chromatography)
IFARMED	– Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde
LC	– Cromatografia Líquida (Liquid Chromatography)
LC-MS/MS	– Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massa Sequencial (Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry);
LD	– Limite de Detecção
LQ	– Limite de Quantificação
MAX	– Mixed-mode cation Exchange sorbent
MeOH	– Metanol
MS	– Espectrometria de Massa (Mass Spectrometry);
QSM	- Sistema de Solvente Quaternário ( <i>Quaternary Solvent Manager</i> )
Re	– Recuperação
SPE	– Extração em fase sólida (Solid Phase Extraction)
TIC	– Total Ion Chromatogram
UPLC-MS/MS	– Cromatografia Líquida de Ultra - Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massa Sequencial (Ultra Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry)

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1. APRESENTAÇÃO ESTÁGIO

O estágio descrito neste relatório teve lugar no IAREN (Instituto da Água da Região Norte) e realizou-se entre os meses de Setembro de 2013 a Junho de 2014 no âmbito do estágio curricular do 2º ciclo de estudos em Química da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

O IAREN é uma entidade de utilidade pública fundada em Março de 1991. Trata-se de uma associação, sem fins lucrativos, que congrega a Universidade do Porto, Autarquias, Serviços Municipalizados, Administrações Regionais de Saúde e Empresas Privadas. As instalações atuais situam-se em Matosinhos desde 2003. Este instituto tem como objetivo o exercício da atividade científica e tecnológica em Investigação e Desenvolvimento Experimental (I&DE) e outras atividades científicas e tecnológicas no domínio da qualidade da água.

## 1.2. OBJETIVO DO TRABALHO

O presente trabalho desenvolvido teve como principal objetivo o desenvolvimento de um método de determinação de fármacos e estrogénios em águas do rio Leça usando a Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência com deteção por espetrometria de massa e a Extração em Fase Sólida. Desenvolveu-se em paralelo um método de deteção e determinação dos mesmos fármacos e estrogénios utilizando uma técnica

automatizada de on-line-SPE-UPLC-MS/MS. Após a otimização dos métodos, os mesmos foram testados em amostras de água do Rio Leça.

### **1.3. ESTRUTURA RELATÓRIO**

Neste relatório de estágio, é apresentada inicialmente uma introdução sobre poluentes emergentes (Capítulo 2), fazendo uma breve referência aos compostos mais utilizados, via de chegada à população e ecotoxicidade dos mesmos. No Capítulo 3 são abordadas de forma mais teórica as técnicas que foram utilizadas na execução deste trabalho.

De seguida é apresentada a execução experimental subdividida pelos métodos utilizados (Capítulo 4). Posteriormente é feita a apresentação dos resultados e respetiva discussão (Capítulo 5). Por último, no Capítulo 6, encontram-se resumidas as principais ilações referentes a todo o projeto.

# 2 POLUENTES EMERGENTES

O desenvolvimento de métodos analíticos mais sensíveis têm permitido a identificação e quantificação de compostos químicos em concentrações cada vez menores.<sup>1</sup> Nos últimos 20 anos tem havido uma maior preocupação quanto à presença de certos compostos químicos denominados poluentes emergentes, devido ao aumento da presença destes em águas residuais.<sup>2</sup> Estes poluentes são produtos químicos sem estatuto regulamentar, cujos efeitos sobre o meio ambiente e a saúde humana são ainda desconhecidos.<sup>3</sup> Destes compostos, denominados poluentes emergentes, fazem parte alguns fármacos de diferentes classes terapêuticas como: analgésicos, anti-inflamatórios, antibióticos, antidepressivos, diuréticos, contrastes de raio X, desreguladores endócrinos, além de componentes usados em filtros UV, surfatantes e produtos de higiene pessoal.<sup>4</sup>

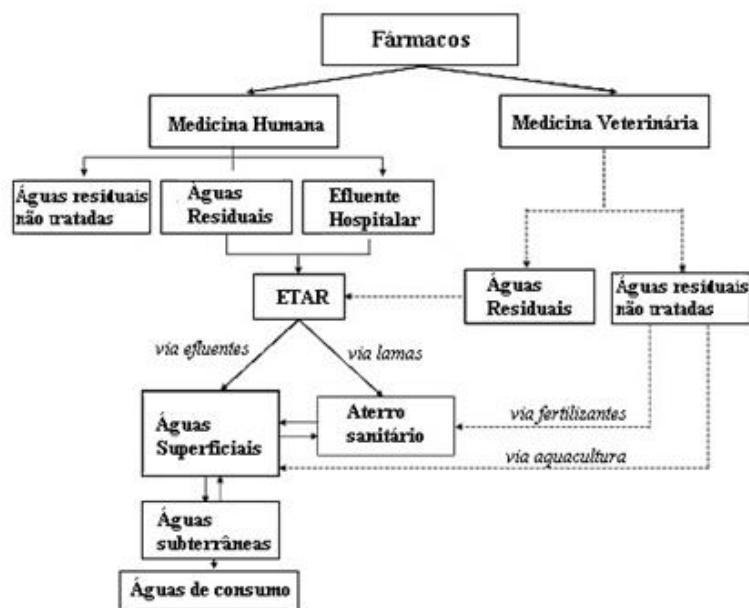


Figura 1 - Fluxograma representativo da via de chegada dos fármacos às águas de consumo (adaptado) <sup>5</sup>

Depois de administrados, muitos fármacos são transformados em metabolitos e excretado através de fezes e urina numa mistura que pode conter fármaco que não foi metabolizado pelo organismo e os seus metabolitos.

A maioria das ETAR's convencionais usa diversos mecanismos de remoção de compostos orgânicos. No entanto, muitos dos desreguladores endócrinos e fármacos apresentam características físico-químicas que favorecem a sua permanência no efluente final, sem remoção significativa destes poluentes. <sup>6</sup>

A contaminação com fármacos surge mais frequentemente em águas residuais municipais que potenciam a libertação destes compostos diretamente no meio ambiente. Os efluentes domésticos e hospitalares representam uma parte significativa de contaminação por produtos farmacêuticos. <sup>7</sup> Estes fármacos quase sempre persistem e possuem bioacumulação no ambiente, principalmente no meio aquático <sup>8</sup> (Figura 1).

As classes terapêuticas que mais prendem, atualmente, a atenção da comunidade científica são anti-inflamatórios não esteroides (AINE), antibióticos e hormonas sexuais, <sup>9</sup> como é apresentado na Figura 2.

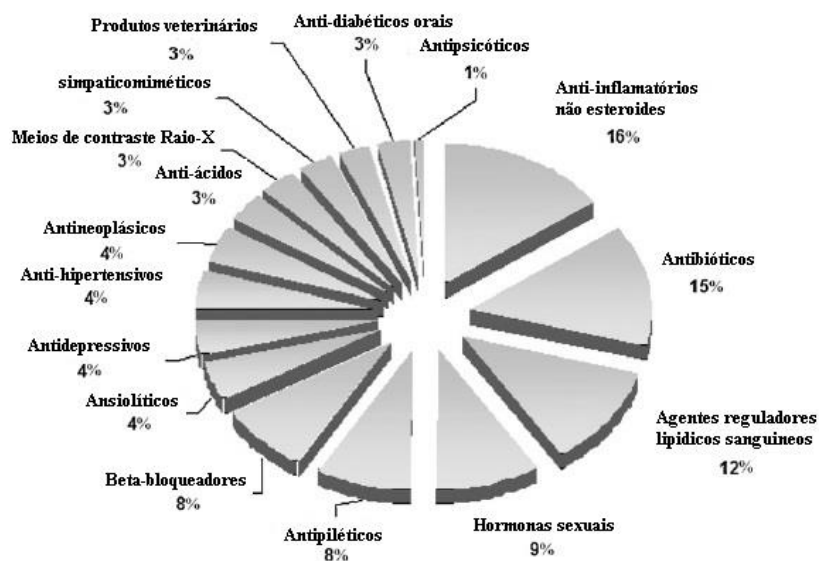


Figura 2 - Classes terapêuticas detetadas no meio ambiente. Dados recolhidos de 134 artigos publicados entre 1997 e 2009. <sup>10</sup>

Alguns dos efeitos agudos e crónicos causados por fármacos, pertencentes a diferentes classes terapêuticas, individualmente ou em mistura, merecem ser analisados.

Dentro dos AINE, o diclofenac é o que apresenta toxicidade mais aguda no meio ambiente fazendo sentir os seus efeitos em concentrações abaixo dos 100 ng.L<sup>-1</sup>.<sup>11</sup> Um exemplo do seu efeito revela-se na truta arco-íris que apresentou alterações citológicas no fígado, rins e guelras depois de 28 dias de exposição a apenas 1 µg.L<sup>-1</sup> de diclofenac. Mais casos têm sido relatados noutros animais e plantas aquáticas. Diferentes estudos revelaram a presença deste fármaco em efluentes de ETAR's em duas cidades da europa de cerca de 2,4 e 1,4 µg.L<sup>-1</sup>.<sup>12</sup>

Os antibióticos são classificados como extremamente tóxicos em microrganismos e muito tóxicos em algas<sup>13</sup>. A maior preocupação prende-se com o desenvolvimento de mecanismos de resistência a bactérias. Testes de toxicidade aguda efetuados em algas mostraram uma inibição de crescimento das algas quando expostas a agentes antibacterianos. Embora não se tenha verificado efeitos diretos nalguns peixes, deve ter-se em conta que as algas constituem a base da cadeia alimentar e um decréscimo da sua população afeta diretamente o equilíbrio do ecossistema aquático. Como exemplo, a ciprofloxacina foi encontrada em efluentes hospitalares com valores entre 2 e 11 µg.L<sup>-1</sup>, em afluentes de estações de tratamento de águas residuais entre 90 e 1000 ng.L<sup>-1</sup> e nos efluentes de 6 a 310 ng.L<sup>-1</sup>.<sup>9,14</sup>

As hormonas sexuais são compostos que apresentam grande atividade biológica sendo notórios os seus efeitos mesmo em doses muito baixas. A exposição de peixes selvagens a estes compostos em rios do Reino Unido que recebem efluentes de ETAR's mostrou efeitos adversos. A reprodução por exemplo, os peixes masculinos mostraram ter simultaneamente gónadas femininas e masculinas.<sup>10</sup>

O etinilestradiol (EE2) é um estrogénio sintético usado em contraceptivos orais. Este composto demonstrou em diferentes estudos ter efeitos em peixes, nomeadamente na redução da fertilidade, no aumento de produção de ovos, diminuição das características sexuais masculinas e aumento da população feminina a níveis abaixo de  $1\text{ng.L}^{-1}$ . Note-se que em concentrações acima de  $3,5\text{ng.L}^{-1}$  de EE2, observou-se a total feminização dos peixes.<sup>15</sup> Como exemplo, o etinilestradiol foi detetado em águas superficiais nos Estados Unidos a níveis de  $73\text{ng.L}^{-1}$  e em Itália (Rio Tibre) a  $1\text{ng.L}^{-1}$ .<sup>10</sup>

Os inibidores seletivos de recaptção de serotonina (ISRS), fluoxetina e paroxetina, usados em antidepressivos, possuem efeitos adversos nos organismos aquáticos. A fluoxetina e a paroxetina mostraram efeitos na reprodução em peixes zebra, induzindo a desova e a maturação dos ovócitos em grandes concentrações bem como a deformação de células em algas verdes em níveis de  $13,6\text{ug.L}^{-1}$ .<sup>16</sup>

A fluoxetina foi detetada em afluentes de ETAR's a concentrações entre  $0,4$  e  $18,7\text{ng.L}^{-1}$  e em efluentes em níveis mais baixos ( $0,12$  e  $8,4\text{ng.L}^{-1}$ ).<sup>10</sup>

Os fármacos estudados neste trabalho encontram-se descritos na Tabela 1 e são exemplos de poluentes emergentes.

Tabela 1 - Fármacos e estrogénios estudados neste trabalho, grupo terapêutico, fórmula molecular, massa molar, pKa e num CAS.

Grupo terapêutico	Fármaco	Fórmula Molecular	Massa Molar	pKa	Cas nº
<b>Analgésico e antipirético</b>	Paracetamol	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	151.2	-4.4-9.46	103-90-2
<b>Anti-inflamatórios não Esteróides</b>	Diclofenac	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>2</sub> NNaO <sub>2</sub>	318.1	-2,1 – 4	15307-79-6
	Ibuprofeno	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	206.3	4,91	15687-27-1
	Ketoprofeno	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	254.3	-7.5-3.88	22071-15-4
	Naproxeno	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	230.3	-4.8-4.19	22204-53-1
	Nimesulida	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S	308.3	-8.9-6.86	51803-78-2
<b>Reguladores Lipídicos</b>	Bezafibrato	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> ClNO <sub>4</sub>	361.8	-0.84-3.83	41859-67-0
	Gemfibrozil	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub>	250.3	-4.8-4.42	25812-30-0
	Simvastatina	C <sub>25</sub> H <sub>38</sub> O <sub>5</sub>	418.6	-2.8-14.91	79902-63-9
<b>Antibióticos</b>	Azitromicina	C <sub>38</sub> H <sub>72</sub> N <sub>2</sub> O <sub>12</sub>	749	9.57-12.43	83905-01-5
	Ciprofloxacina	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	331.4	5.76-8.68	85721-33-1
<b>Antidepressivos</b>	Alprezolam	C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> ClN <sub>4</sub>	308.8	2.39	28981-97-7
	Bromazepam	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> N <sub>3</sub> BrO	316.2	2.9-11	1812-30-2
	Diazepam	C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> ClO	284.7	4.9-5.7	439-14-5
	Paroxetina	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> FNO <sub>3</sub>	374.8	9.77	61869-08-7
	Fluoxetina	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> F <sub>3</sub> NO	309.3	8.7-9.5	54910-89-3
<b>Diuréticos</b>	Furosemida	C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> ClO <sub>5</sub> S	330.7	4-10	54-31-9
	Hidroclorotiazida	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> N <sub>3</sub> ClO <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	297.7	-2.7-9.09	58-93-5
	Indapamida	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	365.8	0.1-8.85	26807-65-8
<b>Cardiotónicos</b>	Bisoprolol	C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>4</sub>	325.4	9.67-14.09	66722-44-9
<b>Anti ulceroso</b>	Omeprazole	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	345.4	4.77-9.29	73590-58-6
<b>Estrogénios</b>	17- $\alpha$ -etinilestradiol	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	296.4	10.3	57-63-6
	$\beta$ -estradiol	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	272.4	10.4	50-28-2
	Estrona	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	270.4	10.3	53-16-7
	Progesterona	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	314.5	<0	57-83-0
	Desogestrel	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> O	310.5	-1.5-18	54024-22-5

Estima-se que a nível global, o consumo de fármacos produzido e usado por seres humanos seja de 100 000 toneladas por ano, correspondendo a um consumo médio de aproximadamente 15 g.a<sup>-1</sup> *per capita*.<sup>17</sup>

Em Portugal, a informação relativa à prevalência ambiental e à distribuição de compostos farmacêuticos é escasso. No entanto, segundo o INFARMED, existe informação sobre a tendência de consumo a nível nacional. No ano de 2011, os fármacos azitromicina, ciprofloxacina, alprazolam, diazepam, fluoxetina, paroxetina, paracetamol, bisoprolol, simvastatina, omeprazole, ibuprofeno, nimesulida e a hormona sexual etinilestradiol foram dos mais consumidos dentro de cada grupo terapêutico<sup>18</sup>. É portanto, de extrema importância, a monitorização destas substâncias em ambientes aquáticos, nomeadamente em águas de rio (que são utilizadas diariamente no quotidiano dos consumidores).

# 3 TÉCNICAS UTILIZADAS

No presente trabalho, desenvolveu-se um método que utiliza a técnica de cromatografia líquida com detecção com espectrometria de massa e a técnica de pré concentração por extração em fase sólida – SPE. Para além deste método com estas técnicas associadas, testou-se um método que utiliza a técnica de extração por SPE de forma automatizada em linha com o UPLC-MS/MS. Neste capítulo apresentam-se alguns conceitos teóricos associados a estas técnicas.

## **3.1. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA (UPLC-MS/MS)**

A cromatografia líquida acoplada à detecção por espectrometria de massa está a tornar-se cada vez mais comum devido ao progresso feito no desenvolvimento das interfaces do LC-MS que permite converter eficazmente os analitos dissolvidos da fase móvel do LC em iões em fase gasosa que posteriormente são analisados com o detetor de massa. Estas duas técnicas acopladas providenciam boa sensibilidade e seletividade em comparação com outras técnicas de detecção. A capacidade de medir compostos a níveis de  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  e diferenciar moléculas com diferentes massas e padrões de fragmentação faz desta uma técnica de grande valor analítico.<sup>19</sup>

### 3.1.1. UPLC-CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA

A evolução da cromatografia líquida tem vindo a ser maior nos últimos tempos, desde o HPLC até, mais recentemente, ao UPLC. Esta técnica, em comparação com o HPLC, permite uma melhor resolução cromatográfica, velocidade e sensibilidade da análise.

O princípio geral da cromatografia líquida é o mesmo do HPLC e do UPLC e assenta no facto de uma determinada substância, ao passar através de uma coluna com determinada fase estacionária é arrastada por um fase móvel (eluente) obtendo um tempo de retenção típico, dependente do fluxo, comprimento e diâmetro da coluna.

A instrumentação de um LC é constituída geralmente por uma bomba, um injetor, uma coluna, um detetor e um sistema de tratamento de dados (Figura 3). Na coluna analítica ocorre a separação cromatográfica. A coluna é constituída por partículas microporosas com diâmetros na ordem dos  $\mu\text{m}$ . O processo cromatográfico inicia-se com a injeção da amostra no início da coluna e ocorre a separação dos componentes quando os analitos e a fase móvel são bombeados, a alta pressão, pela coluna. O detetor responde através de um sinal á chegada do analito, sendo o sinal ao longo do tempo representado como um cromatograma. Essa resposta é posteriormente analisada e processada com ferramentas informáticas específicas (workstation) também responsável pelo controlo de todo o sistema.

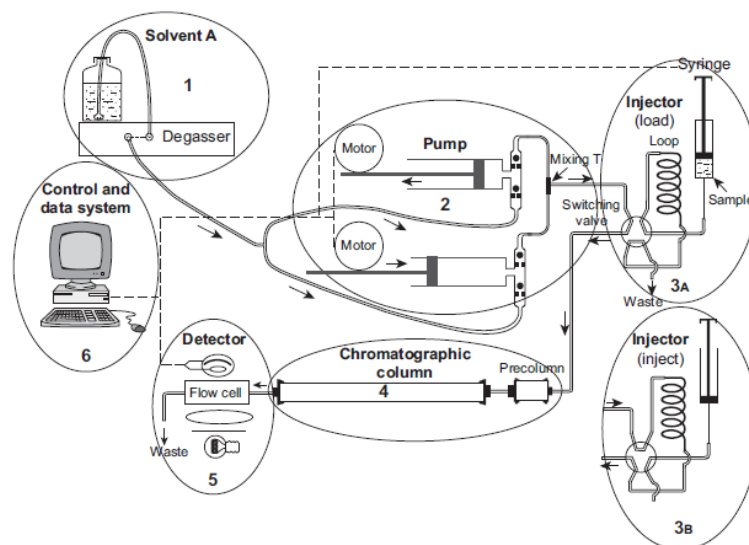


Figura 3 - Figura esquemática da composição geral de um sistema cromatográfico adaptado [19]

A principal diferença no princípio geral usado em UPLC é a fase estacionária que usa partículas no seu enchimento com diâmetros inferiores a 2  $\mu\text{m}$ , enquanto nas colunas usadas em HPLC convencional as partículas têm tipicamente tamanhos entre os 3 e os 5  $\mu\text{m}$ . O princípio subjacente desta evolução é governado pela equação de Van Deemter (equação 1). Esta equação é uma fórmula empírica que descreve a relação entre  $H$  e  $v$  - a velocidade linear (fluxo da fase móvel) e a altura de prato teórico (eficiência da coluna).

$$H = A + \frac{B}{v} + C \cdot v \quad \text{Equação 1}$$

Em que  $A$ ,  $B$  e  $C$  são termos e  $v$  corresponde à velocidade linear do fluxo de gás de arraste. O termo  $A$  é independente da velocidade e é menor quanto menores forem as partículas de enchimento da coluna. O termo  $B$  diz respeito à tendência de difusão axial das moléculas. Este termo é dividido pela velocidade,  $v$ , devido ao facto do seu efeito ser diminuído com o aumento do fluxo.  $C$  é a resistência cinética do processo de equilíbrio da separação e traduz-se pelo intervalo de tempo envolvido no movimento do gás na fase estacionária e é proporcional a  $v$ .<sup>20</sup>

Como se pode verificar na Figura 4, partículas menores podem reduzir significativamente a altura equivalente do prato teórico resultando numa maior eficiência e achatamento da curva de Van Deemter. Consequentemente, o aumento da taxa de fluxo da fase móvel não tem consequências negativas na eficiência, ao contrário do que era verificado em partículas maiores.<sup>21</sup>

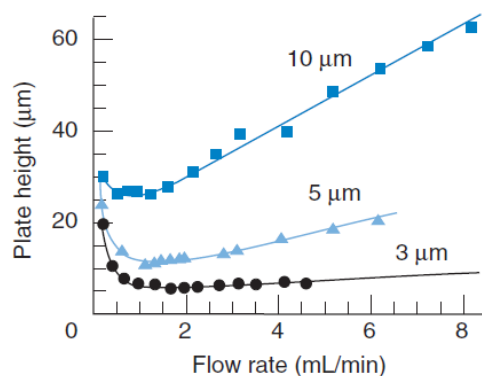


Figura 4 - Relação entre a altura de pratos teóricos e a velocidade linear para diferentes diâmetros das partículas de enchimento<sup>22</sup>

O aparecimento do UPLC exigiu o desenvolvimento de um novo sistema instrumental para cromatografia líquida, para poder tirar partido do desempenho de separação. A

pressão utilizada nestes sistemas também é muito mais elevada (de 8000 a 15000 psi) comparando com a pressão utilizada em HPLC (de 2500 a 5000 psi).<sup>20</sup>

As colunas e o seu empacotamento usado nesta técnica também possuem características diferentes. As colunas ACQUITY UPLC BEH C18 e C8 (Figura 5) têm características mais universais, por incorporarem ligações químicas de ligandos trifuncionais providenciando o uso de compostos com intervalos de pH maiores. As colunas com o enchimento BEH Shields RP18 e BEH Phenyl são usadas como complemento das anteriores de forma a providenciar maior seletividade e tempos de vida.

20

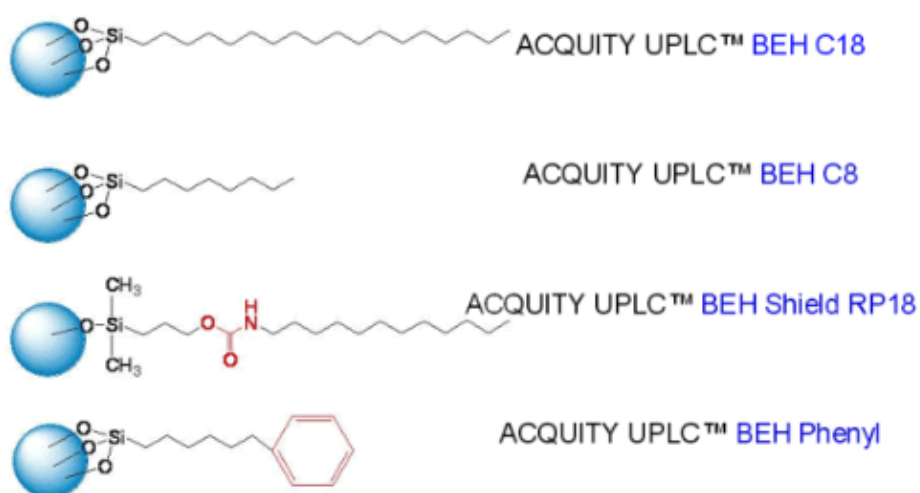


Figura 5 - Exemplos da estrutura do material de enchimento das colunas cromatográficas ACQUITY UPLC BEH C18 e C8, BEH Shield RP18 e BEH Phenyl

As vantagens deste sistema são atribuídas à diminuição do tempo de análise, e o aumento da sensibilidade, ao aumento do alcance dos métodos multiresíduo, ao grande poder de resolução, aos custos de operação mais reduzidos e à diminuição do consumo de solventes. A principal desvantagem deve-se sobretudo ao uso de pressões elevadas que exigem mais manutenção do equipamento e reduzem o tempo de vida das colunas.

### 3.1.2. DETEÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSA

A espectrometria de massa é uma das técnicas analíticas mais versáteis e é usada nas mais diversas áreas da ciência devido à sua precisão e sensibilidade.

A espectrometria de massa (MS) é uma técnica que mede com precisão a massa molecular de moléculas e átomos convertendo-as em iões carregados, podendo também

ser determinada a estrutura de uma molécula. Esta técnica é também capaz de fornecer informação quantitativa de determinado analito a níveis muito baixos.

A medição por espectrometria de massa utiliza moléculas carregadas porque, ao contrário das espécies neutras, é mais fácil de manipular o seu movimento e direção e, assim, serem detetados.

Numa primeira fase existe a ionização, que converte as moléculas ou átomos do analito em espécies iónicas em fase gasosa. Numa segunda fase, há separação e análise de massa com base na razão massa-carga ( $m/z$ ) e, finalmente, a corrente de iões resultante desta separação de massas é medida, amplificada e convertida numa informação digital que é traduzida em forma de espectro.

Existem diversos métodos de ionização que são utilizados em LC-MS como ionização química, ionização eletrónica, APCI (*Atmospheric-Pressure Chemical Ionization*), MALDI (*Matrix-assisted laser desorption/ionization*) e *Electrospray* (ESI) – usado neste estudo

Este tipo de ionização (ESI), representado na Figura 6, é o processo de formação de gotas altamente carregadas sob o efeito de um intenso campo elétrico à pressão atmosférica. A evaporação do solvente converte essas gotas carregadas em iões em fase gasosa. A solução da amostra flui através de um capilar metálico que é mantido a voltagens elevadas (3 – 4kV). A diferença de potencial entre o capilar e o contra elétrodo produz um campo electroestático, formando uma névoa de iões carregados à medida que a solução passa pela fonte. A evaporação das gotas carregadas é assistida pelo fluxo de azoto quente. Os iões do analito de interesse são depois dirigidos, através de uma série de lentes até ao espectrómetro de massa.

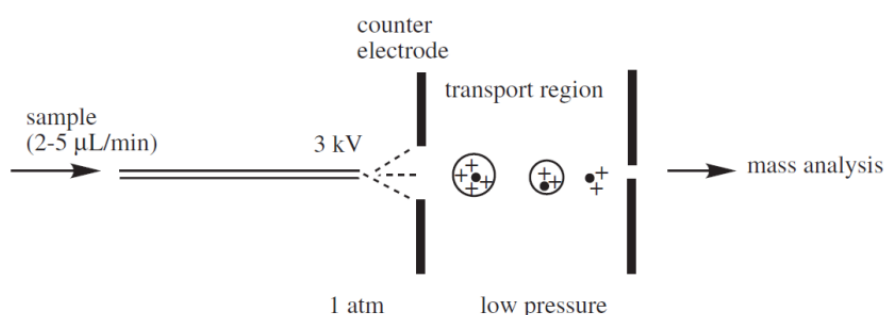


Figura 6 - Representação esquemática do funcionamento da ionização por Electrospray [20]

O analisador do tipo triplo-quadrupolo (Figura 7) é o mais usado em sistema MS/MS. É constituído por três quadrupolos em série em que cada quadrupolo é composto por quatro barras de metal alinhadas paralelamente.

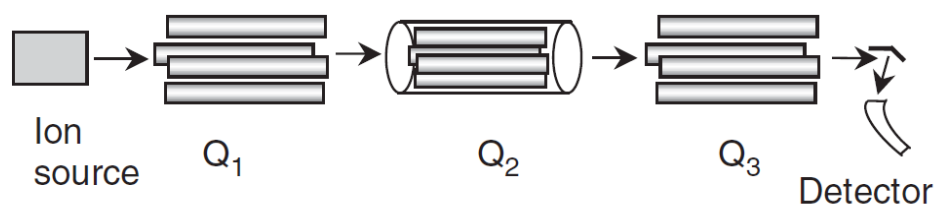


Figura 7 - Representação esquemática do analisador de Triplo Quadrupolo [20]

No primeiro quadrupolo (Q1), os íons são separados de acordo com a razão massa carga,  $m/z$ , e dirigidos para o segundo quadrupolo (Q2) onde estes são sujeitos a dissociação induzida por colisão (CID). No terceiro quadrupolo (Q3) são novamente separados e encaminhados para o detector.<sup>23</sup>

### 3.2. SPE – SOLID-PHASE-EXTRACTION – EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

A extração em fase sólida é uma técnica muito usada e popular na preparação de amostras devido à sua rapidez e seletividade.

A versatilidade desta técnica permite usá-la para diversos fins tais como a purificação, pré-concentração, dessalinização e derivação. Nos últimos anos, tem havido um aumento no uso de SPE como etapa de preparação das amostras no estudo e desenvolvimento de metodologias analíticas, muito devido ao facto do aumento da variedade de materiais adsorventes usados na extração em fase sólida.<sup>24</sup>

O princípio da extração por SPE envolve a partição do soluto por duas fases: a fase sólida (adsorvente) e a fase líquida (matriz da amostra ou solvente com analito). O SPE permite-nos limpar interferentes numa matriz e/ou concentrar o analito o suficiente para ser detetado.<sup>25</sup>

O processo típico de extração em fase sólida envolve quatro passos. No primeiro, a coluna de SPE é acondicionada com um solvente de polaridade adequada. Num segundo passo, é feita a lavagem com solvente semelhante ao da amostra. Posteriormente, fazendo passar a amostra com o analito, este é retido no adsorvente enquanto os outros compostos (sem interesse analítico) são eluídos. A última etapa, envolve a utilização de um solvente com mais afinidade com o analito, que o remove do adsorvente para ser recolhido. (Figura 8)

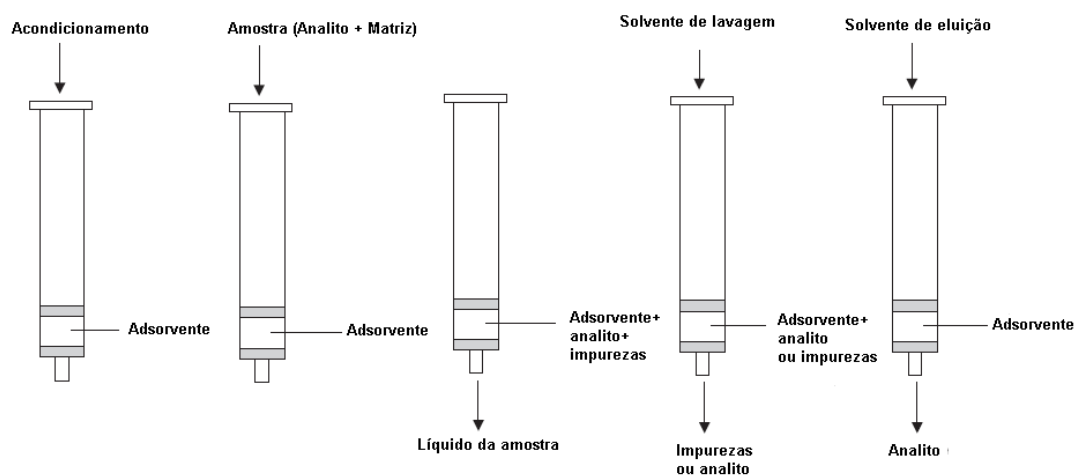


Figura 8 - Esquema representativo das diferentes fases da extração por SPE <sup>25</sup>

A seleção do adsorvente apropriado depende dos mecanismos de interação entre o adsorvente (fase sólida) e o analito. Estas interações, por sua vez, dependem das propriedades hidrofóbicas, polares e iónicas tanto do analito como da fase sólida. Os mecanismos de retenção mais comuns em SPE são baseadas nas forças de Van der Waals, pontes de hidrogénio, dipolo-dipolo e electroestáticas.

Os diferentes adsorventes apresentam propriedades que podem ser aplicadas a uma grande variedade de compostos. Existem três tipos distintos de extração:

**Extração em fase normal** – Envolve um analito polar, uma matriz moderadamente apolar (ex: acetona, hexano) e uma fase estacionária polar. A retenção do analito nestas condições deve-se às interações (pontes de hidrogénio e interações  $\pi$ - $\pi$ ) entre o grupo funcional polar do analito e aos grupos polares do adsorvente da fase estacionária. O uso de solventes mais polares do que a matriz da amostra permite a quebra destas ligações, eluindo os compostos adsorvidos pela fase sólida. Os materiais adsorventes polares usam como base gel de sílica modificada com grupos hidroxilo.

**Extração por permuta iónica** - baseia-se nas atrações electroestáticas entre o grupo funcional com carga do analito e os grupos com carga que estão ligados à superfície de sílica da fase estacionária; os compostos aniónicos são isolados no grupo de uma amina quaternária ligada à superfície da sílica do adsorvente. Os catiónicos por sua vez são isolados usando grupos de ácido sulfónico ligados à superfície de sílica.

**Extração em fase reversa** - envolve matriz (fase móvel) com propriedades polares ou moderadamente polares e uma fase sólida (fase estacionária) com propriedades apolares. A retenção de analitos orgânicos, existentes em soluções polares (água), neste

tipo de materiais adsorventes devem-se sobretudo às forças de van der Waals. Solventes não tão polares são usados para eluir o composto, pois são capazes de quebrar estas forças entre o composto e o adsorvente em materiais de fase reversa. Os materiais usados em extração por SPE em fase reversa são baseados em carbono (grafite), polímeros (estireno/divinilbenzeno), polímeros revestidos e ligações de sílica (ambos revestidos com polímeros hidrofóbicos).<sup>25</sup>

Neste trabalho, a extração por SPE tem o objetivo de concentrar o analito, uma vez que os compostos em estudo se encontram de forma muito diluída nas matrizes naturais e é necessária a sua concentração para poder ser detetada.

### 3.3. ON-LINE-SPE-UPLC-MS/MS

No método de extração por SPE- *on-line*, consegue-se uma maior rapidez no processo de extração, uma redução do volume utilizado da amostra, uma simplificação do processo de preparação da amostra e uma diminuição do consumo de solventes. Além disso, obtém-se maior reprodutibilidade dos resultados nos ensaios efetuados.<sup>26</sup>

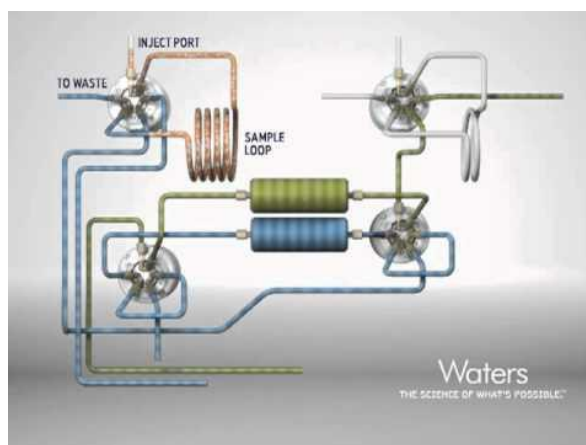


Figura 9 - Esquema do funcionamento do sistema de extração por SPE *on-line*

No processo de SPE *on-line* convencional, existe um sistema de bombas quaternário que permite, através de um *software*, programar todo o processo que já foi referido anteriormente em SPE *off-line*, de acondicionamento, lavagem e eluição. É possível utilizar gradientes de 4 diferentes solventes, usando colunas de extração apropriadas para o SPE *on-line*, com grande durabilidade.

A amostra é injetada num loop de 5,00 mL e o sistema quaternário de solvente (QSM) vai arrastar a amostra até à primeira coluna de extração onde é concentrado o analito. O sistema de solvente binário (BSM) elui, através de um gradiente o analito dessa coluna,

levando-o de seguida para a coluna cromatográfica onde ocorre a separação. Enquanto este processo acontece, o QSM, reequilibra a segunda coluna de extração preparando-a para a segunda amostra. Esta segunda amostra é injetada novamente no loop e arrastada pelo QSM, efetuando o mesmo processo que foi feito na primeira coluna, em que é eluído pelo BSM até à coluna cromatográfica enquanto o QSM reequilibra novamente a coluna 1 e assim sucessivamente. (Figura 9)

O sistema on-line-SPE-UPLC-MS/MS usado neste trabalho trata-se de um sistema adaptado pelo fabricante especificamente para o equipamento existente no laboratório e é usado num método de determinação de pesticidas em águas de consumo humano em análise de rotina. Neste sistema não existe a bomba quaternária sendo utilizado um sistema isocrático que permite o acondicionamento, lavagem e colocação da amostra na coluna.

# 4 EXECUÇÃO EXPERIMENTAL

## 4.1. PREPARAÇÃO E ACONDICIONAMENTO DE SOLUÇÕES

Neste trabalho foram utilizados padrões dos seguintes fármacos e estrogénios apresentados na Tabela 1 (Pág. 22). Estes foram adquiridos à Fluka, Sigma e Riedel-de-Haën.

As soluções padrão *stock* individuais foram preparadas em metanol com uma concentração de cerca de  $1000 \text{ mg.L}^{-1}$ , armazenadas à temperatura de  $-18^{\circ}\text{C}$  e abrigadas da luz. A solução da mistura de todos os compostos foi também preparada em metanol com cerca de  $10,0 \text{ mg.L}^{-1}$ , à exceção do Bromazepam, Alprazolam e Diazepam que foram usados numa mistura em separado com uma concentração de  $1,00 \text{ mg.L}^{-1}$ .

Tanto os solventes usados na extração por SPE como as fases móveis usadas no LC foram preparadas com água ultrapura (ultrapure MilliQ water - Millipore, Molsheim, France), ácido fórmico a cerca de 98% (Fluka, Germany), metanol e acetonitrilo (Carlo Erba), ambos com purezas compatíveis para uso em HPLC.

## 4.2. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE UPLC-MS/MS

Em UPLC-MS/MS, é necessário inicialmente ajustar as condições de detecção. Depois deste passo, passar-se-á a otimização das condições de separação por cromatografia líquida com as condições de detecção otimizadas anteriormente e dadas ao sistema.

### 4.2.1. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE DETECÇÃO

O primeiro passo foi a otimização das condições do método de espectrometria de massa. Os 26 fármacos e estrogénios em estudo neste trabalho foram estudados no detetor de massa triplo quadrupolo (UPLC-MS/MS, Waters), em modo positivo e negativo, com a utilização da opção *Intellistart*® do *software*. (Figura 10)

Usaram-se soluções padrão preparadas em metanol, com concentração de cerca de 10 mg/L e injetaram-se, até 3 compostos em simultâneo, diretamente no detetor de massa. A informação adquirida para cada composto é dada através de um relatório gerado que nos indica o ião precursor, os dois iões filhos, e respetiva energia de cone, a energia de colisão e o modo de ionização. As condições usadas no detetor de massa são apresentadas na Tabela 2. Estes parâmetros são alteráveis mas usaram-se os mesmos que foram utilizados no método já desenvolvido e referido de determinação de estrogénios.

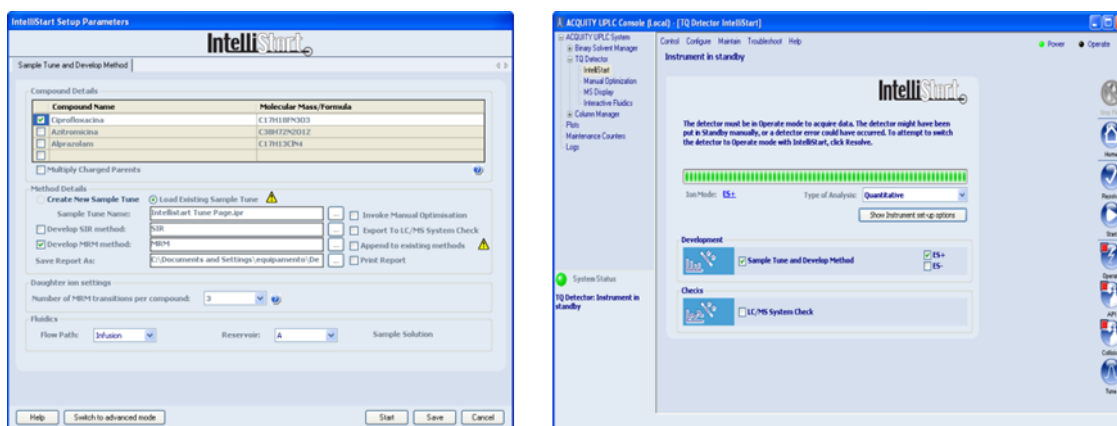


Figura 10 - Programa IntelliStart® usado na determinação dos parâmetros de espectrometria de massa

Tabela 2 - Condições utilizadas no detetor de massa

Condições MS	
Temperatura (fonte)	150°C
Temperatura desolvatação	350°C
Fluxo gás cone	1 L.H <sup>-1</sup>
Fluxo desolvatação	845 L.H <sup>-1</sup>
Gás de colisão	Árgon

Na Tabela 3 encontram-se os parâmetros determinados para a criação do método de LC-MS. No primeiro passo é feito um Scan que encontra o ião principal e efetua um varrimento de voltagens de cone de modo a apresentar a mais adequada para posterior detecção. Num segundo passo, é feito o Daughter Scan com o propósito de encontrar os principais fragmentos do ião principal e onde são encontradas as melhores energias para esses fragmentos. Na tabela 3, encontram-se os parâmetros de espectrometria de massa e iões monitorizados obtidos para cada um dos compostos em estudo.

Tabela 3 - Parâmetros de espectrometria de massa e iões monitorizados

Composto	lão precursor	lão Filho 1	Energia cone (eV)	lão Filho 2	Energia cone (V)	Energia de colisão (eV)	Modo ESI
<b>Hidroclorotiazida</b>	296,0	205,1	23	269,2	19	52	-
<b>Paracetamol</b>	152,0	92,9	21	110,0	18	38	+
<b>Ciprofloxacina</b>	232,2	245,3	2	231,3	38	42	+
<b>Bisoprolol</b>	326,3	74,0	26	116,1	18	46	+
<b>Omeprazole</b>	344,2	179,1	29	194,1	14	28	-
<b>Furosamida</b>	329,1	78,0	30	205,1	23	36	-
<b>Azitromicina</b>	749	83,0	48	158,2	40	58	+
<b>Indapamida</b>	366,2	117,2	35	132,1	16	43	+
<b>Paroxetina</b>	330,2	69,99	28	192,3	21	40	+
<b>Nimesulida</b>	307,1	198,3	26	229,1	28	32	-
<b>Ketoprofeno</b>	255,2	105,1	24	177,2	18	38	+
<b>Naproxeno</b>	229,1	141,1	48	170,2	17	15	-
<b>Fluoxetina</b>	310,2	43,98	13	148,1	8	22	+
<b>Estrona</b>	269,3	145,1	38	183,2	36	70	-
<b>17-<math>\alpha</math>-Ethinilestradiol</b>	295,3	145,1	36	159,1	40	40	-
<b>Bezafibrato</b>	360,2	85,0	16	274,3	18	34	-
<b><math>\beta</math>-estradiol</b>	271,2	145,2	42	183,2	38	68	-

Diclofenac	294,1	178,2	28	214,2	21	22	-
Progesterona	315,3	97,0	22	109,1	24	42	+
Ibuprofeno	207,2	119,1	22	---	---	24	+
Gemfibrozil	249,2	121,0	15	127,1	11	26	-
Desogestrel	309,3	96,9	34	---	---	56	-
Simvastatina	419,4	199,2	12	185,4	10	30	+
Bromazepam	316,0	182,1	34	209,2	24	45	+
Diazepam	285,1	154,1	28	192,2	31	50	+
Alprezolam	309,2	281,2	25	205,2	42	55	+

#### 4.2.2. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE SEPARAÇÃO POR UPLC-MS/MS

Para a otimização da cromatografia, foi utilizado um sistema UPLC-MS/MS (Waters (Figura 11). A separação cromatográfica foi obtida com uma coluna ACQUITY® UPLC BEH C18, 150 x 2,1 mm, 1,7 µm (Figura 12) que, por ser uma C18 possui características mais universais e considerando as características muito distintas dos compostos utilizados, esta é sem dúvida a escolha mais adequada para este estudo.<sup>27</sup>



Figura 11 - Fotografia do sistema UPLC-MS/MS, Waters Corp



Figura 12 - Fotografia da coluna ACQUITY® UPLC BEH C18, 150 x 2,1 mm, 1,7 µm

Para as condições iniciais, partiu-se de um gradiente e composição de fases móveis de um protocolo já existente no laboratório, o qual está devidamente certificado para os estrogénios.

O programa inicia com 20% da fase orgânica, subindo até 60 % em 6 minutos, voltando a subir até 100% de metanol aos 8 minutos, mantendo-se durante 6 segundos. O programa retoma as condições iniciais em 4 minutos (Figura 13). O fluxo usado foi de  $0,3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e a temperatura da coluna de  $35^\circ\text{C}$ .

	Time (min)	Flow (mL/min)	%A	%B	Curve
1	Initial	0.300	20.0	80.0	Initial
2	6.00	0.300	60.0	40.0	6
3	8.00	0.300	100.0	0.0	6
4	8.10	0.300	20.0	80.0	6
5	12.00	0.300	20.0	80.0	6
6					

Figura 13 - Gradiente e fases móveis utilizadas

Realizaram-se alguns testes de fases móveis, em que se variou o solvente orgânico entre acetonitrilo e metanol e o solvente aquoso em que se utilizava água ultrapura ou água acidificada, fase móvel que proporcionou a separação e identificação de todos os compostos foi conseguida com um gradiente usando metanol e água ultrapura. A preparação de solução também foi testada e foi usada acidificação com ácido fórmico 10 mM na preparação das soluções de injeção.

Depois do método ter proporcionado satisfatória separação, traçou-se uma reta de calibração dos compostos usando 7 padrões contendo uma mistura de todos os fármacos e estrogénios com concentração de 5,00; 7,50; 10,0; 25,0; 50,0; 75,0 e 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .

### 4.3. OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO POR SPE

Atendendo ao objetivo deste trabalho de estágio que é a deteção e determinação de fármacos e estrogénios em águas de rio e ao facto destes compostos nestas matrizes poderem encontrar-se a níveis na ordem dos  $\text{ng.L}^{-1}$ , é necessária uma etapa de pré-concentração efetuada por extração em fase sólida (SPE) para se conseguir estudar estes compostos por UPLC-MS/MS,

Depois de alguma pesquisa bibliográfica <sup>28,29,30,31,32</sup> testaram-se as colunas HLB (*Hidrophilic-lipophilic-balanced*) e MAX (*Mixed-mode anion Exchange*) da Oasis. A primeira possui características de retenção hidrofílicas e lipofílicas. É mais resistente a pH's extremos e tem boa retenção de compostos ácidos, neutros ou básicos. A segunda, também resistente a diferentes valores de pH, mas é recomendada para compostos mais ácidos. Ambos são usados em extração em fase reversa.<sup>33</sup>

Na Figura 14, encontra-se um esquema da constituição das colunas de extração testadas.

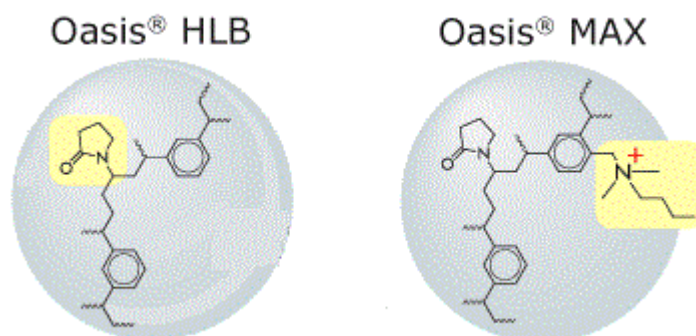


Figura 14 – Esquema constituição dos adsorventes usados neste estudo, HLB e MAX, respetivamente<sup>33</sup>

Estes dois tipos de colunas foram testados de modo a escolher a que tem uma maior taxa de recuperação para todos os compostos. Para isso, foram usadas soluções da mistura de todos os fármacos e estrogénios.

Na extração utilizou-se o equipamento ASPEC XL – *solid phase extraction autosampler* (Gilson) na extração e eluição (Figura 15) e VacElut SPS 24 (Varian), Figura 16, na

secagem das colunas. A evaporação foi feita em fluxo de azoto proveniente de um gerador de azoto. O padrão da mistura de fármacos usado na extração foi preparado em água ultrapura acidificada com 10mM de ácido fórmico com uma concentração de  $0,1\mu\text{g.L}^{-1}$ .

Para além do material de vidro corrente em laboratório, foram utilizados tubos de centrífuga, com capacidade de 10 mL, micropipetas de volume variável, balanças analíticas e *vials* próprios para o sistema UPLC-MS/MS.

Acondicionaram-se as colunas de SPE (HLB e MAX), representadas na Figura 17, com 3mL de metanol seguida de 3mL de água ultrapura. Posteriormente foi adicionada um volume de 500 mL de solução contendo todos os padrões e depois feita uma lavagem com metanol 10 %, em água ultrapura. Após esta etapa, foi feita a secagem das colunas sob vácuo e, de seguida eluição com 6 mL de metanol.<sup>32</sup> O volume eluído foi submetido a evaporação sob um fluxo de azoto, até secagem completa dos extratos. Estes foram reconstituídos em 500  $\mu\text{L}$  de Metanol e Água (25:75) sendo esse volume injetado num *loop* de 10  $\mu\text{L}$  no sistema UPLC-MS/MS.



Figura 15 - Fotografia do ASPEC XL - solid phase extraction autosampler, Gilson



Figura 16 - Fotografia do equipamento utilizado na secagem das colunas - VacElut SPS 24, Varian



Figura 17 - Fotografia das colunas Oasis HLB e Oasis MAX, respetivamente.

Depois de escolhido o tipo de coluna adequada, foi testado o volume de rotura. A determinação do volume de rotura é feita de forma experimental, fazendo passar volumes diferentes (100, 250, 500, 750 mL) de uma solução com  $0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$  dos fármacos a estudar. O resultado dessas extrações é depois analisado por UPLC-MS/MS e é traçado um gráfico que relaciona a resposta de cada um dos compostos com o volume da solução.

Com o volume de rotura e coluna testada e escolhida, traçaram-se curvas de calibração. Estas devem possuir pelo menos 5 pontos, devendo apresentar linearidade ao longo da gama considerada como gama de trabalho. As gamas de trabalho escolhidas foram separadas por três grupos de compostos. A gama mais alta engloba nove padrões de

0,075  $\mu\text{g.L}^{-1}$  a 7,5  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , a segunda de 0,01 a 1  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e a terceira de 0,001 a 0,1  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Estes valores foram escolhidos de acordo com uma prévia determinação de limites de quantificação.

Cada padrão foi sujeito a extração, secagem e reconstituição nas iguais condições referidas acima.

#### 4.4. OTIMIZAÇÃO POR *ON-LINE-SPE-UPLC-MS/MS*

Como já foi referido acima, a instrumentação usada neste trabalho para o método de *on-line-SPE-UPLC-MS/MS* é um sistema adaptado ao equipamento existente no laboratório. Este método adaptado é utilizado na determinação de pesticidas em águas de consumo humano em análise de rotina, pelo laboratório, estando este método acreditado.

As colunas de extração usadas foram Oasis HLB *direct connect* HP 20 $\mu\text{m}$ , 2.1x30 mm, Waters® (Figura 18). Foram testados diversos gradientes de solventes da fase móvel, até ser encontrado um que fosse capaz, em todo o processo, de extrair e eluir de forma eficaz os analitos. Para isso, usou-se, como ponto de partida, o gradiente usado no método cromatográfico por injeção direta no UPLC-MS e a partir dele fizeram-se variações de gradiente e percentagem de metanol no eluente e temperatura da coluna.



Figura 18 - Fotografia do Sistema de colunas de extração por SPE *on-line* - Oasis HLB *direct connect* HP 20 $\mu\text{m}$ , 2.1x30 mm, Waters®

Os testes foram efetuados com soluções da mistura de todos os compostos, preparada em água acidificada com ácido fórmico a 10 mM. O volume injetado num loop de 5mL e, depois da extração, é eluído um volume de 5 $\mu\text{L}$ , ou seja, concentrado 1000 vezes, que é dirigido para a coluna cromatográfica e sujeito a separação e posterior deteção.

As condições usadas que permitiram melhores resultados encontram-se descritas na Tabela 4

Tabela 4 - Condições otimizadas para a extração dos 26 compostos pelo método de on-line-SPE-UPLC-MS/MS

T coluna (°C)		40
Eluente		%5 MeOH em água
Gradiente da fase móvel		
% Metanol	% Água	t/min
15	85	
100	0	5,00
100	0	7,00
15	85	7,10
15	85	12,0

A calibração efetuada para este método deve possuir pelo menos 5 pontos, devendo obter linearidade ao longo da gama de trabalho. As gamas de trabalho escolhidas foram separadas em dois grupos de compostos com duas gamas de trabalho diferentes. A gama mais alta engloba nove padrões de 0,075 ug.L<sup>-1</sup> a 7,5 ug.L<sup>-1</sup> e a segunda de 0,01 a 1 ug.L<sup>-1</sup>. Estes valores foram escolhidos de acordo com uma prévia determinação de limites de quantificação.

#### 4.5. VALIDAÇÃO

Os parâmetros a estudar dependem das características do método, do tipo e complexidade da amostra e da experiência que o laboratório possa ter na utilização do método. Depende ainda do propósito do método, podendo alguns dos parâmetros abaixo apresentados não serem avaliados, se tal for adequado. Os parâmetros de validação de métodos analíticos incluem: especificidade, seletividade, capacidade de identificação, gama de trabalho, linearidade, sensibilidade, exatidão, precisão (repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade), limite de deteção (LD), limite de quantificação (LQ) e robustez. Deve salientar-se que o método pode ser considerado validado mesmo que alguns parâmetros não se enquadrem nos limites estabelecidos na literatura, desde que sejam conhecidos e também adequados aos objetivos do estudo a ser realizado.

Neste trabalho, ambos os métodos não possuem informação suficiente para serem validados uma vez que devido á escassez de tempo não foi possível testar diversos parâmetros. Assim, os parâmetros que foram avaliados foram: a gama de trabalho, a linearidade, os limites de deteção e quantificação, repetibilidade e percentagem de recuperação para os dois métodos.

## 4.5.1. LINEARIDADE/GAMA DE TRABALHO

A linearidade traduz a proporcionalidade entre a propriedade medida e a concentração do analito dentro de um intervalo específico. Este intervalo deve conter pelo menos 5 concentrações (pontos) diferentes. O ajuste dos dados ao modelo selecionado foi feito através de um coeficiente de correlação que deverá ser o mais próximo de 1.

Para a determinação da linearidade foi preparada uma curva de calibração com nove pontos, sendo que a gama de trabalho não foi a mesma para todos os compostos. Os 26 compostos foram divididos em 3 gamas de trabalho para a extração por SPE *off-line* e 2 para o método de SPE *on-line*. As concentrações dos padrões usados nas curvas de calibração para os dois métodos encontram-se nas Tabela 5 e Tabela 6.

Tabela 5 - Concentrações usadas nas curvas de calibração para o método de SPE *offline* para os compostos

SPE <i>off-line</i>									
Concentração em $\mu\text{g.L}^{-1}$									
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
Ciprofloxacina	0,075	0,1	0,25	0,5	0,75	1	2,5	5,0	7,5
Omeprazole									
Simvastatina	0,01	0,025	0,05	0,075	0,1	0,25	0,5	0,75	1
Azitromicina									
Restantes compostos	0,001	0,0025	0,005	0,0075	0,01	0,025	0,05	0,075	0,1

Tabela 6 - Concentrações usadas nas curvas de calibração para o método de SPE *online* para os compostos

SPE <i>on-line</i>									
Concentração em $\mu\text{g.L}^{-1}$									
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
Grupo A	0,075	0,1	0,25	0,5	0,75	1	2,5	5,0	7,5
Grupo B	0,01	0,025	0,05	0,075	0,1	0,25	0,5	0,75	1

Em que:

**Grupo A:** Hidroclorotiazida, Ketoprofeno, Bezafibrato, Naproxeno, Diclofenac, Estrona,  $\beta$ -estradiol, 17 $\alpha$ -Ethinilestradiol, Fluoxetina, Azitromicina, Ciprofloxacina, Omeprazole, Furosamida, Bisoprolol e Paroxetina

**Grupo B:** Nimesulida, Ibuprofeno, Desogestrel, Progesterona, Paracetamol, Indapamida, Gemfibrozil, Simvastatina, Alprazolam, Diazepam, Bromazepam

Os padrões foram injetados e procedeu-se à construção das curvas de calibração. Verificou-se uma relação linear em muitos compostos, no entanto noutros verificou-se uma relação exponencial. Nesses casos reduziu-se a gama de trabalho para o mínimo de 5 pontos a fim de obter linearidade.

#### 4.5.2. LIMITE DE DETEÇÃO (LD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)

O limite de deteção é considerado como a menor concentração em analito presente na amostra que pode ser detetado sob as condições experimentais estabelecidas para o método analítico utilizado.

Para o caso de métodos cromatográficos a estimativa do limite de deteção (LD) pode ser feita tendo em conta a seguinte relação:

$$LD = \frac{3,3 \times S_{y/x}}{m} \quad \text{equação 2}$$

onde:

$S_{y/x}$  é o desvio residual da curva de calibração

$m$  é o declive da reta

O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração em analito que pode ser determinada numa amostra, com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas, de acordo com a seguinte equação:

$$LQ = \frac{10 \times S_{y/x}}{m} \quad \text{equação 3}$$

### 4.5.3. REPETIBILIDADE

A repetibilidade do método de SPE-*off-line* foi estudada através da injeção de 3 replicados do padrão 5 - 0,75 µg-L-1 para a ciprofloxacina e omeprazole, 0,1 µg-L-1 para a simvastatina e azitromicina e 0,01 µg-L-1 para os restantes compostos.

A repetibilidade do método de SPE-*on-line* foi estudada através da injeção de 5 replicados independentes do padrão 5 - 0,75 µg-L-1 para o grupo A, 0,1 µg-L-1 para o grupo B.

Depois de aplicado o método foram obtidas as áreas em replicado, e calculou-se a média e o coeficiente de variação.

O cálculo do coeficiente de variação (CV) foi feito de acordo com a equação 4.

$$CV(\%) = \frac{DP \times 100}{conc. média} \quad \text{equação 4}$$

### 4.5.4. RECUPERAÇÃO

A percentagem de Recuperação foi feita segundo a equação abaixo:

$$\% Re = \frac{conc (ensaio recuperação)}{Amostra + conc (Padrão)} \quad \text{equação 5}$$

A percentagem de recuperação é calculada dividindo o valor experimental da concentração da amostra fortificada com o padrão 5 pelo seu valor esperado, ou seja, pela soma da concentração obtida na amostra e da concentração conhecida do padrão 5.

## 4.6. APLICAÇÃO DO MÉTODO A UMA AMOSTRA DO RIO LEÇA

### 4.6.1. RECOLHA DA AMOSTRA

As amostras analisadas neste trabalho foram recolhidas no dia 2 de Julho de 2014 no Rio Leça no local da Ponte do Carro entre a freguesia de Santa Cruz do Bispo e Guifões no Concelho de Matosinhos (Figura 19).



Figura 19 - Rio Leça – Ponte do Carro – local onde foi recolhida a amostra

Foram recolhidos 2,5 L de água de Rio e o transporte foi feito em arcas refrigeradas (Figura 20). No laboratório, a amostra foi acidificada com ácido fórmico a 10 mM da mesma forma que foram acidificadas as soluções padrão usadas no processo de otimização do método. Na Figura 20, apresentam-se algumas fotografias representativas do processo de recolha da amostra.

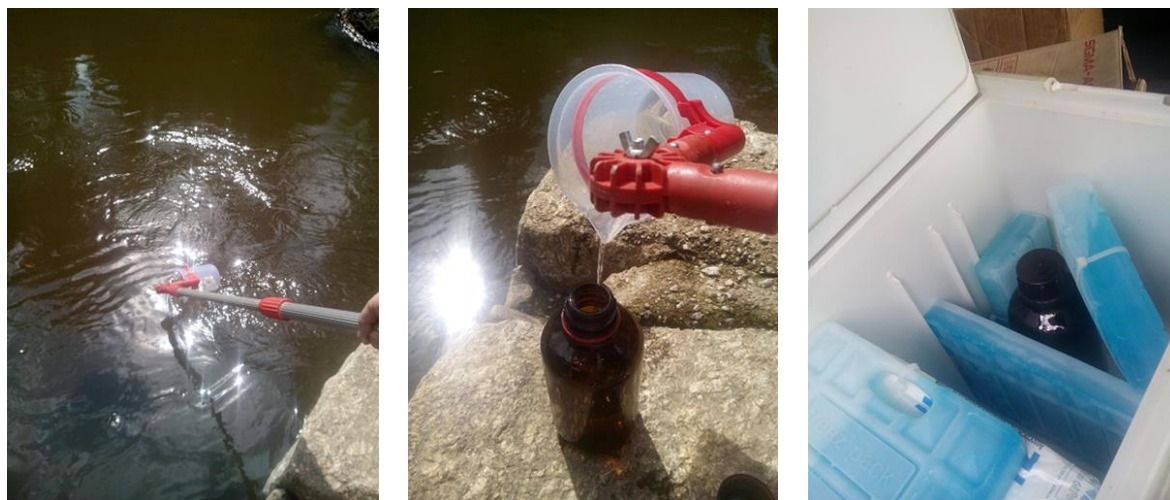


Figura 20 - Fotografias do procedimento de recolha da amostra no Rio Leça e transporte da mesma.

#### 4.6.2. ANÁLISE DA AMOSTRA

Procedeu-se à análise da amostra pelos dois métodos otimizados e descritos anteriormente – *on-line* e *off-line*-SPE-UPLC-MS/MS. Para cada um dos métodos, a amostra e os padrões de calibração foram sujeitos às mesmas condições. A análise de cada amostra é feita posteriormente a uma calibração.

# 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 5.1. OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE UPLC-MS/MS

Na otimização do método cromatográfico, foi inicialmente testada a composição da fase móvel. Para as condições iniciais, partiu-se de um gradiente e composição de fases móveis de um protocolo já existente no laboratório, o qual está devidamente certificado para os compostos (Estrona-3-sulfato,  $17\beta$ -Estradiol,  $17\alpha$ -Estradiol,  $17\alpha$ -Etinilestradiol, Estrona, Diclofenac e Ibuprofeno).<sup>34</sup>

Foram efetuados 5 testes (Tabela 7) de modo a conseguir a composição que conseguisse separar de forma eficiente os diferentes compostos presentes na mistura.

Tabela 7 - Composição das fases móveis testadas para a otimização do processo cromatográfico

Teste	Composição orgânica	Composição aquosa	Preparação solução
1	ACN	H <sub>2</sub> O em 10 mM ácido fórmico	H <sub>2</sub> O
2	ACN	H <sub>2</sub> O em 10 mM ácido fórmico	H <sub>2</sub> O em 10 mM ácido fórmico
3	ACN	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O
4	MeOH	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O
5	MeOH	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O em 10 mM ácido fórmico

Foi testada a fase móvel de acetonitrilo e água acidificada com ácido fórmico (10 mM) e usado o gradiente descrito no protocolo existente e uma solução de 1 mg.L<sup>-1</sup> de uma mistura de todos os fármacos e estrogénios preparada em água. (exceto o bromazepam, diazepam e alprazolam, que foram adicionados ao estudo numa fase posterior)

Os resultados obtidos não foram satisfatórios, devido ao facto de não se conseguir obter, no cromatograma, os picos da maior parte dos compostos. Apenas se conseguiram separar e identificar a azitromicina e os estrogénios β-estradiol, 17-α-etinilestradiol, estrona e desogestrel.

Decidiu-se então, com base em alguma literatura <sup>7,35,36</sup>, testar a fase móvel metanol e água usando as mesmas condições utilizadas anteriormente. O metanol, comparado com o acetonitrilo, é economicamente mais vantajoso e ambientalmente menos desfavorável.

Foi finalmente testada a fase móvel com metanol e água acidificando a solução de mistura com ácido fórmico 10 mM <sup>37</sup> e os resultados foram satisfatórios uma vez que se conseguiram separar e identificar todos os picos dos fármacos e estrogénios em estudo num tempo de 12 min. No Anexo A, encontra-se o cromatograma representativo dos 26 compostos separados pelo método otimizado de UPLC-MS/MS.

Uma vez conseguidas e definidas as condições para a separação de todos os compostos injetando diretamente no UPLC-MS/MS, com uma concentração de 0,1 mg.L<sup>-1</sup>, procedeu-se a calibração dos compostos usando padrões contendo uma mistura de todos os fármacos e estrogénios com concentração de 5; 7,5; 10; 25; 50; 75 e 100 µg.L<sup>-1</sup>.

Tabela 8 - Parâmetros obtidos da curva de calibração dos 26 fármacos e estrogénios pelo método de injeção direta

Composto	Declive	Ord. Origem	RSQ	Tr/min
Hidroclorotiazida	112,75 ± 0,03	-51 ± 1	0,9996	2,02
Paracetamol	1345,28 ± 0,03	958 ± 2	0,9995	2,17
Ciprofloxacina	835,48 ± 0,04	-1769 ± 2	0,9993	4,76
Bisoprolol	24206 ± 39	17383 ± 2	0,9993	7,45
Omeprazole	11,6 ± 0,1	-61 ± 6	0,9944	7,51
Furosamida	153,26 ± 0,05	-127 ± 3	0,9986	4,04
Azitromicina	22,3 ± 0,6	81 ± 32	0,9941	9,33
Indapamida	1327,72 ± 0,03	-491 ± 2	0,9996	6,53
Paroxetina	14993,86 ± 0,05	336 ± 3	0,9990	8,74
Nimesulida	691,05 ± 0,06	1307 ± 4	0,9979	7,90
Ketoprofeno	677,93 ± 0,08	-1744 ± 5	0,9968	6,27
Naproxeno	130,55 ± 0,09	-334 ± 5	0,9962	6,58
Fluoxetina	22719,50 ± 0,03	-12182 ± 2	0,9995	9,10
Estrona	115,40 ± 0,03	-264 ± 2	0,9994	8,42
17- $\alpha$ -etinilestradiol	7,63 ± 0,06	-23,297 ± 4	0,9982	8,36
Bezafibrato	251,43 ± 0,06	-544 ± 4	0,9979	6,48
$\beta$ -estradiol	16,03 ± 0,08	45 ± 5	0,9971	8,36
Diclofenac	213,51 ± 0,08	-410 ± 5	0,9970	7,70
Progesterona	1933,94 ± 0,09	-4119 ± 6	0,9960	9,00
Ibuprofeno	200,9 ± 0,1	-269 ± 6	0,9948	8,19
Gemfibrozil	546,03 ± 0,1	-532 ± 6	0,9951	8,97
Desogestrel	189,84 ± 0,5	32119 ± 33	0,9391	8,67
Simvastatina	539,55 ± 0,07	-1557 ± 4	0,9975	9,45
Bromazepam	452,57 ± 0,07	-1259 ± 5	0,9972	7,10
Diazepam	2412,74 ± 0,06	-639 ± 3	0,9984	8,51
Alprazolam	3244,84 ± 0,06	-2092 ± 3	0,9984	8,01

Na Tabela 8, encontram-se descritos os valores obtidos de declive, ordenada na origem, coeficiente de correlação das curvas de calibração e tempo de retenção para todos os compostos pelo método de injeção direta.

## 5.2. OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO POR SPE (SOLID PHASE EXTRACTION)

Após a aquisição das curvas de calibração pelo método de injeção direta, avançou-se para a extração por SPE *off-line*. Para isso, testaram-se dois tipos de colunas (HLB e MAX) e volume de rotura da coluna escolhido.

### 5.2.1. ESCOLHA DA COLUNA PARA EXTRAÇÃO POR SPE

No teste das colunas, as condições de extração usadas foram as mesmas do protocolo interno de extração de fármacos já existentes no laboratório e devidamente validados. Estas condições são apresentadas na Tabela 9.

Para cada coluna extraíram-se o mesmo volume de solução, 500mL, com concentração de  $0,1\mu\text{gL}^{-1}$ . O extrato foi reconstituído num volume de 500  $\mu\text{L}$  para garantir uma concentração de 1000 vezes e posteriormente foi injetado diretamente no UPLC-MS/MS, utilizando as condições descritas anteriormente.

Tabela 9 - Método de extração por SPE *offline* utilizado neste estudo

<b>Solução mistura de compostos <math>0,1\mu\text{gL}^{-1}</math> + 10mM HCOOH</b>	
<b>Acondicionamento</b>	3mL + 3mL meOH
<b>Lavagem</b>	Água ultrapura
<b>Extração</b>	500 mL Amostra/ Padrões
<b>Lavagem</b>	Água ultrapura
Secagem em vácuo	
<b>Eluição</b>	3mL + 3mL de MeOH
<b>Evaporação</b>	Até à secura em corrente de azoto
<b>Reconstituição</b>	500 $\mu\text{L}$ em 25:75 de MeOH:H <sub>2</sub> O

Atendendo aos resultados da extração e sinal direto obtido pela análise por UPLC-MS/MS observa-se que em 13 compostos os colunas MAX providenciam valores maiores do que com colunas HLB. No entanto, o sinal resultante da extração por estes últimos existe em todos os compostos, o que não se verifica com as colunas MAX para o fármaco furosemida e diclofenac em que se obtém um sinal residual. Os gráficos que representam os diferentes sinais obtidos para os dois tipos de colunas encontram-se na Figura 21. Perante estes resultados, optou-se pela HLB.

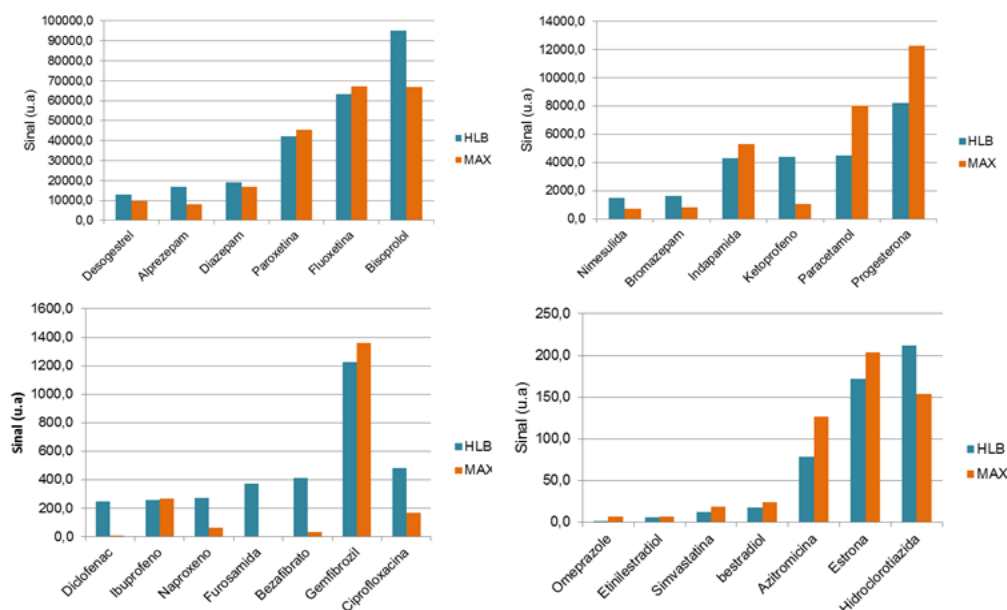


Figura 21 - Comparação dos sinais obtido após extração com colunas HLB e MAX dos vinte e seis fármacos e estrogénios usados na escolha da coluna

As colunas MAX são utilizadas em extrações de permuta iónica e são baseadas em ligações electrostáticas. Estas são também mais adequadas à extração compostos mais ácidos. Para que esta troca de iões ocorra tanto a fase estacionária como a amostra deve estar a um pH em que ambos estejam carregados.<sup>32</sup>

O método de extração escolhido é o que mais se adequa a este tipo de colunas (HLB) uma vez que o acondicionamento é feito com metanol (polar) que permite a penetração no material adsorvente. A lavagem é feita com água ultrapura molhando a superfície de sílica. Faz-se passar a amostra onde os analitos são retidos no adsorvente. A segunda lavagem com água ultrapura permite a remoção de impurezas. A eluição é feita com um solvente polar (metanol), retirando os analitos adsorvidos no material da fase sólida.<sup>25</sup>

### 5.2.2. AVALIAÇÃO DO VOLUME DE ROTURA

Entende-se por volume de rotura o volume mais elevado de amostra que é possível passar através da coluna de extração e que proporciona a recuperação máxima do composto. A partir de determinado volume percolado de amostra, a retenção no adsorvente deixa de ser a máxima possível, sendo este volume variável de acordo com cada composto e o adsorvente em causa.<sup>38</sup>

Os quatro volumes testados (100, 250, 500 e 750 mL), contendo a mesma concentração de analito e submetidos a iguais condições de extração, foram analisados no UHPLC-

MS/MS. Os gráficos resultantes da obtenção do sinal direto de cada composto em função do volume apresentam-se abaixo na Figura 22.

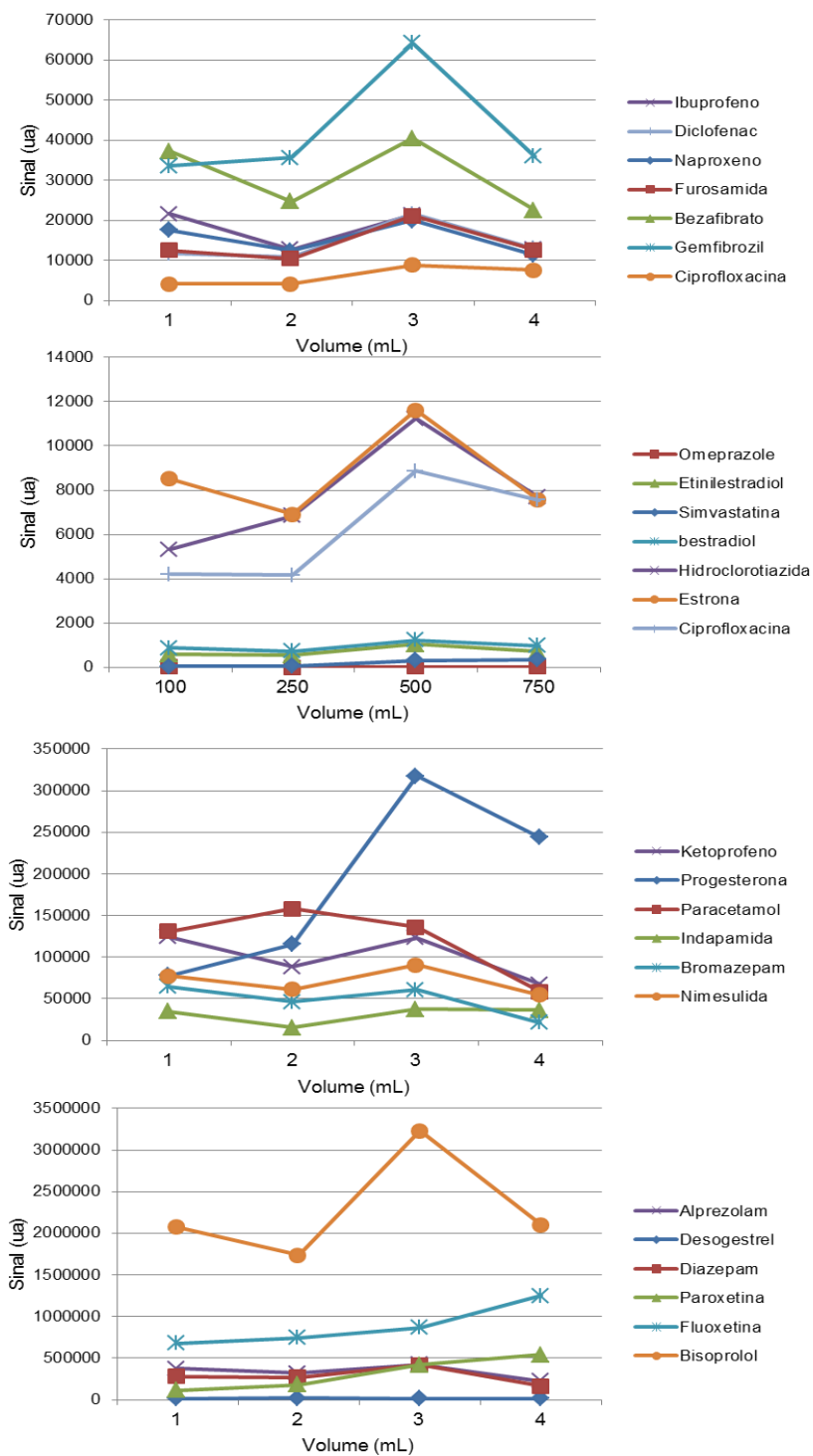


Figura 22 - Gráfico sinal obtido para cada composto vs volume extraído, usado na determinação do volume de rotura.

Na maior parte dos compostos, observa-se um sinal máximo na extração de 500 mL, e um decréscimo no sinal obtido na extração de 750 mL. Em grande parte dos compostos

também se verifica maior sinal para a extração de 100 mL em relação ao volume extraído de 250 mL. Este comportamento poderá dever-se à eluição pela própria amostra de compostos previamente retidos ou aplicação de uma quantidade de analito que excede a capacidade de retenção do adsorvente (menos provável porque os adsorventes atuais têm alta capacidade de retenção).<sup>34</sup>

### **5.3. OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO *ON-LINE-SPE-UPLC-MS/MS***

Neste método de extração por *on-line-SPE-UPLC-MS/MS*, efetuaram-se apenas alguns testes modificando algumas condições. No entanto, os resultados obtidos para esta otimização que são referidos abaixo, não foram exaustivamente testados devido à falta de tempo e a impossibilidade de obter uma melhor separação cromatografia.

#### **5.3.1. ESCOLHA DO GRADIENTES**

O primeiro gradiente avaliado foi meramente indicativo. Testou-se o gradiente usado no método referido anteriormente de determinação por injeção direta no UPLC-MS (Gradiente1) usando uma solução com concentração de  $0,5\mu\text{g.L}^{-1}$ .

Verificou-se que seria necessário ajustar o gradiente para que os compostos fossem extraídos e eluídos e seguidamente encaminhados para a coluna cromatográfica de forma a serem devidamente separados e quantificados. Em baixo apresentam-se as condições e gradientes testados até serem obtidos os resultados desejados. A cor estão os valores que foram variados relativamente ao anterior:

Tabela 10 - Gradientes e condições de composição de eluente e temperatura da coluna testados no método de extração por on-line-SPE-UPLC-MS/MS

Gradiente	% Metanol	% Água	t (min)	Curva	Eluente	T da coluna (°C)
1	20	80			5% MeOH	35
	60	40	6.00	6		
	100	0	8.00	6		
	20	80	8.10	6		
	20	80	12.0	6		
2	25	75			5% MeOH	40
	60	40	4.00	6		
	100	0	7.00	6		
	100	0	8.00	6		
	25	75	13.0	6		
3	25	75			10% MeOH	40
	60	40	4.00	6		
	100	0	7.00	6		
	100	0	8.00	6		
	25	75	13.0	6		
4	25	75			5% MeOH	40
	50	50	3.00	6		
	50	50	4.50	6		
	70	30	6.00	6		
	50	50	8.00	6		
	25	75	12.0	6		
5	5	95			5% MeOH	40
	100	0	6.00	6		
	100	0	8.50	6		
	5	95	9.00	6		
	5	95	12.0	6		
6	10	90			5% MeOH	40
	100	0	5.00	6		
	100	0	8.00	6		
	10	90	8.10	6		
	10	90	12.0	6		
7	10	90			5% MeOH	40
	100	0	6.00	6		
	100	0	9.00	6		
	10	90	9.10	6		
	10	90	12.0	6		
8	10	90			5% MeOH	40
	100	0	5.00	6		
	100	0	7.00	6		
	10	90	7.10	6		
	10	90	12.0	6		
9	15	85			5% MeOH	40
	100	0	5.00	6		
	100	0	7.00	6		
	15	85	7.10	6		
	15	85	12.0	6		

O gradiente 9 foi o que apresentou melhores resultados. No entanto, os compostos diazepam, fluoxetina, paroxetina e azitromicina apresentaram picos pouco consistentes. O cromatograma que representa a separação dos compostos obtido pelo método otimizado de *on-line*-SPE-UPLC-MS/MS encontra-se no Anexo B.

## 5.4. VALIDAÇÃO

### 5.4.1. LINEARIDADE/GAMA DE TRABALHO

Nas tabelas Tabela 11 e Tabela 12 estão representados para os métodos de SPE *off-line* e SPE-*on-line*, respetivamente, as gamas de trabalho utilizadas, os valores de declive e ordenada na origem da reta de calibração e respetivo coeficiente de correlação para cada um dos 26 compostos em estudo. Todos eles nos dois métodos apresentam valores aceitáveis quanto à linearidade apresentada com um coeficiente de correlação superior a 0,990.

Tabela 11 - Gama de trabalho para os 26 fármacos e estrogénios, as equações da reta e coeficientes de correlação para a gama de linearidade obtida no método de extração por SPE *off-line*

SPE <i>off-line</i>				
Composto	Gama de trabalho/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Declive	Ord. na Origem	Coefficiente de Correlação
Hidroclorotiazida	0,001 – 0,1	$78718,30 \pm 0,03$	$5,361 \pm 0,002$	0,9995
Ketoprofeno	0,001 – 0,05	$149229,80 \pm 0,08$	$-90,524 \pm 0,002$	0,9963
Bezafibrato	0,01 – 0,1	$180899,6 \pm 0,2$	$-1448,59 \pm 0,01$	0,9921
Naproxeno	0,005 – 0,075	$30428,64 \pm 0,06$	$26,800 \pm 0,002$	0,9990
Diclofenac	0,005 – 0,1	$129103,71 \pm 0,08$	$-368,783 \pm 0,004$	0,9979
Estrona	0,01 – 0,1	$24001,8 \pm 0,1$	$154,590 \pm 0,006$	0,9968
$\beta$ -estradiol	0,001 – 0,01	$83307,4 \pm 0,1$	$-85,927 \pm 0,001$	0,9938
17 $\alpha$ -Etinilestradiol	0,001 – 0,01	$54447,14 \pm 0,2$	$-53,002 \pm 0,001$	0,9909
Fluoxetina	0,0025 – 0,05	$9467834,54 \pm 0,06$	$24989,296 \pm 0,001$	0,9983
Azitromicina	0,025 – 0,25	$700702,52 \pm 0,06$	$-9841,420 \pm 0,007$	0,9989
Ciprofloxacina	0,1 – 2,5	$403123,48 \pm 0,04$	$23255,08 \pm 0,05$	0,9990
Omeprazole	0,5 – 7,5	$84,62 \pm 0,08$	$-36,3 \pm 0,3$	0,9970
Furosamida	0,001 – 0,05	$64243,80 \pm 0,03$	$-25,8688 \pm 0,0007$	0,9997
Bisoprolol	0,005 – 0,05	$10533797,60 \pm 0,03$	$17338,9864 \pm 0,0007$	0,9998
Paroxetina	0,001 – 0,05	$5887855,458 \pm 0,04$	$14882,973 \pm 0,001$	0,9988
Nimesulida	0,001 – 0,01	$494782,29 \pm 0,08$	$-142,683 \pm 0,001$	0,9979
Ibuprofeno	0,005 – 0,075	$73650,4 \pm 0,1$	$-80,755 \pm 0,006$	0,9949
Desogestrel	0,001 – 0,05	$800705,01 \pm 0,09$	$21943,954 \pm 0,002$	0,9977
Progesterona	0,01 – 0,1	$116314,91 \pm 0,05$	$304,503 \pm 0,003$	0,9993
Paracetamol	0,001 – 0,1	$239082,86 \pm 0,04$	$294,783 \pm 0,002$	0,9991
Indapamida	0,0075 – 0,1	$18477,7 \pm 0,1$	$-180,229 \pm 0,007$	0,9956
Gemfibrozil	0,0025 – 0,05	$311719,25 \pm 0,05$	$-493,927 \pm 0,001$	0,9993
Simvastatina	0,025 – 0,25	$3865,8 \pm 0,1$	$183,88 \pm 0,02$	0,9971

Alprazolam	0,005 – 0,075	382796,14 ± 0,04	503,579 ± 0,002	0,9992
Diazepam	0,005 – 0,05	383961,62 ± 0,06	385,571 ± 0,002	0,9989
Bromazepam	0,0025 – 0,1	724142,34 ± 0,04	-1461,931 ± 0,002	0,9994

Tabela 12 - Gama de trabalho para os 26 fármacos e estrogénios, as equações da reta e respetivos coeficientes de correlação para a gama de linearidade obtida no método de extração por SPE *on-line*

SPE online				
Composto	Gama de trabalho/ µg.L <sup>-1</sup>	Declive	Ord. na Origem	Coefficiente de Correlação
Hidroclorotiazida	0,075 - 1,0	3542,1 ± 0,1	-28,05 ± 0,07	0,9956
Ketoprofeno	0,075 - 1,0	61603,41 ± 0,05	-2699,53 ± 0,03	0,9992
Bezafibrato	0,075 - 1,0	34678,2 ± 0,1	-3119,90 ± 0,06	0,9970
Naproxeno	0,25 – 7,5	3808,2 ± 0,1	-170,6 ± 0,3	0,9971
Diclofenac	0,075 - 1,0	4558,3 ± 0,1	-281,08 ± 0,06	0,9968
Estrona	0,075 - 1,0	251,72 ± 0,07	-13,87 ± 0,05	0,9983
β-estradiol	0,075 - 1,0	85,1 ± 0,1	73,43 ± 0,06	0,9986
17α-Etinilestradiol	0,075 - 1,0	82,8 ± 0,1	5,01 ± 0,07	0,9960
Fluoxetina	0,075 - 1,0	6043,2 ± 0,1	217,54 ± 0,09	0,9938
Azitromicina	0,075 - 1,0	2294,7 ± 0,1	1588,55 ± 0,07	0,9946
Ciprofloxacina	0,075 - 1,0	643,3 ± 0,2	193,4 ± 0,1	0,9916
Omeprazole	0,1 - 2,5	97,96 ± 0,08	14,2 ± 0,1	0,9980
Furosamida	0,075 - 1,0	26656,3 ± 0,1	-1527,25 ± 0,06	0,9971
Bisoprolol	0,075 - 1,0	210960,1 ± 0,1	-11819,88 ± 0,07	0,9964
Paroxetina	0,075 - 1,0	11127,2 ± 0,1	-424,94 ± 0,09	0,9936
Nimesulida	0,025 – 0,5	88353,20 ± 0,05	-1674,89 ± 0,01	0,9992
Ibuprofeno	0,025 – 0,5	26677,9 ± 0,1	-142,37 ± 0,03	0,9968
Desogestrel	0,01 – 0,25	570376,25 ± 0,06	3806,072 ± 0,007	0,9989
Progesterona	0,01 – 0,1	67078,0 ± 0,2	-508,86 ± 0,01	0,9917
Paracetamol	0,025 – 0,5	61385,3 ± 0,1	306,86 ± 0,02	0,9972
Indapamida	0,01 – 0,1	246375,1 ± 0,1	-772,671 ± 0,007	0,9958
Gemfibrozil	0,05 – 1,0	34458,6 ± 0,1	670,37 ± 0,05	0,9967
Simvastatina	0,01 – 0,25	19351,82 ± 0,07	-21,871 ± 0,008	0,9986
Alprazolam	0,01 – 0,25	658477,62 ± 0,02	-2633,665 ± 0,002	0,9996
Diazepam	0,01 – 0,25	358391,9 ± 0,1	1254,70 ± 0,01	0,9954
Bromazepam	0,01 – 0,25	94544,38 ± 0,07	-707,689 ± 0,008	0,9986

## 5.4.2. LIMITE DE DETEÇÃO (LD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)

Para estabelecer os limites de detecção e de quantificação das substâncias em estudo, foi preparada uma reta de calibração com 5 pontos para cada composto, distribuídos uniformemente e perto do limite de detecção esperado. Estes limites foram calculados de acordo com as equações 1 e 2, referidas anteriormente. Na Tabela 13, podemos verificar os valores de LD e os valores de LQ obtidos para o método por *off-line*-SPE e por *on-line*-SPE-UPLC-MS/MS.

Tabela 13 - Valores dos limites de detecção e quantificação obtidos pelo método de SPE *off-line* e *on-line*

Composto	LD/ $\mu\text{g.L}^{-1}$		LQ/ $\mu\text{g.L}^{-1}$	
	<i>off-line</i>	<i>on-line</i>	<i>off-line</i>	<i>on-line</i>
Paracetamol	0,005	0,04	0,015	0,12
Hidroclorotiazida	0,003	0,10	0,010	0,32
Furosamida	0,0014	0,08	0,0042	0,26
Indapamida	0,009	0,009	0,029	0,027
Ketoprofeno	0,002	0,042	0,006	0,13
Bezafibrato	0,012	0,086	0,038	0,26
Bromazepam	0,0033	0,014	0,01	0,041
Naproxeno	0,0036	0,61	0,011	1,8
Alprezolam	0,0030	0,010	0,009	0,032
Diclofenac	0,0012	0,090	0,036	0,27
Nimesulida	0,0006	0,021	0,002	0,06
Estrona	0,0078	0,065	0,024	0,20
bestradiol	0,27	0,086	0,81	0,26
Etinilestradiol	0,023	0,101	0,069	0,31
Diazepam	0,0053	0,025	0,016	0,076
Ibuprofeno	0,008	0,043	0,024	0,13
Paroxetina	0,002	0,13	0,007	0,39
Desogestrel	0,005	0,012	0,01	0,036
Fluoxetina	0,0028	0,12	0,008	0,38
Progesterona	0,0036	0,013	0,01	0,038
Bisoprolol	0,0011	0,095	0,003	0,30
Gemfibrozil	0,002	0,090	0,006	0,27
Simvastatina	0,02	0,013	0,06	0,04
Azitromicina	0,011	0,10	0,03	0,31
Ciprofloxacina	0,1	0,15	0,3	0,44
Omeprazole	0,57	0,16	1,7	0,50

Podemos observar que tanto os valores de LD e LQ obtidos para o método por *on-line*-SPE são maiores que os obtidos por *off-line*-SPE. Estes valores devem se essencialmente aos valores obtidos de  $s_y/x$  para este último método serem mais baixos.

### 5.4.3. REPETIBILIDADE

A repetibilidade do método de SPE *off-line* foi estudada através da injeção de 3 replicados do padrão 5 - 0,75  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  para a ciprofloxacina e omeprazole, 0,1  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  para a simvastatina e azitromicina e 0,01  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  para os restantes compostos.

A repetibilidade do método de SPE *on-line* foi estudada através da injeção de 5 replicados independentes do padrão 5 - 0,75  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  para o grupo A, 0,1  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  para o grupo B.

Na Tabela 14 e Tabela 15, estão os valores da média da concentração obtida na análise do padrão 5, o desvio padrão e o coeficiente de variação calculado através da equação 4 para os métodos de extração por SPE-online e SPE-on-line.

Tabela 14 - Resultados média concentração, desvio padrão e coeficiente de variação dos 26 compostos em estudo pelo método de extração por SPE *off-line*

<b>SPE <i>off-ine</i></b>			
<b>Composto</b>	<b>Média / <math>\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}</math></b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>CV (%)</b>
Hidroclorotiazida	0,010	0,00084	8,8
Ketoprofeno	0,009	0,0010	11,9
Bezafibrato	0,013	0,00029	2,2
Naproxeno	0,007	0,00093	13,4
Diclofenac	0,010	0,00022	2,2
Estrona	0,013	0,0012	9,6
$\beta$ -estradiol	0,010	0,00095	9,4
17 $\alpha$ -Etinilestradiol	0,010	0,00039	4,2
Fluoxetina	0,011	0,00068	6,1
Azitromicina	0,095	0,0026	2,7
Ciprofloxacina	0,711	0,055	7,9
Omeprazole	0,623	0,103	16,6
Furosamida	0,010	0,00023	2,4
Bisoprolol	0,010	0,00050	4,9
Paroxetina	0,010	0,00055	5,5
Nimesulida	0,010	0,00072	7,1
Ibuprofeno	0,009	0,00080	9,1
Desogestrel	0,009	0,00098	10,6
Progesterona	0,009	0,0014	15,0
Paracetamol	0,009	0,0012	13,2
Indapamida	0,011	0,00057	5,4
Gemfibrozil	0,010	0,00051	5,2
Simvastatina	0,091	0,017	18,8
Alprazolam	0,008	0,0014	17,7
Diazepam	0,009	0,00039	4,3
Bromazepam	0,010	0,00066	6,4

Tabela 15 - Resultados média concentração, desvio padrão e coeficiente de variação dos 26 compostos em estudo pelo método de extração por SPE *on-line*

<b>SPE <i>on-line</i></b>			
<b>Composto</b>	<b>Média / <math>\mu\text{g.L}^{-1}</math></b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>CV (%)</b>
Hidroclorotiazida	0,80	0,04	5,23
Ketoprofeno	0,78	0,04	5,40
Bezafibrato	0,64	0,06	9,40
Naproxeno	0,87	0,14	15,8
Diclofenac	0,76	0,11	14,0
Estrona	0,67	0,16	24,1
$\beta$ -estradiol	0,68	0,13	18,4
17 $\alpha$ -Etinilestradiol	0,75	0,10	13,1
Fluoxetina	0,83	0,13	15,6
Azitromicina	0,71	0,12	16,4
Ciprofloxacina	0,64	0,05	8,06
Omeprazole	0,81	0,12	14,7
Furosamida	0,79	0,05	6,00
Bisoprolol	0,65	0,10	15,1
Paroxetina	0,73	0,04	5,09
Nimesulida	0,103	0,007	7,06
Ibuprofeno	0,097	0,010	9,85
Desogestrel	0,096	0,013	13,4
Progesterona	0,10	0,012	12,5
Paracetamol	0,10	0,01	7,77
Indapamida	0,096	0,005	5,22
Gemfibrozil	0,10	0,01	15,3
Simvastatina	0,10	0,02	19,1
Alprazolam	0,12	0,01	8,44
Diazepam	0,087	0,045	51,9
Bromazepam	0,125	0,004	3,64

Os valores obtidos pelo estudo de repetibilidade para o coeficiente de variação, em percentagem, encontram-se todos abaixo de 20% para todos os compostos nos dois diferentes métodos, com exceção da estrona no método de extração por SPE-*on-line*.

#### 5.4.4. RECUPERAÇÃO

A percentagem de recuperação foi calculada de acordo com a equação 5. Nas tabelas 16 e 17 apresentam-se os valores de percentagem de recuperação do método para as técnicas de SPE-*off-line* e SPE-*on-line*, respetivamente.

Tabela 16 - Percentagem de recuperação dos compostos usando o método de SPE *off-line* e desvio padrão relativo

SPE <i>off-line</i>					
Composto	Recuperação (%)	RSD	Composto	Recuperação (%)	RSD
Hidroclorotiazida	88,1	15,78	Bisoprolol	92,6	7,10
Ketoprofeno	106,8	2,17	Paroxetina	108,3	6,7
Bezafibrato	82,4	8,53	Nimesulida	83,9	2,8
Naproxeno	97,3	7,07	Ibuprofeno	108,9	10,16
Diclofenac	75,7	10,10	Desogestrel	64,0	13,6
Estrona	97,8	24,9	Progesterona	90,8	17,0
$\beta$ -estradiol	85,6	8,4	Paracetamol	105,6	2,6
17 $\alpha$ -Ethinilestradiol	97,2	7,9	Indapamida	51,2	2,0
Fluoxetina	94,2	6,4	Gemfibrozil	89,9	15,1
Azitromicina	103,2	2,01	Simvastatina	118,1	5,3
Ciprofloxacina	106,3	10,9	Alprazolam	88,6	7,8
Omeprazole	58,1	13,4	Diazepam	74,8	8,4
Furosamida	96,8	6,86	Bromazepam	54,7	6,9

Tabela 17 - Percentagem de recuperação dos compostos usando o método de SPE *on-line* e desvio padrão relativo

SPE <i>on-line</i>					
Composto	Recuperação (%)	RSD	Composto	Recuperação (%)	RSD
Hidroclorotiazida	109,3	10,8	Bisoprolol	77,7	12,1
Ketoprofeno	75,8	7,7	Paroxetina	76,3	21,9
Bezafibrato	82,7	10,6	Nimesulida	75,8	6,1
Naproxeno	71,39	11,3	Ibuprofeno	110,4	11,1
Diclofenac	81,4	7,6	Desogestrel	79,9	13,4
Estrona	94,8	8,3	Progesterona	85,8	14,4
$\beta$ -estradiol	119,1	18,7	Paracetamol	102,1	5,9
17 $\alpha$ -Ethinilestradiol	79,4	18,9	Indapamida	62,7	7,1
Fluoxetina	101,4	11,6	Gemfibrozil	99,1	7,6
Azitromicina	85,3	17,7	Simvastatina	100,6	7,6
Ciprofloxacina	92,0	14,0	Alprazolam	76,1	13,5
Omeprazole	94,6	15,4	Diazepam	63,7	4,7
Furosamida	104,1	4,9	Bromazepam	103,8	5,2

Dos resultados apresentados nas Tabelas 16 e 17 verifica-se que as percentagens de recuperação dos compostos estudados variam entre 51,2% e 118,1% para o método com extração por *off-line*-SPE e entre 62,7% e 110,4% para o método com extração por SPE-*on-line*. Nos dois métodos a percentagem média de recuperação é de 89,3 para o SPE-*offline* e de 88,7 para o SPE-*on-line*.

## 5.5. APLICAÇÃO DOS MÉTODOS A AMOSTRAS DO RIO LEÇA

As amostras do Rio Leça foram analisadas pelo método de SPE-off-line-UPLC-MS/MS e pelo método de SPE-online-UPLC-MS/MS sendo usado o método da curva de calibração.

No método de SPE-offline, o extrato obtido foi medido três vezes pelo método de injeção direta no UPLC-MS/MS. Para a análise da amostra pelo método de on-line-SPE-UPLC-MS/MS, foram realizadas 5 medições independentes.

Na Tabela 18, é apresentado a média da concentração obtida para cada composto, desvio padrão e coeficiente de variação.

Tabela 18 - Valores da média das concentrações obtidas na amostra do rio Leça pelo método de SPE-on-line-UPLC-MS/MS

Composto	SPE off-line		SPE on-line	
	Rio Leça µg.L <sup>-1</sup>	RSD	Rio Leça µg.L <sup>-1</sup>	RSD
Hidroclorotiazida	0,15 <sup>(c)</sup>	-	0,17 <sup>(b)</sup>	10,41
Ketoprofeno	0,049	9,1	0,053 <sup>(b)</sup>	17,99
Bezafibrato	0,074	10,6	0,090 <sup>(b)</sup>	0,64
Naproxeno	0,053	25,3	0,046 <sup>(a)</sup>	2,18
Diclofenac	0,058	14,5	0,071 <sup>(a)</sup>	15,37
Estrona	-	-	-	-
β-estradiol	-	-	-	-
17α-Etinilestradiol	-	-	-	-
Fluoxetina	-	-	-	-
Azitromicina	0,027	12,3	-	-
Ciprofloxacina	-	-	-	-
Omeprazole	-	-	-	-
Furosamida	0,051 <sup>(c)</sup>	9,8	0,059 <sup>(a)</sup>	1,31
Bisoprolol	0,065	14,8	0,21 <sup>(b)</sup>	11,18
Paroxetina	-	-	-	-
Nimesulida	-	-	0,020 <sup>(a)</sup>	5,2
Ibuprofeno	0,019	15,7	0,016 <sup>(a)</sup>	6,94
Desogestrel	-	-	-	-
Progesterona	-	-	-	-
Paracetamol	0,001 <sup>(a)</sup>	15,8	-	-
Indapamida	-	-	0,01 <sup>(b)</sup>	207,04
Gemfibrozil	0,008	5,4	-	-
Simvastatina	-	-	-	-
Alprazolam	0,006	4,8	0,005 <sup>(a)</sup>	12,4
Diazepam	0,001 <sup>(c)</sup>	70,3	-	-
Bromazepam	-	-	-	-

(a) - valores inferiores a LD; (b) - valores inferiores ao LQ e superiores ao LD; (c) – valor está fora da gama de trabalho

Os resultados obtidos para o método de análise por UPLC-MS/MS com extração por SPE-*off-line* encontram-se abaixo daqueles que foram conseguidos com o método automatizado de *on-line*-SPE-UPLC-MS/MS. Isto poderá dever-se a eventuais perdas no processo de extração *off-line*-SPE, uma vez que este possui mais passos e, como tal, introduz mais erros. No entanto esses valores, ao contrário do método automatizado, estão acima do LQ obtido para esse método, com a exceção da hidroclorotiazida e a furosemida, que se encontram acima do limite mais alto da gama de trabalho e o diazepam que se encontra abaixo do limite mais baixo.

Os compostos azitromicina, paracetamol, gemfibrozil e diazepam foram apenas detetados pelo método de determinação usando a extração por *off-line*-SPE. Os compostos nimesulida e indapamida apenas foram detetados pelo método de determinação por *on-line*-SPE-UPLC-MS/MS.

Os resultados obtidos da análise da amostra por *on-line*-SPE-UPLC-MS/MS para os fármacos detetados estão abaixo do limite de deteção e quantificação calculados teoricamente. Os fármacos hidroclorotiazida, ketoprofeno, bezafibrato, bisoprolol e indapamida encontram se acima do limite de deteção mas abaixo do limite de quantificação. Os restantes compostos não foram detetados.

# 6 CONCLUSÃO

No decorrer do desenvolvimento do trabalho foram otimizados alguns parâmetros e condições experimentais no método de análise por UPLC-MS/MS. Esses parâmetros, tais como, as condições de ionização e fragmentação e a composição da fase móvel, foram efetuados no sentido de proporcionar a melhor separação cromatográfica dos 26 compostos em estudo e a sua deteção e quantificação.

A deteção por espectrometria de massa por triplo quadrupolo, no modo positivo e negativo para aquisição de dados, revelou ser adequada em termos de sensibilidade e especificidade, garantindo também uma boa avaliação quantitativa dos analitos.

As condições cromatográficas de separação pelo método direto demonstraram uma boa separação dos fármacos e estrogénios, com picos bem definidos e boa quantificação dos padrões e amostras, num intervalo de 12 minutos. Essas condições são constituídas por uma fase móvel com gradiente de água e metanol e a preparação da solução, acidificada com ácido fórmico 10 mM.

Para a extração em fase sólida, SPE, foi a coluna de extração HLB a que mostrou ser mais adequado aos compostos em estudo e o volume de rotura de 500 mL o volume para o qual a retenção do adsorvente é máxima.

Assim, na análise da água do Rio Leça por UPLC-MS/MS com prévia extração por SPE foram detetados e quantificados os fármacos ketoprofeno (0,049 µg.L<sup>-1</sup>); bezafibrato (0,074 µg.L<sup>-1</sup>); naproxeno (0,053 µg.L<sup>-1</sup>); diclofenac (0,058 µg.L<sup>-1</sup>); azitromicina (0,027 µg.L<sup>-1</sup>); bisoprolol (0,065 µg.L<sup>-1</sup>); ibuprofeno (0,019 µg.L<sup>-1</sup>); gemfibrozil (0,008 µg.L<sup>-1</sup>) e alprazolam (0,006 µg.L<sup>-1</sup>).

Os limites de deteção e quantificação também foram avaliados e encontram-se abaixo dos valores de concentração obtidos para estes fármacos com exceção do paracetamol. Os fármacos hidroclorotiazida e furosemida e diazepam apresentam valores de concentração fora da gama de trabalho determinada para cada composto.

O método on-line-SPE-UPLC-MS/MS garantiu com as condições escolhidas – gradiente temperatura da coluna e composição do eluente - uma boa separação dos compostos também em 12min. No entanto, este método necessita de alguns ajustes a fim de poder apresentar uma melhor separação e definição dos picos dos compostos diazepam, fluoxetina, paroxetina e azitromicina.

Para o método de determinação por on-line-SPE-UPLC-MS/MS, obtiveram-se limites de deteção altos, quando comparados com o anterior método. Os valores de concentração dos compostos detetados, presentes também na amostra sujeita ao processo de extração manual foram ketoprofeno (0,053 µg.L<sup>-1</sup>); bezafibrato (0,090 µg.L<sup>-1</sup>); naproxeno (0,046 µg.L<sup>-1</sup>); diclofenac (0,071 µg.L<sup>-1</sup>); bisoprolol (0,21 µg.L<sup>-1</sup>); ibuprofeno (0,016 µg.L<sup>-1</sup>); e alprazolam (0,005 µg.L<sup>-1</sup>) com exceção da azitromicina, paracetamol, gemfibrozil e diazepam, que este método não detetou e a indapamida (0,01 µg.L<sup>-1</sup>); e a nimesulida (0,020 µg.L<sup>-1</sup>) que foi detetada por este método mas não pelo anterior. Estes valores encontram-se todos abaixo do LQ teoricamente calculado.

Este estudo é o início de um caminho que pode vir a ser feito no âmbito de determinação e quantificação de diversos poluentes emergentes.



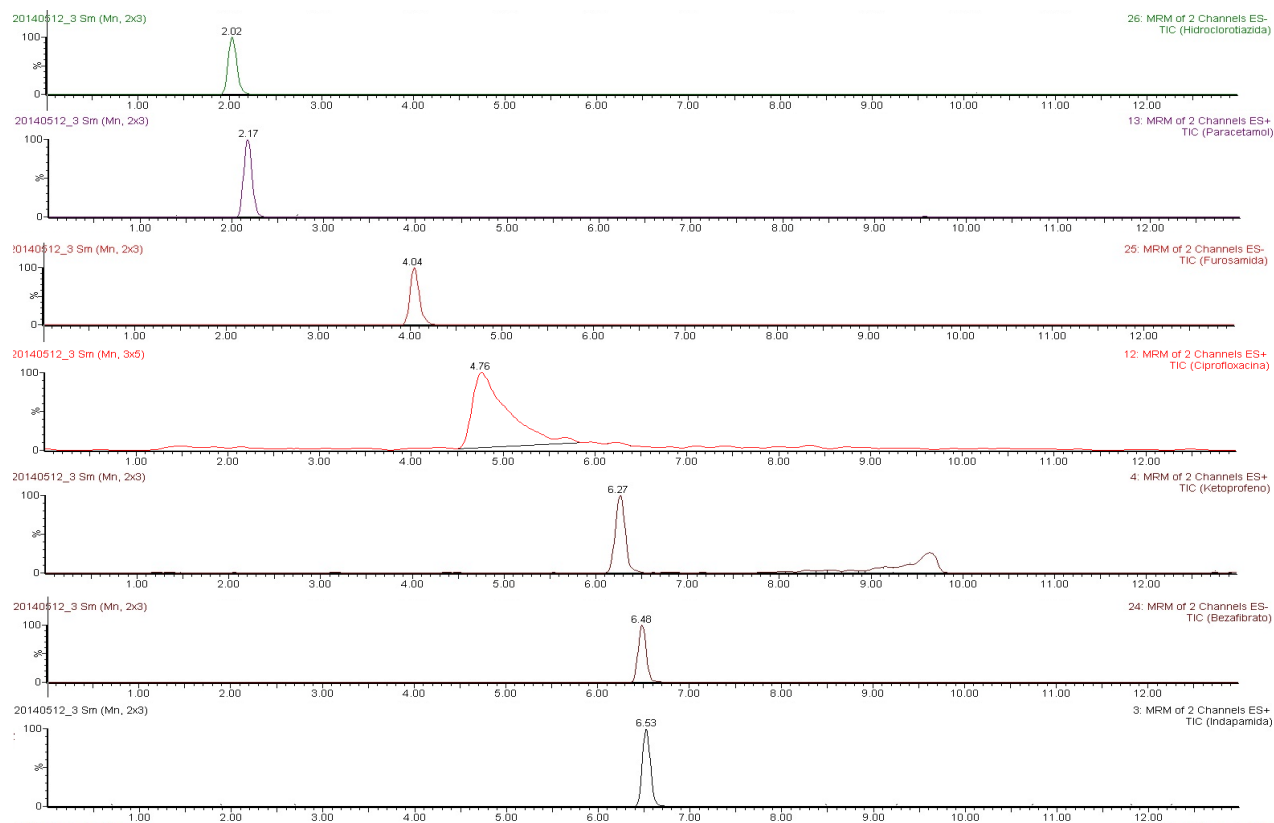
## Bibliografia

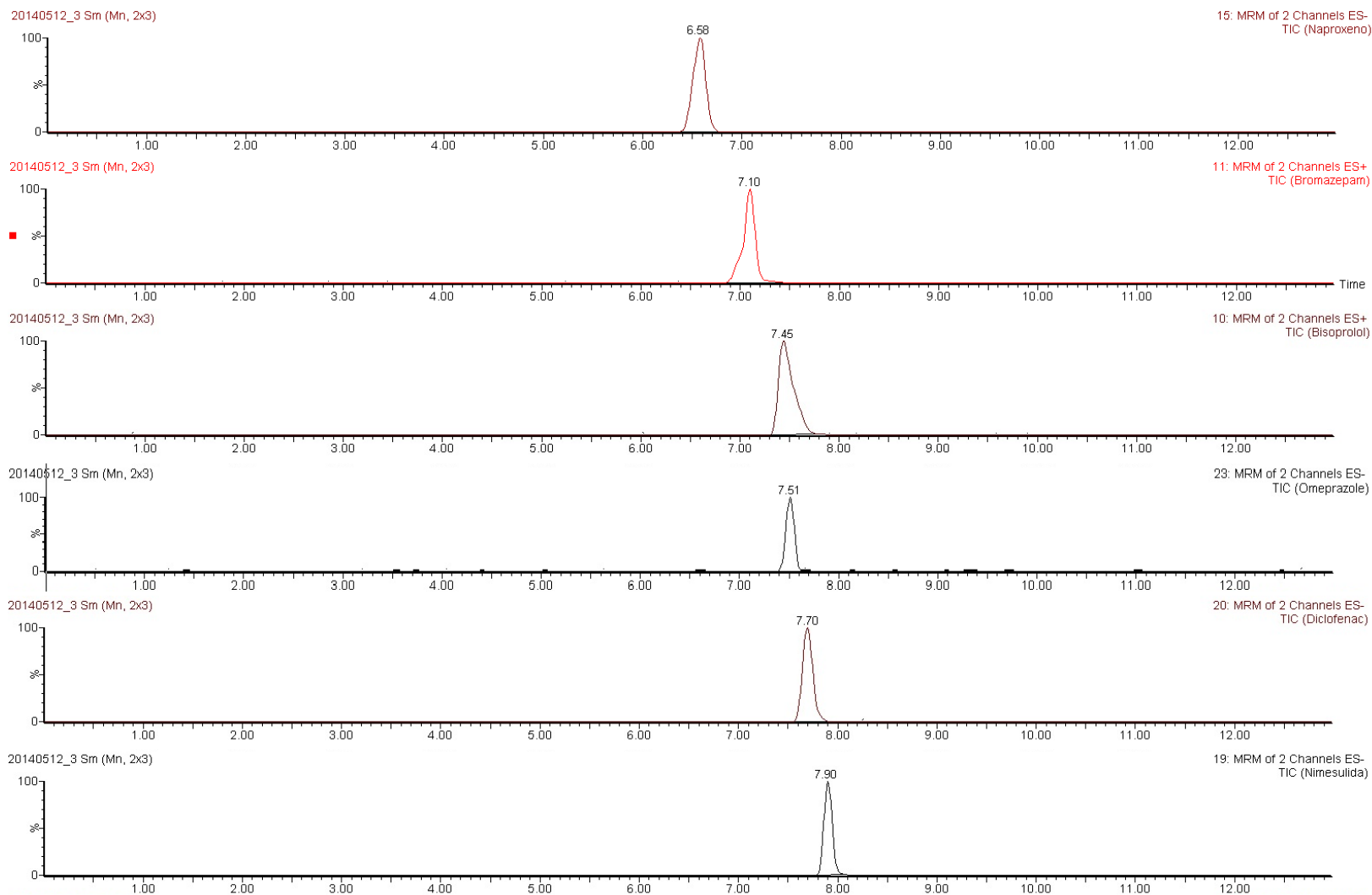
1. FÁrmacos, A. D. E., Águas, E. M. & Ms, P. O. R. S. ANÁLISE DE FÁRMACOS EM ÁGUAS POR SPE-UPLC-ESI-MS/MS. *Quim. Nov.* **37**, 138–149 (2014).
2. Deblonde, T., Cossu-Leguille, C. & Hartemann, P. Emerging pollutants in wastewater: a review of the literature. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **214**, 442–8 (2011).
3. Rosal, R. *et al.* Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation. *Water Res.* **44**, 578–88 (2010).
4. Lopez de Alda, M. J., Díaz-Cruz, S., Petrovic, M. & Barceló, D. Liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry of selected emerging pollutants (steroid sex hormones, drugs and alkylphenolic surfactants) in the aquatic environment. *J. Chromatogr. A* **1000**, 503–26 (2003).
5. Kümmerer, K. *Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks* No Title. 1–8 (2001).
6. Birkett J. W., L. J. N. *Endocrine Disruptors in Wastewater and Sludge Treatment Processes.* (2003).
7. Buseti, F., Linge, K. L. & Heitz, A. Analysis of pharmaceuticals in indirect potable reuse systems using solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1216**, 5807–18 (2009).
8. Carrara, C. *et al.* Fate of pharmaceutical and trace organic compounds in three septic system plumes, Ontario, Canada. *Environ. Sci. Technol.* **42**, 2805–11 (2008).
9. Brown, K. D., Kulis, J., Thomson, B., Chapman, T. H. & Mawhinney, D. B. Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico. *Sci. Total Environ.* **366**, 772–783 (2006).
10. Santos, L. H. M. L. M. *et al.* Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *J. Hazard. Mater.* **175**, 45–95 (2010).
11. Cleuvers, M. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicol. Lett.* **142**, 185–194 (2003).
12. Schmitt-Jansen, M., Bartels, P., Adler, N. & Altenburger, R. Phytotoxicity assessment of diclofenac and its phototransformation products. in *Anal. Bioanal. Chem.* **387**, 1389–1396 (2007).
13. Garric, J. & Ferrari, B. Les substances pharmaceutiques dans les milieux aquatiques. Niveaux d'exposition et effet biologique : que savons nous? *Rev. des Sci. l'eau* **18**, 307 (2005).

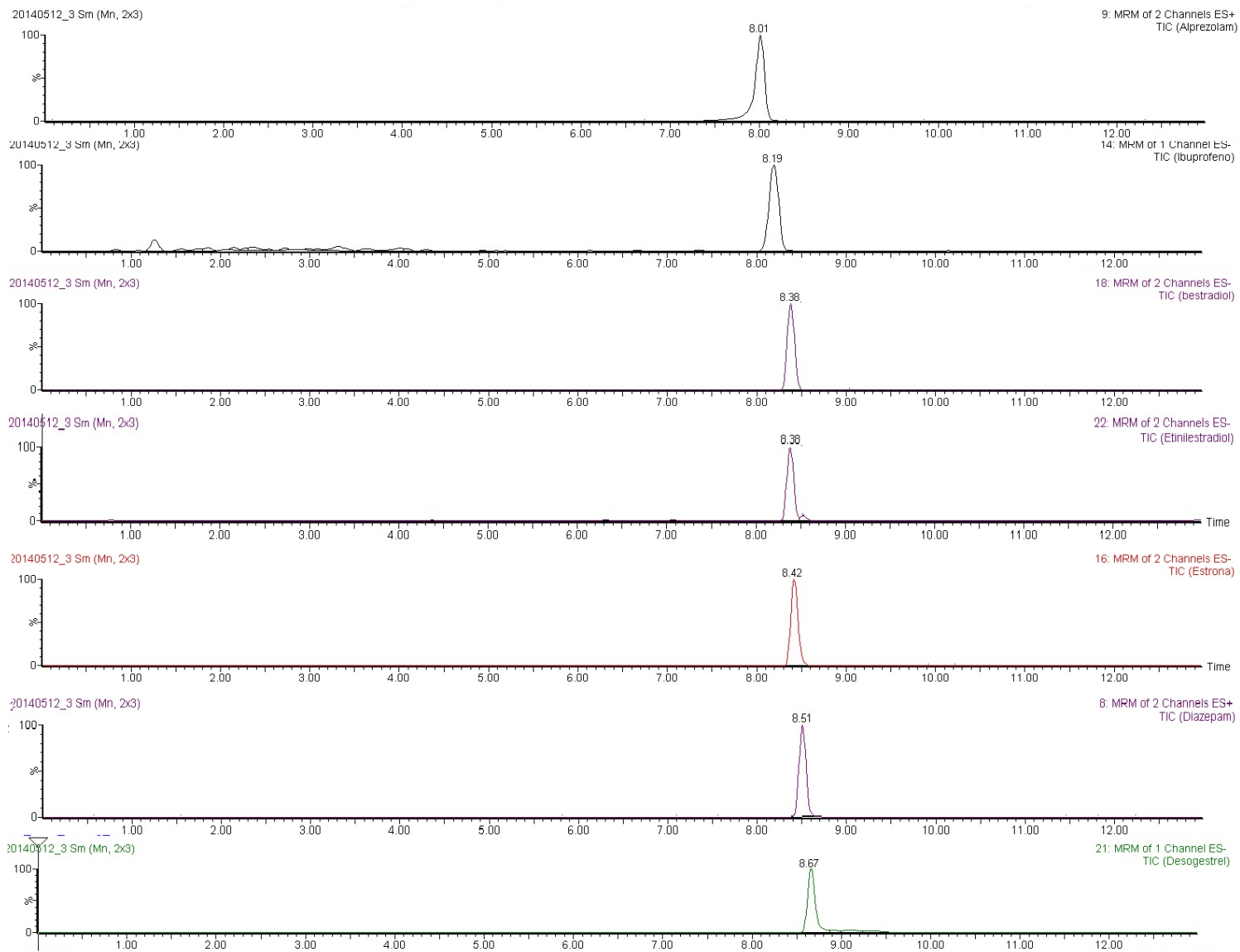
14. Seifrtová, M., Pena, A., Lino, C. M. & Solich, P. Determination of fluoroquinolone antibiotics in hospital and municipal wastewaters in Coimbra by liquid chromatography with a monolithic column and fluorescence detection. *Anal. Bioanal. Chem.* **391**, 799–805 (2008).
15. Parrott JL, B. B. Life-cycle exposure of fathead minnows (*Pimephales promelas*) to an ethinylestradiol concentration below 1 ng/L reduces egg fertilization success and demasculinizes males. *Env. Toxicol.* **20**, 131–141 (2005).
16. Fong, P. P. Zebra Mussel Spawning Is Induced in Low Concentrations of Putative Serotonin Reuptake Inhibitors. *Biol. Bull.* **194**, 143 (1998).
17. Ternes, T. A. & Joss, A. Human Pharmaceuticals , Hormones and Fragrances Edited by.
18. Medicamento, S. D. O. & Statistic, M. No Title. (2011).
19. Oldoveanu, S. E. C. M. & Avid, V. I. D. *ESSENTIALS IN MODERN HPLC SEPARATIONS*. (2013).
20. Srivastava, B., Sharma, B. K., Baghel, U. S. & Sethi, N. Review Article ULTRA PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY ( UPLC ) : A CHROMATOGRAPHY TECHNIQUE. **2**, 19–25 (2010).
21. Nov, L., Matysov, L. & Solich, P. Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. **68**, 908–918 (2006).
22. Harris, D. *Quantitative chemical analysis*. 558 (2007). at <<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Quantitative+Chemical+Analysis#0>>
23. Dass, C. *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry*. (Wiley, 2007).
24. Sabik, H., Jeannot, R. & Rondeau, B. Multiresidue methods using solid-phase extraction techniques for monitoring priority pesticides, including triazines and degradation products, in ground and surface waters. *J. Chromatogr. A* **885**, 217–236 (2000).
25. Biziuk, M. Solid Phase Extraction Technique – Trends , Opportunities and Applications. **15**, 677–690 (2006).
26. Trenholm, R. A., Vanderford, B. J. & Snyder, S. A. On-line solid phase extraction LC-MS/MS analysis of pharmaceutical indicators in water: a green alternative to conventional methods. *Talanta* **79**, 1425–32 (2009).
27. Gros, M., Petrović, M. & Barceló, D. Multi-residue analytical methods using LC-tandem MS for the determination of pharmaceuticals in environmental and wastewater samples: a review. *Anal. Bioanal. Chem.* **386**, 941–52 (2006).
28. Diaz, R., Ibáñez, M., Sancho, J. V & Hernández, F. Qualitative validation of a liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry screening method for organic pollutants in waters. *J. Chromatogr. A* **1276**, 47–57 (2013).

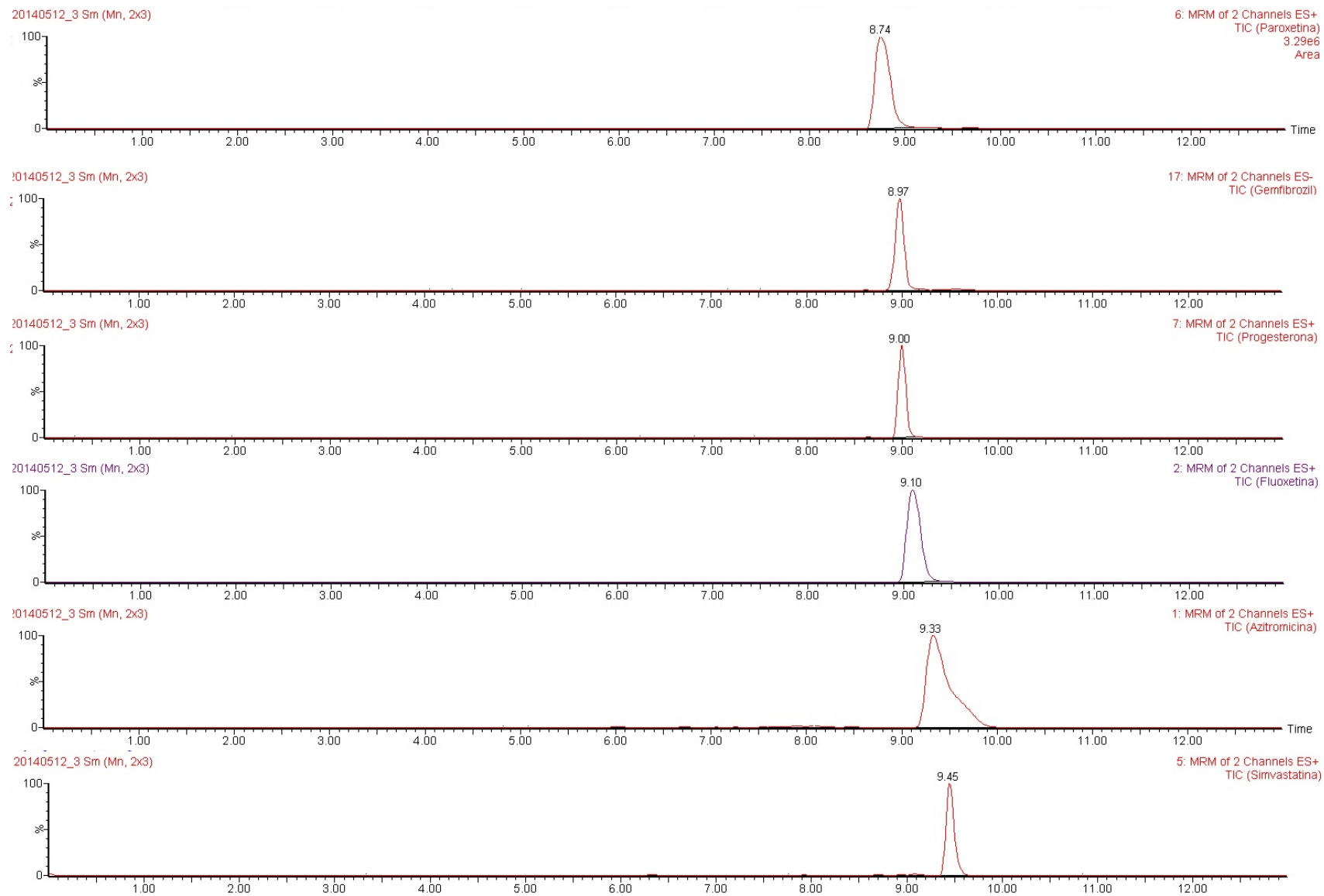
29. Gómez, M. J., Petrović, M., Fernández-Alba, A. R. & Barceló, D. Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters. *J. Chromatogr. A* **1114**, 224–33 (2006).
30. Benito-Peña, E., Partal-Rodera, a. I., León-González, M. E. & Moreno-Bondi, M. C. Evaluation of mixed mode solid phase extraction cartridges for the preconcentration of beta-lactam antibiotics in wastewater using liquid chromatography with UV-DAD detection. *Anal. Chim. Acta* **556**, 415–422 (2006).
31. Sousa, M. a, Gonçalves, C., Cunha, E., Hajšlová, J. & Alpendurada, M. F. Cleanup strategies and advantages in the determination of several therapeutic classes of pharmaceuticals in wastewater samples by SPE-LC-MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **399**, 807–22 (2011).
32. Notebook, A. Oasis sample preparation.
33. Oasis. Oasis Sample Extraction Products. at [http://www.waters.com/waters/en\\_US/Oasis-Sample-Extraction-Products/nav.htm?cid=513209&](http://www.waters.com/waters/en_US/Oasis-Sample-Extraction-Products/nav.htm?cid=513209&)
34. IAREN. *PT67 - Determinação de estrogénios e fármacos em águas por SPE e UPLC-MS/MS*. (2013).
35. Gros, M., Petrović, M. & Barceló, D. Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. *Talanta* **70**, 678–90 (2006).
36. Vazquez-Roig, P., Segarra, R., Blasco, C., Andreu, V. & Picó, Y. Determination of pharmaceuticals in soils and sediments by pressurized liquid extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1217**, 2471–83 (2010).
37. Gonc, C. M. O., Augusta, M., Sousa, D. & Alpendurada, P. S. P. M. Analysis of acidic , basic and neutral pharmaceuticals in river waters : clean-up by 1 , 2 amino anion exchange and enrichment using an hydrophilic adsorbent. **93**, 1–22 (2013).
38. Bielicka-Daszkiewicz, K. & Voelkel, A. Theoretical and experimental methods of determination of the breakthrough volume of SPE sorbents. *Talanta* **80**, 614–21 (2009).

## Anexo A.

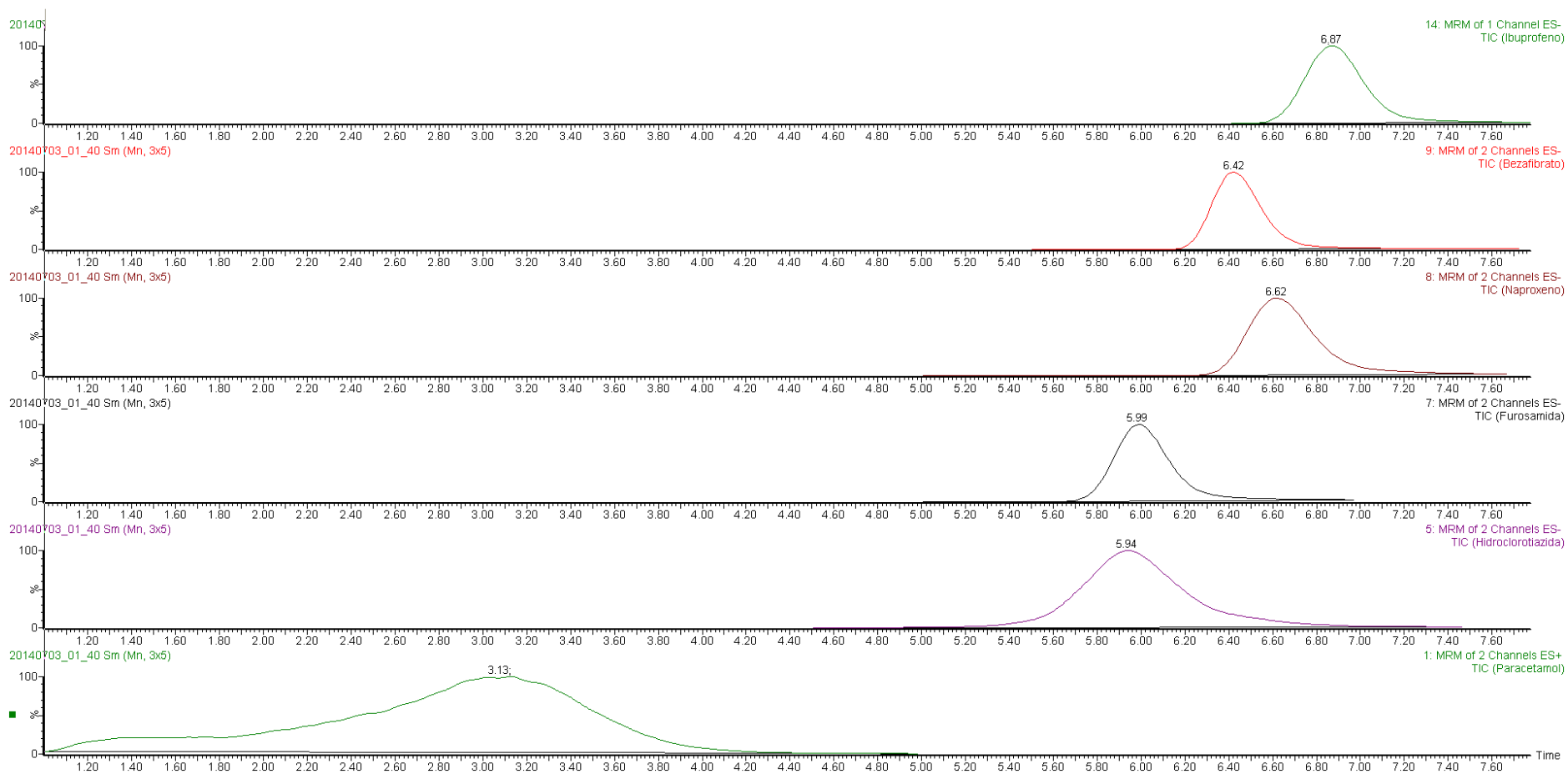
**Cromatograma da separação dos compostos em estudo obtido pelo método otimizado de off-line-SPE-UPLC-MS/MS**

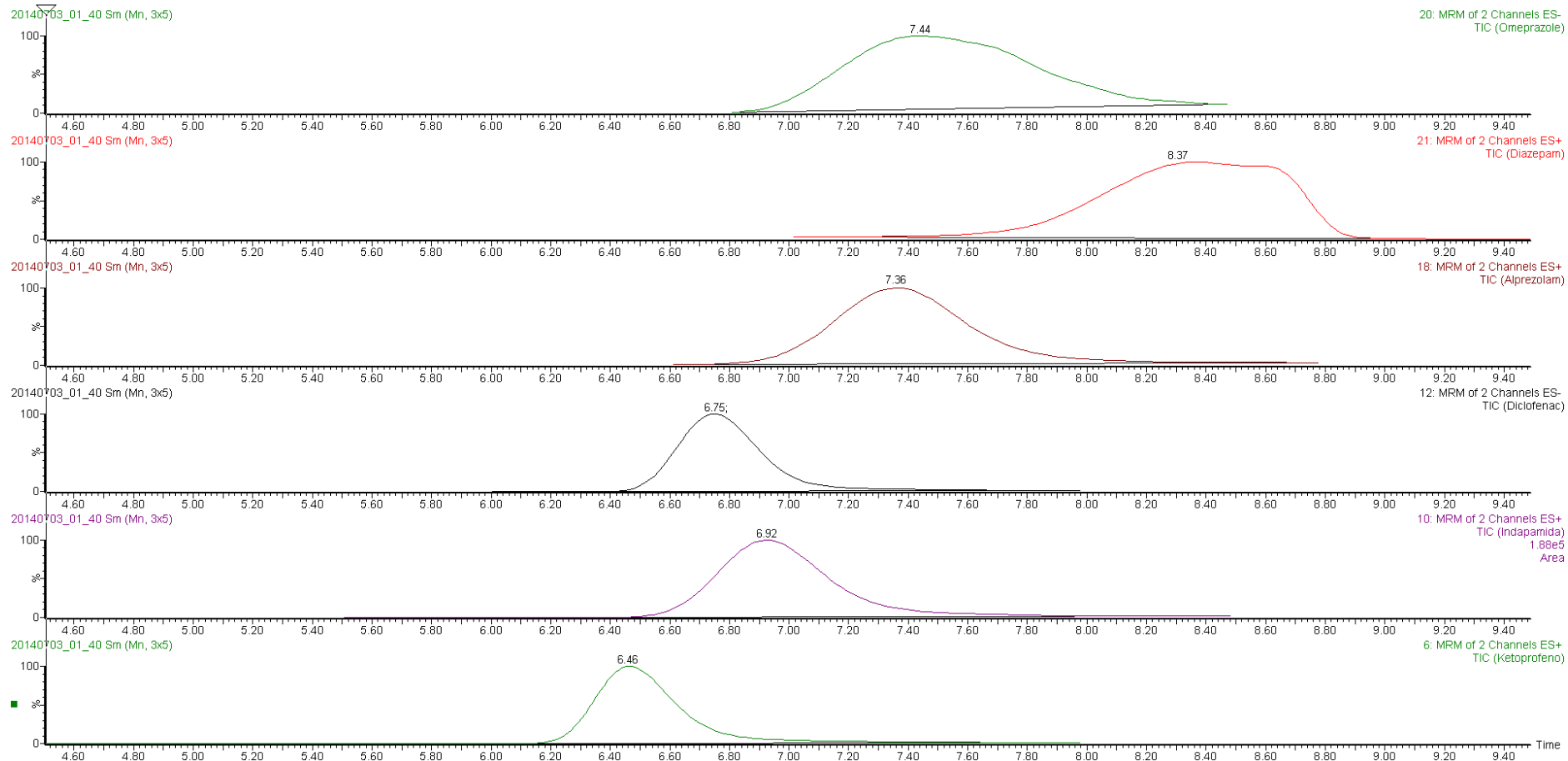




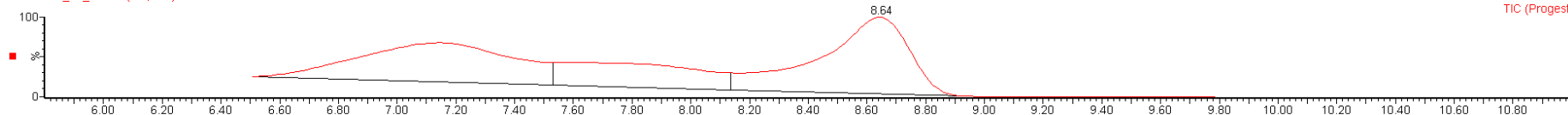


## Anexo B.

**Cromatograma da separação dos compostos em estudo obtido pelo método otimizado de on-line-SPE-UPLC-MS/MS**

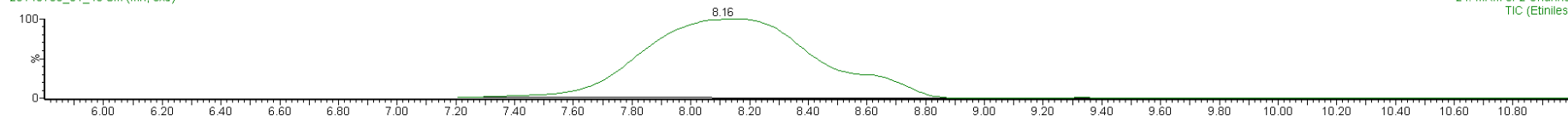


20140703\_01\_40 Sm (Mn, 3x5)



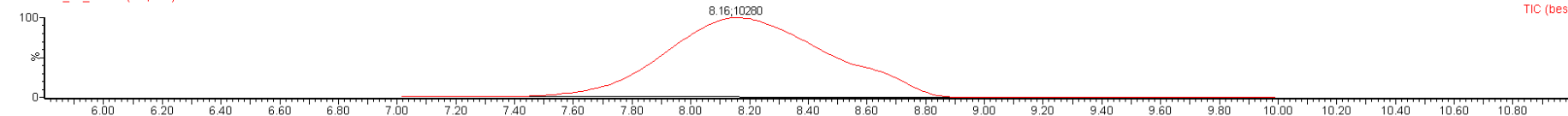
17: MRM of 2 Channels ES+  
TIC (Progesterona)

20140703\_01\_40 Sm (Mn, 3x5)



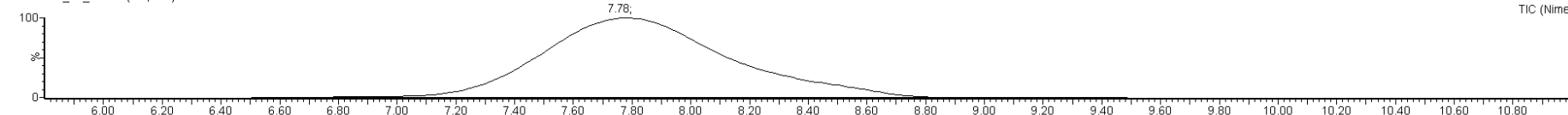
24: MRM of 2 Channels ES-  
TIC (Ethinilestradiol)

20140703\_01\_40 Sm (Mn, 3x5)



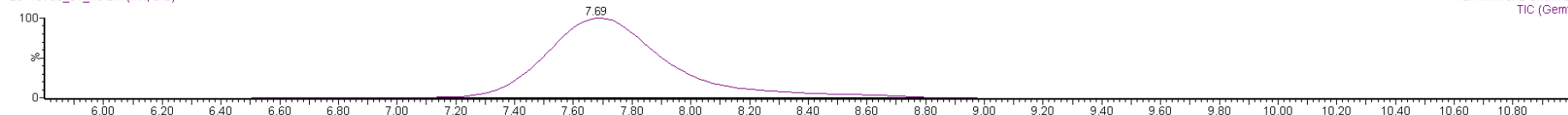
22: MRM of 2 Channels ES-  
TIC (bestradiol)

20140703\_01\_40 Sm (Mn, 3x5)



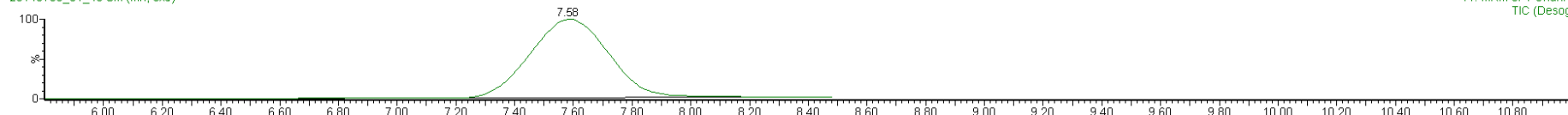
16: MRM of 2 Channels ES-  
TIC (Nimesulida)

20140703\_01\_40 Sm (Mn, 3x5)



15: MRM of 2 Channels ES-  
TIC (Gemfibrozil)  
9.75e4  
Area

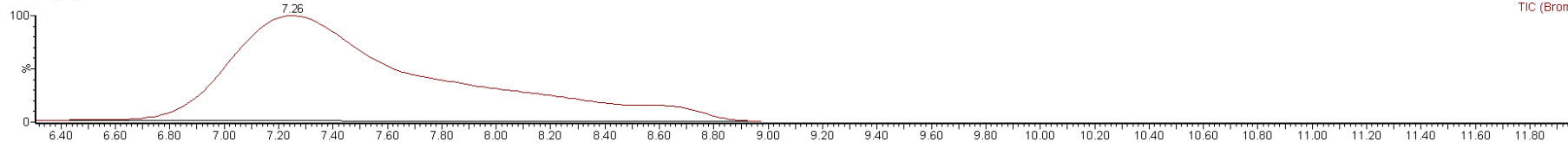
20140703\_01\_40 Sm (Mn, 3x5)



11: MRM of 1 Channel ES-  
TIC (Desogestrel)

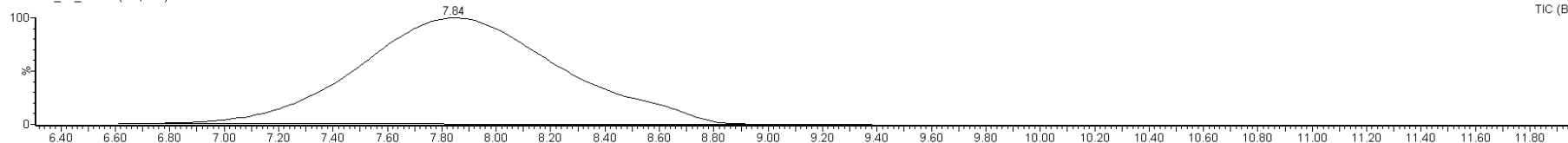
20140703\_01\_40 Sm (Mn, 3x5)

13: MRM of 2 Channels ES+  
TIC (Bromazepam)



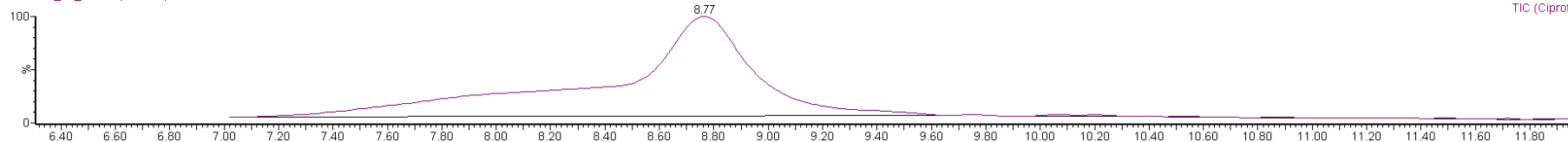
20140703\_01\_40 Sm (Mn, 3x5)

19: MRM of 2 Channels ES+  
TIC (Bisoprolol)



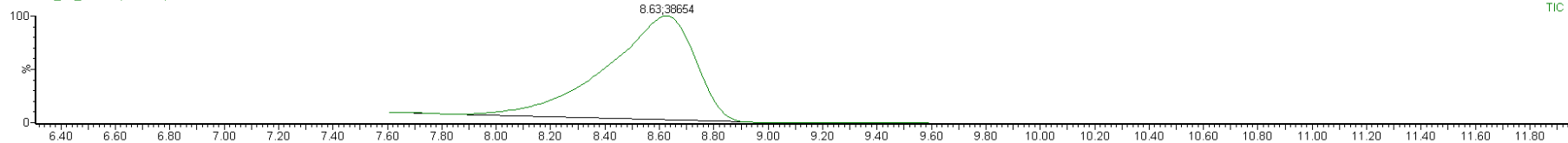
20140703\_01\_40 Sm (Mn, 3x5)

23: MRM of 2 Channels ES+  
TIC (Ciprofloxacina)



20140703\_01\_40 Sm (Mn, 3x5)

25: MRM of 2 Channels ES-  
TIC (Estrona)



20140703\_01\_40 Sm (Mn, 3x5)

26: MRM of 2 Channels ES+  
TIC (Simvastatina)

