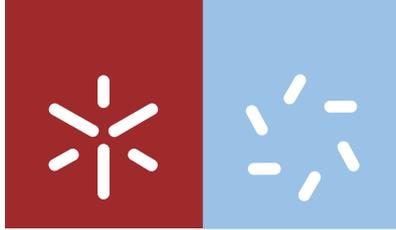


**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências

Marta Daniela Valença Machado

**Deteção de antidepressivos em  
águas superficiais e residuais**



**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências

Marta Daniela Valença Machado

**Deteção de antidepressivos em  
águas superficiais e residuais**

Dissertação de Mestrado  
Mestrado em Química Medicinal

Trabalho efetuado sob orientação da  
**Professora Doutora Ana Paula Bettencourt**  
do  
**Doutor César Oliveira**  
e da  
**Professora Doutora Cristina Delerue Matos**

outubro de 2013

## **Declaração**

**Nome:** Marta Daniela Valença Machado

**Endereço eletrónico:** pg19630@alunos.uminho.pt

**Título da Dissertação de Mestrado:**

**Orientadores:** Professora Doutora Ana Paula Bettencourt, Doutor César Oliveira e Professora Doutora Cristina Delerue-Matos

**Ano de conclusão:** 2013

**Designação do mestrado:** Mestrado em Química Medicinal

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Assinatura:

Universidade do Minho, outubro de 2013

## **Agradecimentos**

Gostaria de expressar os meus agradecimentos a todos os que contribuíram para a realização deste trabalho, em especial à Doutora Ana Paula Bettencourt, ao Doutor César Oliveira e à Doutora Cristina Delerue Matos, que me orientaram durante este trabalho, pelo apoio, interesse, disponibilidade e incentivo.

À Doutora Lúcia Santos, por todo o apoio e pela transmissão de conhecimentos durante o tempo em que estive no Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP).

À Mestre Paula Paíga, por toda a atenção, carinho e disponibilidade em ajudar enquanto estive no ISEP.

Ao Departamento de Química da Universidade do Minho e ao Grupo de Reações e Análises Químicas (GRAQ), do Instituto Superior de Engenharia do Porto, agradeço por me terem facultado as condições e os materiais necessários à realização do trabalho.

À minha família por estar sempre presente durante os momentos bons e nos mais difíceis durante a realização deste trabalho.

Ao Pedro, por toda a compreensão, apoio incondicional, e todas as palavras que me ajudaram a ultrapassar as adversidades que se impuseram neste percurso.



## Deteção de antidepressivos em águas superficiais e residuais

### Resumo

Nos últimos anos o consumo de antidepressivos em Portugal tem vindo a aumentar. Segundo estudos realizados pela Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde (INFARMED) desde 2010 este sofreu um incremento de cerca de 73%, sendo superior em indivíduos do sexo feminino, de meia-idade, desempregados e divorciados.

Pelo facto de parte da substância ativa da maioria dos antidepressivos ser metabolizada pelo organismo e da parte restante ser excretada sem qualquer tipo de degradação, o elevado consumo deste tipo de fármacos tem originado contaminações do meio ambiente com quantidades significativas em particular em águas superficiais e residuais. Estes compostos exibem características físico-químicas e biológicas que os tornam resistentes à biodegradação e, uma vez nas águas, causam dificuldades às estações de tratamento de águas residuais (ETARs) durante a sua remoção. Assim, a contaminação do meio ambiente por antidepressivos é por vezes elevada, atingindo águas, solos e organismos aquáticos.

Com este estudo pretende-se desenvolver um método de análise para a quantificação de três antidepressivos, fluoxetina, citalopram, sertralina e um metabolito, a norsertralina, em águas superficiais. A metodologia analítica desenvolvida utiliza a cromatografia líquida de ultra elevada eficiência acoplada à espectrometria de massa em *tandem* (UHPLC-MS/MS) precedida de extração em fase sólida (SPE).

O procedimento desenvolvido foi aplicado à determinação de antidepressivos inibidores seletivos da recaptção de serotonina numa amostra de água de um rio (rio Lima). A análise efetuada mostra que estes fármacos existem em quantidades muito reduzidas no rio em estudo.

**Palavras-chave:** Antidepressivos, UHPLC-MS/MS, extração em fase sólida, contaminação ambiental.



## **Detection of antidepressants in surface and waste water**

### **Abstract**

There has been a rapid increase in the use of antidepressants in Portugal. In fact, several INFARMED studies showed increased consumptions of about 73% since 2010, being this consumption higher among the female population, particularly the middle aged, unemployed and divorced individuals.

As the consumed active ingredients of most antidepressants are not fully metabolized, the excess is excreted without degradation, contaminating the environment with important impact on wastewaters. Once in the environment, these compounds exhibit physicochemical and biological characteristics that make them resistant to biodegradation, resulting in the inefficient removal of these compounds by wastewater treatment plants (WWTPs). Therefore, the antidepressant contamination can easily reach waters, soils and aquatic organisms.

This study was focused on the implementation of an analytical method to the quantification of three antidepressants, sertraline, fluoxetine, citalopram and a metabolite norsesertraline, in surface waters. The developed analytical methodology uses ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) preceded by solid phase extraction (SPE).

The developed procedure was applied to the determination of serotonin selective reuptake inhibitors in a sample of water from a river (Lima River). The analysis performed shows that these pharmaceuticals exist in very small quantities in the river under study.

**Keywords:** Antidepressants, UHPLC-MS/MS, solid phase extraction, environmental contamination.



## Índice geral

Agradecimentos .....	iii
Resumo .....	v
Abstract.....	vii
Índice geral .....	ix
Índice de tabelas .....	xi
Índice de figuras .....	xiii
Siglas e abreviaturas .....	xv
<b>Capítulo 1 - Introdução</b> .....	<b>1</b>
1. Introdução.....	3
1.1 Antidepressivos.....	3
1.2 Fármacos selecionados para a realização deste trabalho .....	4
1.2.1 Inibidores seletivos da recaptção de serotonina .....	4
1.2.2 Propriedades físico-químicas .....	5
1.2.3 Mecanismo de ação .....	6
1.2.4 Farmacocinética.....	7
1.3 Impacto ambiental dos antidepressivos .....	8
<b>Capítulo 2 - Técnicas analíticas</b> .....	<b>9</b>
2. Técnicas analíticas.....	11
2.1 Metodologias para deteção de antidepressivos em águas .....	11
2.1.1 Extração em fase sólida .....	11
2.1.2 Análise cromatográfica de antidepressivos em águas residuais e superficiais	13
2.2 Validação do método .....	15
2.2.1 Quantificação.....	15
2.2.2 Seletividade .....	16
2.2.3 Curva de calibração e linearidade.....	16
2.2.4 Limites de deteção e quantificação.....	16
2.2.5 Recuperação .....	17

<b>Capítulo 3 - Materiais e métodos</b> .....	19
3. Materiais e métodos.....	21
3.1 Reagentes e soluções .....	21
3.1.1 Preparação das soluções padrão .....	21
3.1.2 Preparação das soluções para a curva de calibração .....	22
3.1.3 Preparação de outras soluções .....	22
3.2 Método de extração de SPE .....	22
3.3 Análise cromatográfica .....	23
3.4 Preparação da amostra real .....	23
<b>Capítulo 4 – Análise e discussão dos resultados</b> .....	25
4. Análise e discussão dos resultados .....	27
4.1 Otimização do método .....	27
4.1.1 Otimização dos parâmetros do analisador de massa no modo SCAN .....	27
4.1.2 Otimização das condições no modo MRM .....	33
4.1.3. Otimização dos parâmetros do analisador de massa, temperatura da linha de dessolvatação, a temperatura do bloco, o fluxo do gás nebulizador, o fluxo do gás de secagem e a voltagem da interface .....	39
4.1.4 Análise quantitativa utilizando o MRM .....	44
4.1.5 Otimização das condições cromatográficas .....	45
4.1.6 Otimização dos parâmetros de SPE.....	46
4.1.6.1 Coluna Bond Elut Plexa (200 mg, 6 mL) da <i>Agilent</i> .....	47
4.1.6.2 Coluna STRATA-X (200 mg, 3 mL) da <i>Phenomenex</i> .....	48
4.1.6.3 Coluna OASIS MCX (150 mg, 6 mL) da <i>Waters</i> .....	50
4.2 Curvas de calibração .....	52
4.3 Aplicação do método desenvolvido a amostras de água do rio lima .....	55
<b>Capítulo 5 - Conclusão</b> .....	57
5. Conclusão .....	59
<b>Capítulo 6 - Referências bibliográficas</b> .....	61
6. Referências bibliográficas .....	63
<b>Anexos</b> .....	67
Anexo 1.....	69

## Índice de tabelas

Tabela 1.1 - Propriedades físico-químicas dos compostos testados, três antidepressivos, fluoxetina, citalopram e sertralina e um metabolito desta, a norsertralina...	6
Tabela 4.1 - Ião precursor e iões produto presentes no espectro de massa MRM da fluoxetina e respectivas intensidades .....	34
Tabela 4.2 - Ião precursor e iões produto presentes no espectro de massa MRM do citalopram e respectivas intensidades .....	35
Tabela 4.3 - Ião precursor e iões produto presentes no espectro de massa MRM da sertralina e respectivas intensidades .....	36
Tabela 4.4 - Ião precursor e iões produto presentes no espectro de massa MRM da norsertralina e respectivas intensidades .....	37
Tabela 4.5 - Ião precursor e iões produto presentes no espectro de massa MRM da fluoxetina deuterada e respectivas intensidades .....	38
Tabela 4.6 - Parâmetros do detetor MS otimizados.....	43
Tabela 4.7: Rácio dos iões da primeira e da segunda transição (MRM1/MRM2) para os diferentes fármacos em estudo .....	44
Tabela 4.8 - Composição da fase móvel selecionada para análise, A= H <sub>2</sub> O contendo 1% HCOOH, B= ACN, caudal= 0,3 mL/min.....	45
Tabela 4.9 - Tempos de retenção dos fármacos em estudo, fluoxetina, citalopram, sertralina e norsertralina, e do padrão interno (fluoxetina deuterada), iões precursores e respectivos iões produto e energias de colisão utilizadas. A análise foi realizada nas condições indicadas nas tabelas 4.6 e 4.8 .....	46
Tabela 4.10 - Recuperações obtidas para os fármacos em análise utilizando a coluna Bond Elut Plexa (200 mg, 6 mL) da <i>Agilent</i> , para cada um dos parâmetros em estudo.....	48
Tabela 4.11 - Recuperações obtidas para os fármacos em análise utilizando a coluna STRATA-X (200 mg, 3 mL) da <i>Phenomenex</i> , para cada um dos parâmetros em estudo .....	49
Tabela 4.12 - Recuperações obtidas para os fármacos em análise utilizando a coluna OASIS MCX (150 mg, 6 mL) da <i>Waters</i> , para cada um dos parâmetros em estudo .....	51
Tabela 4.13 - Parâmetros das retas de calibração obtidas para a fluoxetina, a sertralina, o citalopram e a norsertralina, com as incertezas associadas, para um nível de confiança de 95% .....	54

Tabela 4.14 - Limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) determinados a partir das curvas de calibração para cada um dos fármacos .....	55
Tabela 4.15 - Concentrações obtidas para cada um dos fármacos nas amostras de água do rio Lima .....	56
Tabela A.1 - Primeiro gradiente de eluição testado.....	69
Tabela A.2 - Segundo gradiente de eluição testado.....	69
Tabela A.3 - Terceiro gradiente de eluição testado .....	70
Tabela A.4 - Quarto gradiente de eluição testado .....	70
Tabela A.5 - Quinto gradiente de eluição testado .....	70
Tabela A.6 - Sexto gradiente de eluição testado .....	71
Tabela A.7 - Sétimo gradiente de eluição testado .....	71

## Índice de figuras

Figura 1.1 – Estrutura da Fluoxetina .....	5
Figura 1.2 – Estrutura da Sertralina.....	5
Figura 1.3 – Estrutura da Norsertalina .....	5
Figura 1.4 – Estrutura do Citalopram .....	5
Figura 2.1 – Esquema de uma coluna de SPE .....	12
Figura 2.2 – Esquema de um procedimento de SPE em modo “off-line” .....	12
Figura 4.1 - Espetro de massa de uma solução 10 mg/L de fluoxetina em metanol, obtido por injeção direta no modo SCAN por a) ionização positiva, quadrupolo Q3; b) ionização positiva, quadrupolo Q1; c) ionização negativa, quadrupolo Q3 e d) ionização negativa, quadrupolo Q1 .....	28
Figura 4.2 - Espetro de massa de uma solução 10 mg/L de citalopram em metanol obtido por injeção direta no modo SCAN por a) ionização positiva, quadrupolo Q3; b) ionização positiva, quadrupolo Q1; c) ionização negativa, quadrupolo Q3 e d) ionização negativa, quadrupolo Q1 .....	29
Figura 4.3 - Espetro de massa de uma solução 10 mg/L de sertralina em metanol, obtido por injeção direta no modo SCAN por a) ionização positiva, quadrupolo Q3; b) ionização positiva, quadrupolo Q1; c) ionização negativa, quadrupolo Q3 e d) ionização negativa, quadrupolo Q1 .....	30
Figura 4.4 - Espetro de massa de uma solução 10 mg/L de norsertalina em metanol, obtido por injeção direta no modo SCAN por a) ionização positiva, quadrupolo Q3; b) ionização positiva, quadrupolo Q1; c) ionização negativa, quadrupolo Q3 e d) ionização negativa, quadrupolo Q1 .....	31
Figura 4.5 - Espetro de massa de uma solução 10 mg/L de fluoxetina deuterada em metanol, obtido por injeção direta no modo SCAN por a) ionização positiva, quadrupolo Q1 e b) ionização positiva, quadrupolo Q3 .....	32
Figura 4.6 - Espetro de massa MRM dos fragmentos de fluoxetina (solução 10 mg/L em metanol); ão precursor m/z 310,20 .....	34
Figura 4.7 - Espetro de massa MRM dos fragmentos de citalopram (solução 10 mg/L em metanol); ão precursor m/z 325,00. ....	35
Figura 4.8 - Espetro de massa MRM dos fragmentos de uma solução de sertralina (solução 10 mg/L em metanol); ão precursor m/z 306,10.....	36
Figura 4.9 - Espetro de massa MRM dos fragmentos da norsertalina (solução 10 mg/L em metanol); ão precursor m/z 333,10 .....	37

Figura 4.10 - Espectro de massa MRM dos fragmentos da fluoxetina deuterada (solução 10 mg/L em metanol); íão precursor m/z 315,30 .....	38
Figura 4.11 - Variação da área do pico obtido para cada fármaco em função do valor da temperatura da linha de dessolvatação .....	39
Figura 4.12 - Variação da área do pico obtido para cada fármaco em função do valor da temperatura do bloco .....	40
Figura 4.13 - Variação da área do pico obtido para cada fármaco em função do valor do fluxo do gás nebulizador .....	41
Figura 4.14 - Variação da área do pico de cada fármaco em função do valor de fluxo do gás de secagem .....	42
Figura 4.15 - Variação da área do pico obtido para cada fármaco em função do valor da voltagem da interface .....	43
Figura 4.16 - Curva de calibração da razão das áreas dos picos da fluoxetina e do padrão interno ( $A_{st}/A_{pi}$ ) em função da razão das concentrações correspondentes ( $C_{st}/C_{pi}$ ) obtidos na análise por UHPLC-MS/MS.....	52
Figura 4.17 - Curva de calibração da razão das áreas dos picos da sertralina e do padrão interno ( $A_{st}/A_{pi}$ ) em função da razão das concentrações correspondentes ( $C_{st}/C_{pi}$ ) obtidos na análise por UHPLC-MS/MS.....	53
Figura 4.18 - Curva de calibração da razão das áreas dos picos do citalopram e do padrão interno ( $A_{st}/A_{pi}$ ) em função da razão das concentrações correspondentes ( $C_{st}/C_{pi}$ ) obtidos na análise por UHPLC-MS/MS.....	53
Figura 4.19 - Curva de calibração da razão das áreas dos picos da norsertalina e do padrão interno ( $A_{st}/A_{pi}$ ) em função da razão das concentrações correspondentes ( $C_{st}/C_{pi}$ ) obtidos na análise por UHPLC-MS/MS.....	54

## Siglas e abreviaturas

A<sub>pi</sub> - área do pico cromatográfico do padrão interno

ANES - Antidepressivos noradrenérgicos e específicos serotoninérgicos

A<sub>st</sub> - área do pico cromatográfico do padrão

AVAI<sub>s</sub> - Anos de vida ajustados por incapacidade

C - concentração

CE - Energia de colisão (*collision energy*)

C<sub>pi</sub> - concentração do padrão interno

CIT - Citalopram

C<sub>st</sub> - concentração do padrão

DAD – Detetor de fila de díodos (*Diode Array Detetor*)

DCM - Diclorometano

EDTA - Ácido etilenodiaminotetraacético

ESI - Ionização por electrospray (*electrospray ionization*)

et al - e outros

ETAR - Estação de tratamento de águas residuais

EtOAc – Acetato de etilo

FLD - Detetor de fluorescência

FLX - Fluoxetina

FLX-d5 - Fluoxetina deuterada

GC - Cromatografia gasosa (*gas chromatography*)

GC-MS - Cromatografia gasosa acoplada à Espectrometria de massa (*gas chromatography coupled to mass spectrometry*)

HPLC – Cromatografia líquida de elevada eficiência (*high performance liquid chromatography*)

INFARMED - Autoridade nacional do medicamento e Produtos de Saúde, I.P.

ISRSNs - Inibidores seletivos da recaptção da serotonina e noradrenalina

ISRSs - Inibidores seletivos da recaptção da serotonina

LC-MS – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (*liquid chromatography coupled to mass spectrometry*)

LC-MS/MS - Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa tandem (*liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*)

LOD – Limite de detecção (*limit of detection*)

LOD- Limite de quantificação (*limit of quantification*)

m/z - Razão massa/carga

MeOH – Metanol

MRM - Monitorização de reação múltipla (*multiple reaction monitoring*)

MS – Espectrometria de massa (*mass spectrometry*)

MS/MS – Espectrometria de massa em tandem (*tandem mass spectrometry*)

NI - Ionização negativa (*negative ionization*)

NOR-SRT - Norsertralina

OMS – organização mundial de saúde

PI - Ionização positiva (*positive ionization*)

PI - Padrão interno

POE - Poluentes orgânicos emergentes

Q1 – Quadrupolo 1

Q3 - Quadrupolo 3

$r^2$  - coeficiente de correlação

RSD – Desvio padrão relativo (*relative standard deviation*)

SPE - Extração em fase sólida (*solid phase extraction*)

SRT- sertralina

$t_{1/2}$  - tempo de meia vida

$t_r$  - tempo de retenção

UHPLC - Cromatografia líquida de ultra elevada eficiência (*ultra-high performance liquid chromatography*)

UHPLC-MS/MS - Cromatografia líquida de ultra elevada eficiência acoplada à espectrometria de massa em tandem (*ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*)

# CAPÍTULO 1

## INTRODUÇÃO



## **1. Introdução**

A depressão é uma doença psiquiátrica bastante comum que afeta os indivíduos que são atingidos por tristeza prolongada, perda de interesse por atividades anteriormente agradáveis, perturbações do sono e apetite, perda de energia ou cansaço fácil. Esta doença pode atingir indivíduos de todas as idades, desde a infância à terceira idade, podendo conduzir ao suicídio se não devidamente tratada <sup>[1]</sup>. Estima-se que esteja associada à perda anual de 850 mil vidas, representando mais de 1200 mortes em Portugal. Um estudo realizado pela organização mundial de saúde (OMS) <sup>[1]</sup> prevê que até ao ano de 2020 a depressão ocupe o segundo lugar no ranking de “Anos de Vida Ajustados por Incapacidade” (AVAI) calculado para todas as idades de ambos os sexos.

No tratamento desta doença utilizam-se frequentemente antidepressivos em combinação com ajuda psiquiátrica. Os antidepressivos são a base do tratamento por produzirem grandes melhorias nos sintomas de depressão, em média, de 60 a 70% no prazo de um mês. Por esta razão, o consumo de antidepressivos em Portugal tem vindo a aumentar ao longo dos anos. Segundo dados do INFARMED (Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.) <sup>[1]</sup> ocorreu um aumento de 73% no consumo de antidepressivos desde o ano de 2000 até ao presente. Devido ao grande aumento no consumo deste tipo de fármacos, tem-se tornado mais premente o seu estudo e a avaliação da sua presença no ambiente <sup>[2]</sup>.

### **1.1 – Antidepressivos**

Os antidepressivos são substâncias utilizadas no tratamento de doenças como a bulimia, doença bipolar e, principalmente, a depressão <sup>[3]</sup>. A ação destes fármacos é lenta e progressiva, não sendo os seus efeitos visíveis nos primeiros dias de administração mas apresentando efeitos prolongados no tempo. Como qualquer outro fármaco, os antidepressivos produzem efeitos secundários imediatos, mas atendendo aos benefícios que produzem no paciente, são bem aceites.

O desenvolvimento dos antidepressivos, na década de 50, trouxe avanços importantes no entendimento e tratamento de possíveis mecanismos subjacentes aos transtornos depressivos <sup>[4,5,6]</sup>. Até aos anos 80 existiam apenas duas classes de antidepressivos, os

tricíclicos e os inibidores de monoaminoxidase. Estes antidepressivos embora fossem eficazes e por isso muito utilizados apresentavam frequentemente efeitos secundários importantes, sendo perigosos pela sua inespecificidade e, em doses mais elevadas poderiam ser letais. Apesar dos efeitos secundários associados ao seu uso estes antidepressivos ainda são bastante utilizados atualmente <sup>[6]</sup>.

Nas últimas décadas surgiram novas classes de antidepressivos, denominados de nova geração, não tricíclicos, sendo os mais importantes os inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRSs). Surgiram, também, os inibidores seletivos da recaptção de serotonina e noradrenalina (ISRSNs) e os noradrenérgicos e específicos serotoninérgicos (ANES). Este novo tipo de antidepressivos, com o qual se tenta substituir a utilização de antidepressivos tricíclicos, apresenta efeitos secundários menos acentuados e maior tolerância, com efeitos clínicos mais dirigidos. O tratamento com antidepressivos não deve ser prolongado pois estes fármacos habitualmente provocam uma grande dependência.

## **1.2 Fármacos selecionados para a realização deste trabalho**

Apresentar-se-ão seguidamente algumas características dos fármacos estudados neste trabalho. Serão mencionadas algumas características físico-químicas relevantes para a seleção do método analítico e otimização das condições instrumentais, de forma a evitar-se a ocorrência de reações secundárias ou a degradação da estrutura química do composto durante a aplicação do método analítico.

Os fármacos em estudo são a **sertralina**, o seu principal metabolito a **norsertalina**, a **fluoxetina** e o **citalopram**.

### **1.2.1 Inibidores seletivos da recaptção da serotonina**

A produção de ISRS resultou da busca de uma nova classe de medicamentos, tão eficazes quanto os antidepressivos tricíclicos, que apresentassem menores problemas de tolerabilidade e segurança <sup>[7]</sup>.

O primeiro ISRS introduzido no mercado foi a fluoxetina, em 1987, tendo esta alterado a atitude sobre o tratamento farmacológico da depressão. As razões para este facto incluíram dois aspetos essenciais: i) os efeitos adversos iniciais da fluoxetina eram, em

geral, melhor tolerados relativamente aos tratamentos pré-existentes; e ii) a fluoxetina apresentava uma posologia simplificada. Posteriormente introduziram-se outros ISRS partilhando as mesmas propriedades básicas da fluoxetina [8]. Os ISRS constituem um grupo heterogéneo do ponto de vista químico, com efeitos terapêuticos muito próximos dos tricíclicos [9].

### 1.2.2 Propriedades físico-químicas [adaptado de 10]

Nas figuras 1.1 a 1.4 são apresentadas as fórmulas de estrutura dos quatro fármacos em estudo.

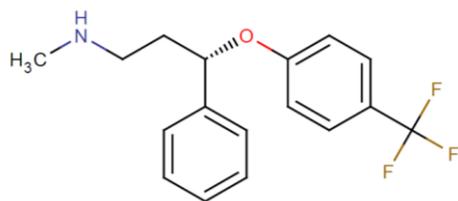


Figura 1.1- Estrutura da Fluoxetina

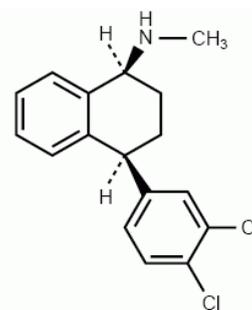


Figura 1.2 - Estrutura da sertralina

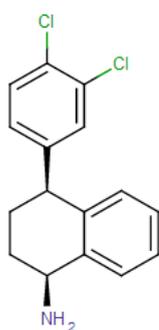


Figura 1.3 - Estrutura da norsertalina

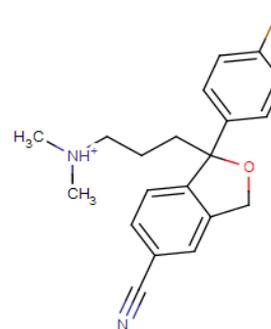


Figura 1.4 - Estrutura do citalopram

Na tabela 1.1 apresentam-se algumas das propriedades físicas e químicas dos compostos em estudo neste trabalho.

Tabela 1.1 - Propriedades físico-químicas dos compostos testados, três antidepressivos, fluoxetina, citalopram e sertralina e um metabolito desta, a norsertalina.

Composto	Fórmula química	pK <sub>a</sub>	Massa molecular (g mol <sup>-1</sup> )	Designação IUPAC
Fluoxetina	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> F <sub>3</sub> NO	9.80	309.3261	metil[(3S)-3-fenil-3-[4-(trifluorometil)fenoxi]propil]amina
Sertralina	C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>2</sub> N	9.85	306.23	(1S-4S)-4-(3,4-diclorofenil)-1,2,3,4-tetrahydro-N-metil-1-naftilenamina
Norsertalina	C <sub>16</sub> H <sub>15</sub> Cl <sub>2</sub>	9.73	292.203	(1S,4S)-4-(3,4-diclorofenil)-1,2,3,4-tetrahidronaftaleno-1-amina
Citalopram	C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> FN <sub>2</sub> O	9.78	324.3919	(RS)-1-[3-(dimetilamino)propil]-1-(4-fluorofenil)-1,3-dihidroisobenzofuran-5-carbonitrilo

### 1.2.3 Mecanismo de ação

Os antidepressivos são fármacos que melhoram o humor e, conseqüentemente melhoram globalmente a capacidade física e psíquica dos indivíduos afetados. Acredita-se que o efeito antidepressivo decorra do aumento da disponibilidade de neurotransmissores no sistema nervoso central, principalmente da serotonina (5-HT), da noradrenalina ou norepinefrina (NE) e da dopamina (DA), ao bloquearem recetores pré-sinápticos da serotonina (5HT2). O citalopram, a fluoxetina, a fluvoxamina, a paroxetina, a venlafaxina e a sertralina são alguns exemplos deste tipo de antidepressivos.

Os antidepressivos atuam no *sistema límbico*, aumentando os níveis de *noradrenalina* e de *serotonina* na fenda sináptica. Este aumento da disponibilidade dos neurotransmissores na fenda sináptica é conseguido através da inibição na recaptação destas aminas pelos recetores pré-sinápticos. Com o uso prolongado de antidepressivos ocorre uma diminuição do número de recetores pré-sinápticos, cuja estimulação inibiria a libertação de noradrenalina. Quanto menor for o número destes recetores mais noradrenalina estaria disponível na fenda sináptica. Deste modo, estes dois mecanismos estão relacionados com a recaptação: um inibe diretamente a recaptação enquanto o outro diminui o número de recetores<sup>[11]</sup>.

De um modo geral, a *serotonina* regula o humor, o sono, a atividade sexual, o apetite, o ritmo cardíaco, as funções neuroendócrinas, temperatura corporal, sensibilidade à dor, atividade motora e funções cognitivas <sup>[11]</sup>. Os antidepressivos ajudam a recuperar ou corrigir todas estas capacidades do ser humano.

A serotonina é uma monoamina, uma molécula que está envolvida na comunicação entre os neurónios. A comunicação que se estabelece entre os neurónios é muito importante para que se possa assimilar o meio envolvente de forma a responder-se aos diferentes estímulos ambientais. A serotonina é o produto da transformação do aminoácido L-triptofano. O triptofano, 5-HTP (5-hidroxitriptofano) é um nutriente encontrado em alimentos ricos em proteínas como carne, peixe, e laticínios e, a sua importância na psiquiatria deve-se ao facto de ser o precursor direto da **serotonina**. Atualmente a *serotonina* está intimamente relacionada com alterações *do humor* ou *transtornos afetivos*, pelo que a maioria dos medicamentos antidepressivos atuam produzindo um aumento da disponibilidade dessa substância no espaço entre os neurónios <sup>[12]</sup>.

Considera-se a serotonina um dos neurotransmissores mais importantes, determinando os seus níveis no organismo se o indivíduo se encontra deprimido, propenso à violência, irritado, impulsivo ou com distúrbios alimentares. Como níveis elevados de **serotonina** podem elevar o humor e produzir uma *sensação de bem-estar*, a sua falta no cérebro ou anormalidades no seu metabolismo relacionam-se com problemas psiquiátricos, como a depressão, ansiedade, agressividade, comportamento compulsivo, ou problemas afetivos, entre outros <sup>[12]</sup>.

#### 1.2.4 Farmacocinética

Os ISRS são bem absorvidos, exibindo elevada biodistribuição oral <sup>[13]</sup>. Em relação ao metabolismo, dos ISRS estudados, a fluoxetina, a sertralina e o citalopram originam metabolitos que mantêm a atividade biológica <sup>[9]</sup>. A sertralina origina um metabolito ativo, a norsertralina, que apresenta um tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) aproximado de 71 horas <sup>[14]</sup>. Quanto à fluoxetina, o seu metabolismo é bastante complexo pois origina um metabolito, a norfluoxetina, com um  $t_{1/2}$  que varia de 77 a 235 horas. Por outro lado, a cinética da fluoxetina não é linear, estando as elevadas doses associadas a concentrações

plasmáticas também, demasiado elevadas. Além disso, após um longo período da administração, o  $t_{1/2}$  da fluoxetina torna-se ainda mais prolongado, provavelmente devido ao facto de inibir o seu próprio metabolismo. Apesar destas particularidades, a fluoxetina é geralmente bem tolerada mesmo entre indivíduos idosos, de igual forma a outros ISRS <sup>[14]</sup>. Contudo podem ocorrer algumas interações devido aos seus efeitos sobre o sistema hepático microsomal CYP 2D6.

O citalopram tem um  $t_{1/2}$  de aproximadamente 35 horas. Os metabolitos deste, o desmetilcitalopram e o didesmetilcitalopram têm um  $t_{1/2}$  aparente de 49 e de 102 horas, respetivamente.

Visto que os ISRS têm uma margem terapêutica ampla, é raro que outros medicamentos originem aumentos problemáticos nas suas concentrações. No entanto, quando coadministrados com outros fármacos, os ISRS originam frequentemente inibição do metabolismo desses medicamentos.

### **1.3 – Impacto ambiental dos antidepressivos**

Os poluentes emergentes são substâncias químicas cuja presença no ambiente não é regulada por legislação internacional ou nacional, não existindo por isso qualquer obrigatoriedade da sua monitorização. No entanto, pelas suas características podem representar uma potencial ameaça para os ecossistemas e saúde humana <sup>[6]</sup>.

Os poluentes orgânicos emergentes (POE) têm sido alvo de uma atenção especial por serem moléculas biologicamente ativas, e na sua grande maioria apresentarem baixa biodegradabilidade no meio ambiente, principalmente nas águas. Estas propriedades intrínsecas originam um grande potencial para a sua bioacumulação e persistência no meio aquático, assim como nos solos. Os progressos na instrumentação analítica e no desenvolvimento de técnicas de extração e análise possibilitam a deteção e identificação de novos compostos em gamas de concentração cada vez mais baixas, contribuindo para uma mais eficaz monitorização da contaminação do meio ambiente pelos fármacos <sup>[7]</sup>.

## CAPÍTULO 2

# TÉCNICAS ANALÍTICAS



## 2. Técnicas Analíticas

Nesta secção serão descritas as técnicas analíticas utilizadas neste trabalho.

### 2.1 Metodologias para a deteção de antidepressivos em águas

#### 2.1.1 Extração em fase sólida

A *extração em fase sólida* (SPE) é uma das técnicas de preparação de amostras mais utilizadas na análise de antidepressivos em águas <sup>[14]</sup>. O objetivo principal da SPE é a remoção do analito a partir da matriz em que se encontra, eliminando no mesmo processo interferentes da matriz (substâncias proteicas, sais, ureia, ácidos gordos, etc.) e a sua posterior concentração num pequeno volume de solvente adequado à análise cromatográfica.

O modo de separação mais utilizado na SPE é o de fase reversa, e foi, o mecanismo utilizado neste trabalho em que, a fase estacionária utilizada é apolar, isto é, as partículas adsorventes são hidrofóbicas, como por exemplo, a sílica ligada a grupos octadecilsilano (C<sub>18</sub>) e octilsilano (C<sub>8</sub>) <sup>[17]</sup>. Os solventes de eluição são em regra polares como por exemplo, o metanol ou acetone nitrilo <sup>[18]</sup>. Este tipo de separação implica uma fase móvel polar ou moderadamente polar, sendo que o analito de interesse a ser recuperado é, de uma forma geral, medianamente polar ou apolar. <sup>[19]</sup>

Os analitos contidos na matriz líquida são extraídos após passarem por um cartucho contendo uma fase estacionária para a qual têm afinidade, ficando retidos. Nesta técnica, os materiais adsorventes dependem das características dos compostos analisados, em particular do seu pK<sub>a</sub>. Neste trabalho foram testadas três colunas de SPE, Bond Elut Plexa (200 mg, 6 mL) da *Agilent*, STRATA-X (200 mg, 3 mL) da *Phenomenex* e OASIS MCX (150 mg, 6 mL) da *waters*. Estas colunas foram escolhidas com base nas características dos fármacos em estudo pois, são adequadas para o estudo de compostos apolares e com valores de pK<sub>a</sub> entre 8 e 10 e, os três antidepressivos e o metabolito em estudo são todos apolares e têm valores de pK<sub>a</sub> na ordem dos 9,7.

Como procedimento geral, efetua-se o acondicionamento inicial do material adsorvente da coluna ativando-a com a passagem de solvente orgânico. Após a ativação da coluna introduz-se a amostra previamente filtrada para eliminação da matéria orgânica em suspensão. De seguida procede-se à lavagem com solvente adequado de forma a remover os interferentes que tenham ficado adsorvidos na coluna. Finalmente utiliza-se

como eluente um solvente orgânico apropriado de forma a desadsorver os analitos de interesse da coluna. Por último, o solvente é evaporado, a amostra é redissolvida para ser posteriormente analisada.

Esta técnica apresenta muitas vantagens por, em geral, permitir obter taxas de recuperação e reprodutibilidade elevadas, baixos volumes de eluição, utilizar solventes de toxicidade reduzida e ser uma técnica rápida e simples de executar [15]. A SPE pode implementar-se em duas formas distintas: i) na forma “on-line”, quando o sistema SPE está diretamente ligado ao sistema cromatográfico de análise, ou na forma “off-line”, quando o processo SPE é realizado separadamente do processo de análise.

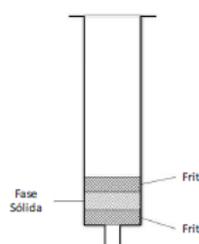


Figura 2.1 - Esquema de um cartucho de SPE

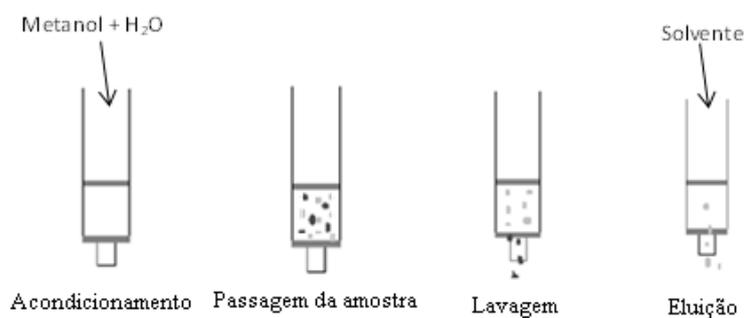


Figura 2.2 - Esquema de um procedimento de SPE em modo “off-line”

### **2.1.2 Análise cromatográfica de antidepressivos presentes em águas residuais e superficiais**

A identificação e quantificação de fármacos no ambiente é uma atividade cada vez mais frequente.

Os métodos analíticos têm sofrido um grande desenvolvimento, de modo a permitirem a obtenção de baixos limites de quantificação e uma maior seletividade, destacando-se as técnicas de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS), cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS), a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa tandem (LC-MS/MS) e a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa tandem (GC-MS/MS) <sup>[16]</sup>.

A cromatografia é uma técnica analítica de separação de moléculas ou iões e integra uma fase estacionária e uma fase móvel – que transporta os analitos ao longo da fase estacionária. No caso da cromatografia líquida (LC), a fase móvel é um líquido e a fase estacionária apresenta-se como o preenchimento da coluna analítica de separação cromatográfica.

A cromatografia líquida apresenta duas fases com interação seletiva, uma vez que a fase móvel e estacionária competem pelos analitos, o que resulta numa melhor separação das substâncias. Ambas as fases interagem livremente com cada analito, sendo que diferenças de adsorção, troca iónica e tamanho levam a diferentes graus de interação, resultando na separação dos compostos. Quanto maior for o grau de interação do analito com a coluna, mais tempo demora a ser eluído, apresentando, por isso, um tempo de retenção superior.

Observa-se ainda que a utilização de um gradiente de concentrações durante a separação cromatográfica permite uma melhor separação dos analitos presentes na mistura. A análise ao eluato, através de um detetor adequado, é regra geral contínua, sendo o resultado final de uma análise cromatográfica um cromatograma, que não é mais do que a representação gráfica da intensidade relativa dos picos eluídos em função do seu tempo de retenção (intensidade relativa vs. tempo) <sup>[17]</sup>.

Recentemente têm vindo a ser desenvolvidas metodologias para a análise de fármacos utilizando cromatografia líquida de ultra elevada eficiência (UHPLC) que é uma técnica de separação cromatográfica que utiliza fases estacionárias com partículas de diâmetro

inferior a 2  $\mu\text{m}$ . O uso destas partículas juntamente com a possibilidade de trabalhar a pressões elevadas e utilizar volumes de injeção menores, permite obter uma maior sensibilidade, resolução e detetabilidade, num período de análise muito menor (baixa os tempos de retenção dos compostos).

Num sistema de UHPLC, devido à compressibilidade do solvente a altas pressões, o volume de amostra injetada deve ser baixo para que, se obtenha um bom desempenho [18].

O acoplamento da espectrometria de massa à cromatografia líquida (LC-MS) possibilita, para além da quantificação dos analitos a sua identificação.

Um espectrómetro de massa tem três componentes básicos: uma fonte de ionização, um (ou mais) analisador(es) de massa e um detetor [19]. No interior do espectrómetro de massa, desde a fonte até ao detetor, a presença de um gradiente de pressão e de voltagem permite encaminhar os iões pelo correto percurso. A fonte de ionização é responsável por ionizar as moléculas da amostra em estudo. Após adequada ionização, os iões são direcionados para o analisador de massa através de um série de elementos eletromagnéticos, permitindo assim focar o feixe de iões e controlar a sua trajetória. No analisador de massa, os iões são filtrados e separados de acordo com a sua razão massa/carga ( $m/z$ ). Os iões já separados entram então no detetor, o qual determina a concentração destes, sendo que os resultados são apresentados sob a forma de um espectro de massa. Os iões encontram-se em fase gasosa e, uma vez que nestas condições são muito reativos, a sua manipulação e trajeto devem ser efetuados a alto vácuo. A fim de proporcionar o gradiente de pressão ao longo da trajetória dos iões no espectrómetro de massa, a fonte de ionização é mantida numa câmara à pressão ambiente, enquanto os elementos eletromagnéticos, analisador de massa e detetor são mantidos a alto vácuo [12].

Frequentemente são utilizados sistemas de deteção MS/MS. Os sistemas MS/MS são constituídos por vários analisadores de massa, permitindo sucessivas análises numa só amostra, resultando no aumento da seletividade, precisão, exatidão e sensibilidade. A seletividade destes sistemas é muito elevada, uma vez que a probabilidade de dois compostos distintos originarem o mesmo ião precursor e iões produto é ínfima. Por outro lado, a sensibilidade é aumentada pela redução considerável de sinais interferentes, obtendo-se uma significativa redução ao nível do ruído analítico [17,18].

Neste trabalho foi utilizado um sistema MS/MS constituído por um triplo quadrupolo. Os três quadrupolos apresentam diferentes funções, sendo que os dois quadrupolos das

pontas funcionam como filtros de massa, enquanto o quadrupolo central assume o papel de uma célula de colisão. O primeiro quadrupolo (Q1) permite a seleção de massa dos íons que entram na câmara do analisador de massa (precursores). Os íons que apresentam o valor de  $m/z$  adequado para a sua passagem pelo primeiro quadrupolo entram então na célula de colisão. Este segundo quadrupolo tem como única função acelerar os íons, os quais colidem com as moléculas do gás inerte (em geral argon) existente nesta região do analisador de massa, levando assim à sua fragmentação. A fragmentação pode ser aumentada pelo aumento da energia de colisão ou da pressão do gás inerte. Os íons produto entram então no terceiro quadrupolo (Q3), responsável pela sua seleção por  $m/z$ . Para a devida identificação de compostos, são necessárias pelo menos duas transições de Monitorização de reação múltipla (MRM) onde a mais intensa advém do íon denominado por “quantificador”, e as restantes de íons conhecidos por “qualificadores” [19].

## **2.2 Validação do método**

A fiabilidade dos resultados analíticos é de extrema importância, sendo um requisito essencial à correta interpretação dos resultados. O processo de validação deve incluir todos os procedimentos necessários para demonstrar que uma técnica analítica destinada à determinação quantitativa de um ou mais analitos numa determinada amostra é adequada. A conformidade da metodologia deve ter em consideração alguns parâmetros obrigatórios, tais como seletividade/especificidade, precisão, exatidão, linearidade/curva de calibração, limites de deteção e de quantificação e recuperação [20].

### **2.2.1 Quantificação**

Na etapa de quantificação estabelece-se a correlação entre o sinal do detetor e a quantidade do componente de interesse. Os sistemas de quantificação mais usados são o método de padrão externo, método do padrão interno e método da adição padrão [20,21].

Neste trabalho utilizou-se o método do padrão interno, que consiste na preparação das soluções padrão de concentração conhecida da substância de interesse, às quais se adiciona a mesma quantidade de um composto conhecido chamado padrão interno (PI) [20]. Este método é utilizado quando se pretende reduzir o efeito de matriz dos analitos de interesse, dado que durante a corrida cromatográfica o padrão interno (PI) é

submetido a condições experimentais semelhantes à substância de interesse. O padrão interno deve ser escolhido atendendo a alguns requisitos: o composto escolhido deve eluir da coluna adequadamente, encontrar-se devidamente separado de todos os outros compostos da amostra, eluir proximamente aos compostos de interesse e ser estável nas condições de análise.

### **2.2.2 Seletividade**

A seletividade é a capacidade de um método analítico diferenciar e quantificar o analito na amostra na presença de outros compostos <sup>[14]</sup>. Representa o grau de interferência de espécies distintas, como a presença de outro princípio ativo, reagentes, impurezas e produtos de degradação, garantindo que o pico de resposta seja exclusivamente de um componente simples, isto é, que não existam interferentes naquele tempo de retenção <sup>[14]</sup>.

### **2.2.3 Curva de calibração e linearidade**

A linearidade trata-se da capacidade de um método analítico produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, numa determinada faixa de concentrações. A faixa linear de um método é definida como o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito no qual foi demonstrado ser possível a determinação com precisão, exatidão e linearidade exigidas sob as condições especificadas para o ensaio <sup>[14]</sup>.

A curva de calibração traduz a relação que existe entre a resposta do equipamento e as concentrações conhecidas do analito. Deve ser desenvolvida para cada analito na amostra. Para que a relação entre a concentração e a resposta do equipamento seja adequadamente definida deve ser usado um número suficiente de padrões. O número de padrões usados na construção da curva de calibração terá em conta o intervalo antecipado de valores analíticos bem como, a natureza da relação analito/resposta. As concentrações dos padrões serão escolhidas com base no intervalo de concentrações esperadas no estudo em causa.

### **2.2.4 Limites de detecção e quantificação**

O limite de detecção (LOD) representa a menor concentração da substância em análise e que pode ser detetada com certo limite de confiança, utilizando um determinado

procedimento experimental, mas não necessariamente quantificada. O limite inferior de quantificação (LOQ) traduz a mais baixa concentração do analito que pode ser quantificada com certa confiança nas condições experimentais <sup>[19]</sup>.

O limite de detecção (LOD) pode ser determinado por diferentes métodos:

**Relação sinal/ruído:** o LOD é determinado através da comparação que é realizada entre a medição dos sinais de amostras com baixas concentrações conhecidas do analito na matriz e um branco dessas amostras. Assim, é estabelecida uma concentração mínima na qual a substância pode ser facilmente detetada <sup>[64]</sup>. Nestes casos é importante conhecer o conceito de ruído, que nos métodos cromatográficos, consiste na flutuação da linha base do cromatograma. É a diferença entre a maior altura e a maior profundidade dos picos, não relacionada com algum composto detetado <sup>[39]</sup>.

**Baseado em parâmetros da curva analítica:** o LOD é determinado através de parâmetros da curva analítica de acordo com a equação:

$$LOD = 3,0 \times \left(\frac{s}{a}\right) \quad (1.1)$$

Onde,

$s$  é a estimativa do desvio padrão da resposta do coeficiente linear da equação da reta da curva analítica;

$a$  é o declive ou coeficiente angular da equação da reta da curva analítica.

Os critérios usados para a determinação do LOD podem ser adotados para o limite de quantificação (LOQ). No caso dessa determinação se basear em parâmetros da curva analítica, utiliza-se a seguinte equação <sup>[22]</sup>:

$$LOQ = 10 \times \left(\frac{s}{a}\right) \quad (1.2)$$

### 2.2.5 Recuperação

A recuperação ou rendimento de extração de um analito é a relação percentual entre a resposta obtida do detetor a partir de uma quantidade de analito adicionado e posteriormente extraído da matriz e a resposta desse detetor para a quantidade de analito teoricamente presente (sem extração). A recuperação indica portanto a eficácia da extração de um método analítico. A recuperação do analito não precisa de ser 100%, desde que seja reprodutível e o método apresente precisão adequada <sup>[19]</sup>.

A recuperação neste trabalho foi calculada utilizando a expressão 1.3.

$$\text{Recuperação} = (\text{área A}/\text{área B}) \times 100 \% \quad (1.3)$$

Onde,

área A - área do pico cromatográfico do analito obtido após o procedimento de extração.

área B - a área do pico cromatográfico do analito obtido por injeção da solução padrão (sem efetuar o procedimento de extração).

## CAPÍTULO 3

# MATERIAIS E MÉTODOS



### 3. Materiais e métodos

Neste trabalho foi desenvolvido um método para a análise qualitativa e quantitativa de três antidepressivos, citalopram, fluoxetina, sertralina e um metabolito, norsertralina, em água de rio. As análises foram efetuadas por cromatografia líquida de ultra elevada eficiência acoplada à espectrometria de massa em *tandem*, sendo a amostra primeiramente sujeita a extração por SPE.

Neste capítulo serão descritos os reagentes e equipamentos utilizados, assim com os procedimentos de preparação das amostras e das soluções padrão.

#### 3.1 Reagentes e soluções

Neste trabalho utilizaram-se reagentes com elevado grau de pureza como o cloridrato de fluoxetina, cloridrato de sertralina, cloridrato de norsertralina, bromidrato de citalopram e solução metanólica de fluoxetina deuterada (1 mg/mL). Utilizou-se metanol, n-hexano, diclorometano e 2-propanol com qualidade para HPLC, assim como acetonitrilo de qualidade para MS/MS, bem como os ácidos clorídrico a 37% e fórmico a 98%, amónia a 25% e solução de hidróxido de amónia a 28-30%.

A água ultrapura (18,2 MΩcm) foi obtida por purificação de água desionizada num sistema Milli-Q Simplicity 185 (Millipore).

##### 3.1.1 Preparação das soluções padrão

As soluções padrão dos antidepressivos em estudo (fluoxetina, citalopram, sertralina e norsertralina) foram preparadas por diluição da substância pura em metanol, utilizando o procedimento seguinte:

- Prepararam-se soluções padrão stock individuais pesando 1 mg de padrão e dissolvendo com 1 mL de metanol de forma a obter-se uma concentração final de composto de 1000 mg/L. No caso da norsertralina foram pesados 5 mg de composto tendo-se adicionado 2 mL de metanol de forma a obter-se uma concentração final de 2500 mg/L. Todas as soluções foram armazenadas a -20 °C.
- As soluções padrão de trabalho foram preparadas por diluição de quantidades apropriadas das soluções padrão stock numa mistura MeOH:H<sub>2</sub>O (10:90).

### 3.1.2 Preparação das soluções para a curva de calibração

Prepararam-se numa mistura de MeOH:H<sub>2</sub>O (10:90) soluções com seis níveis diferentes de concentração: 100; 50; 25;10; 5; 1 e 0,5 µg/L.

A cada solução foi adicionado 10 µL de uma solução de fluoxetina deuterada 1 mg/L.

### 3.1.3 Preparação de outras soluções

- Solução 5% (v/v) NH<sub>4</sub>OH em MeOH

Num balão volumétrico de 10 mL adicionou-se 1,67 mL de NH<sub>4</sub>OH a 28-30% e fez-se o volume com MeOH.

- Solução 2% (v/v) HCOOH em H<sub>2</sub>O

Num balão volumétrico de 25 mL adicionou-se 500 µL de HCOOH a 98% e fez-se o volume com água ultra-pura.

- Solução DCM:MeOH:NH<sub>4</sub>OH (88:10:2)

Num balão volumétrico de 5 mL adicionou-se 100 µL NH<sub>3</sub> e 500 µL de metanol e fez-se o volume com DCM.

## 3.2 Método de extração de SPE

Para o procedimento de extração em fase sólida foi utilizado um sistema múltiplo de vácuo (Phenomenex USA), tendo-se testado três diferentes cartuchos de SPE: i) Oasis MCX (150 mg, 6 mL) da Waters Corporation; ii) Bond Elut Plexa (200 mg, 6 mL) da Agilent e iii) Strata-X (200 mg, 3 mL) da Phenomenex.

Após a otimização dos procedimentos de extração obtiveram-se as melhores recuperações utilizando as seguintes condições experimentais:

- coluna de extração - Oasis MCX (150 mg, 6 mL) da Waters
- acondicionamento: 6 mL MeOH, 6 mL H<sub>2</sub>O ultrapura pH 2;
- procedimento otimizado: 50 mL amostra com pH ajustado a 2 com 1 mL mistura de padrões a 50 ppb; a lavagem foi realizada com 5 mL 2% (v/v) HCOOH em H<sub>2</sub>O ultra-pura; secagem sob vácuo durante aproximadamente 20 minutos; eluição com 5 mL de DCM:MeOH:NH<sub>4</sub>OH (88:10:2).

### **3.3 Análise cromatográfica**

A análise cromatográfica foi realizada num equipamento de cromatografia líquida de ultra elevada performance da marca *Shimadzu* (Kyoto, Japão), modelo *Nexera*, equipado com dois módulos de distribuição do solvente (LC-30 AD), um forno CTO-20 AC, um amostrador automático SIL-30 AC e um detetor de espectrometria de massa do tipo triplo quadrupolo (LCMS-8030). O sistema foi controlado por um sistema CBM-20 A. Utilizou-se uma coluna *Kinetex Core Shell C18* da Phenomenex, de 1,7  $\mu\text{m}$  de tamanho de poro e dimensões 150 x 2,1 mm, tendo todos os compostos sido analisados no modo de ionização positiva.

Como fase móvel utilizou-se água com ácido fórmico a 0,1% (A) e acetonitrilo (B), com um fluxo de 0,3 mL/min com um gradiente cujas condições iniciais eram 90% A; 0-5,5 min, 0% A; 5,5-6,5 min retomava as condições iniciais; 6,5-9,0 min reequilibrava-se a coluna. A coluna foi ajustada a uma temperatura de 30 °C, tendo-se usado um volume de injeção de 5  $\mu\text{L}$ . A temperatura da linha de dessolvatação foi de 200 °C, a temperatura do bloco de 200 °C, o fluxo do gás nebulizador de 2,2 L/min, o fluxo do gás de secagem de 12,0 L/min e a voltagem da interface de 1 kV.

### **3.4 Preparação da amostra real**

A amostra com um volume de 50 mL foi previamente filtrada numa membrana de nylon (diâmetro de poro 0,2  $\mu\text{m}$ ) antes da realização da extração, tendo o seu pH sido ajustado a 2 com HCl concentrado, após o qual se realizou o procedimento de extração em fase sólida previamente otimizado. O extrato foi evaporado até à secura sob suave corrente de azoto. Após a evaporação redissolveu-se o extrato em 1 mL de MeOH:H<sub>2</sub>O (10:90) e agitou-se utilizando o vortex. A solução foi transferida para um eppendorf tendo-se centrifugado a 9000 rpm durante 10 minutos. De seguida transferiu-se o sobrenadante para um vial e adicionou-se 10  $\mu\text{L}$  de uma solução de fluoxetina deuterada de concentração 1 mg/L.



## CAPÍTULO 4

# ANÁLISE E DISCUSSÃO DE RESULTADOS



## 4. Análise e discussão dos resultados

Neste capítulo são apresentados os resultados referentes à análise dos antidepressivos em estudo, citalopram, fluoxetina, sertralina e nortriptilina. Desenvolveu-se um método para a análise destes antidepressivos envolvendo a extração em fase sólida no modo “off-line”, seguida de análise por cromatografia líquida de ultra elevada eficiência com detecção por espectrometria de massa em *tandem*.

Neste sentido otimizaram-se diferentes parâmetros operacionais que afetavam quer a capacidade de extração dos compostos, quer a sua separação e detecção. Os parâmetros avaliados envolveram a otimização das condições cromatográficas e dos parâmetros de detecção, como a temperatura da linha de dessolvatação (DL), a temperatura do bloco, o fluxo do gás nebulizador, o caudal do gás de secagem, a voltagem da interface, e a otimização dos parâmetros de extração. O método foi avaliado considerando a sua linearidade, recuperação e precisão.

### 4.1 Otimização do método

#### 4.1.1 Otimização dos parâmetros do analisador de massa, no modo SCAN

O trabalho foi iniciado com a otimização dos parâmetros do analisador de massa, no modo SCAN. O modo SCAN permite efetuar um varrimento contínuo numa gama alargada de razões massa/carga ( $m/z$ ), sendo por isso o método mais indicado para determinar o ião precursor de cada analito. Neste sentido efetuou-se a injeção direta de soluções de citalopram, fluoxetina, sertralina, nortriptilina (os compostos em estudo) e fluoxetina deuterada (padrão interno) em metanol com uma concentração de 10 mg/L de forma a obter-se o espectro de massa dos compostos em estudo.

Ao efetuar-se a injeção direta utilizou-se um volume de injeção de amostra de 5  $\mu$ L e uma fase móvel constituída por 30% de H<sub>2</sub>O contendo 0,1% HCOOH e 70% de ACN, com um caudal de 0,4 mL/min. O fluxo do gás nebulizador foi de 2,7 L/min, com 12,0 L/min de gás de secagem e 230 °C de temperatura do bloco e de dessolvatação (parâmetros pré-definidos pelo equipamento). Cada corrida teve a duração de 1,5 min.

Utilizaram-se os modos de ionização positiva e negativa, de forma a se avaliar qual destes modos seria o mais adequado para a análise dos compostos em estudo. Das

análises em modo SCAN obtiveram-se os espectros de fragmentação das quatro substâncias em análise e do padrão interno.

Na figura 4.1 são apresentados os espectros de massa obtidos por injeção direta de uma solução de fluoxetina, utilizando o modo de ionização positiva e negativa (nos quadrupolos Q1 e Q3).

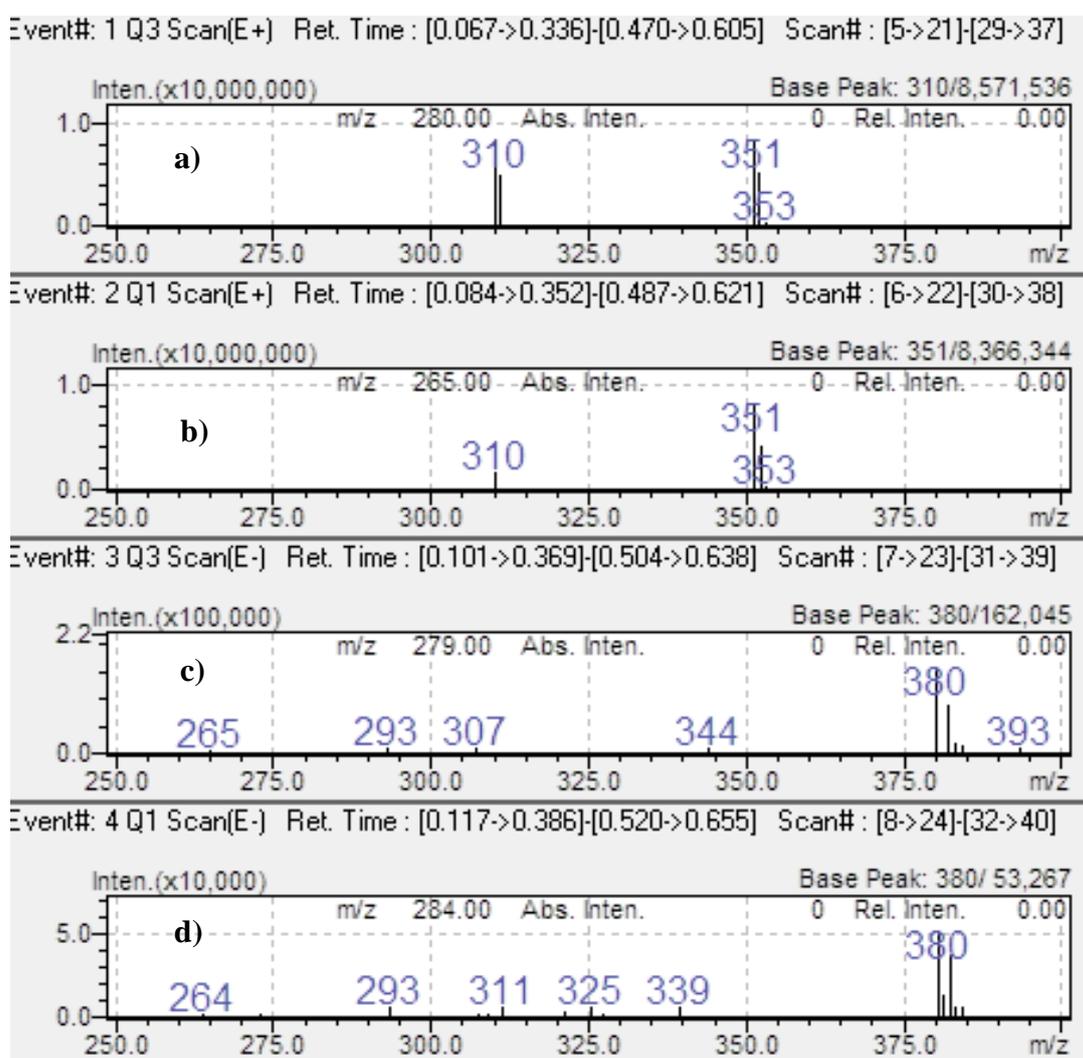


Figura 4.1 - Espectro de massa de uma solução 10 mg/L de fluoxetina em metanol, obtido por injeção direta no modo SCAN por a) ionização positiva, quadrupolo Q3; b) ionização positiva, quadrupolo Q1; c) ionização negativa, quadrupolo Q3 e d) ionização negativa, quadrupolo Q1.

Analisando os espectros de massa apresentados na figura 4.1 verifica-se que a intensidade dos picos é muito superior no modo de ionização positiva. Nos espectros de massa da fluoxetina traçados no modo de ionização positiva, figura 4.1 a) e b), observam-se dois picos de m/z 310 e 351 de elevada intensidade. Estes picos

correspondem à fluoxetina protonada ( $[M+H]^+$ ) e a um aducto da fluoxetina com o acetonitrilo da fase móvel protonado ( $[M+CH_3CN+H]^+$ ), respectivamente. Com base nestes resultados decidiu-se efetuar a análise da fluoxetina no modo de ionização positiva.

Na figura 4.2 são apresentados os espectros de massa obtidos por injeção direta de uma solução de citalopram, utilizando o modo de ionização positiva e negativa (nos quadrupolos Q1 e Q3).

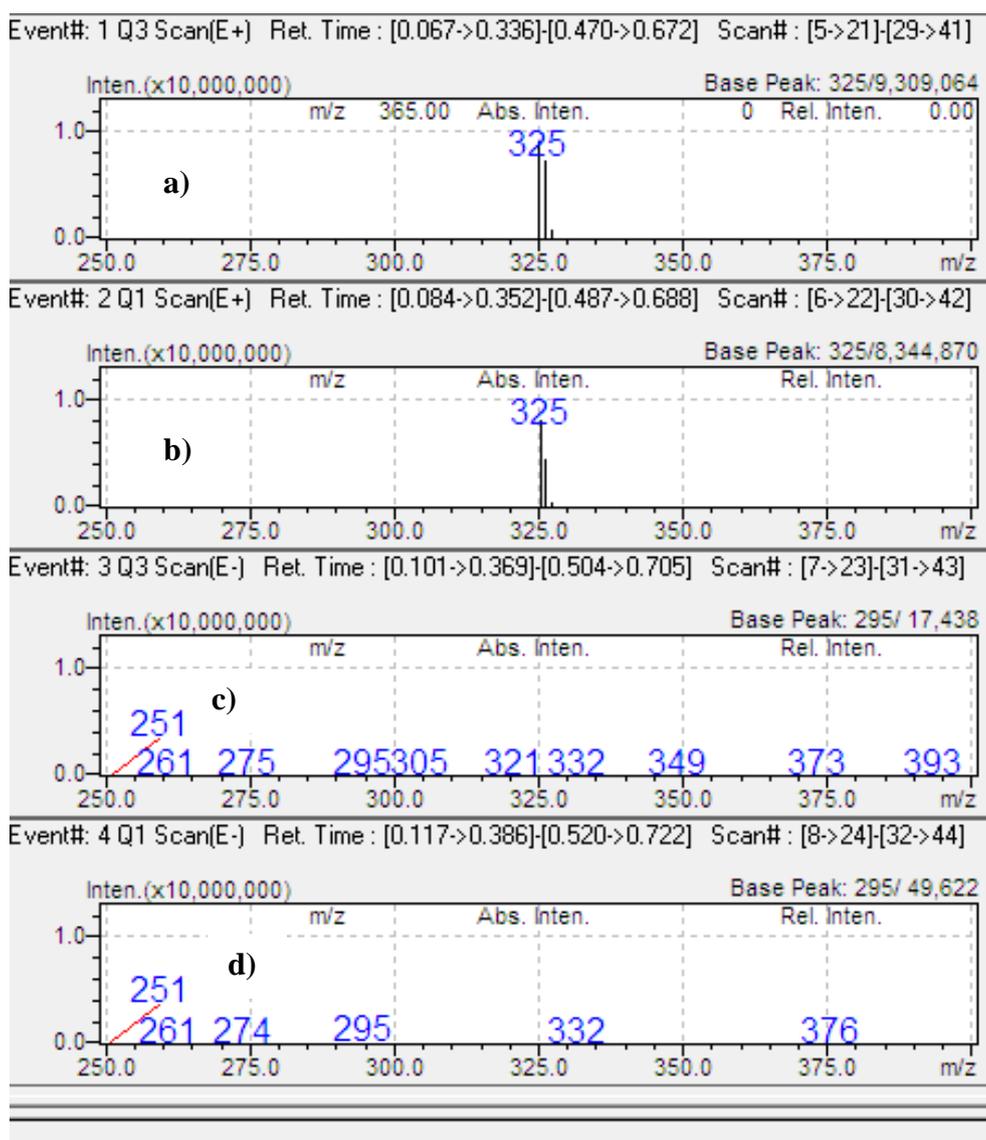


Figura 4.2 - Espectro de massa de uma solução 10 mg/L de citalopram em metanol obtido por injeção direta no modo SCAN por a) ionização positiva, quadrupolo Q3; b) ionização positiva, quadrupolo Q1; c) ionização negativa, quadrupolo Q3 e d) ionização negativa, quadrupolo Q1.

Analisando os espectros de massa do citalopram apresentados na figura 4.2, verifica-se que este composto apenas sofre ionização no modo positivo. Observa-se um pico com  $m/z$  325 apenas no modo de ionização positiva cuja razão massa/carga corresponde ao citalopram protonado ( $[M+H]^+$ ).

Na figura 4.3 estão apresentados os espectros de massa de uma solução de sertralina, obtidos no modo de ionização positiva e negativa (nos quadrupolos Q1 e Q3).

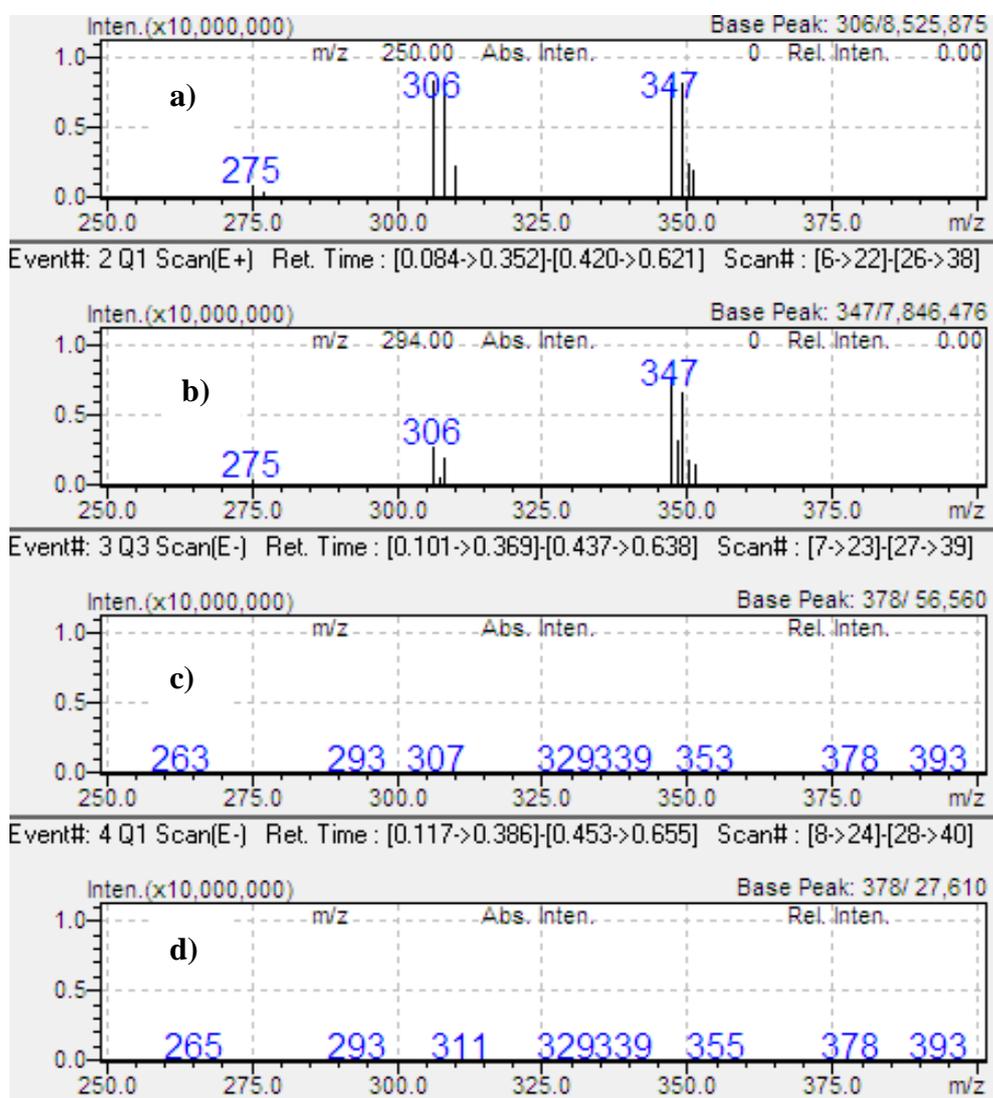


Figura 4.3 - Espectro de massa de uma solução 10 mg/L de sertralina em metanol, obtido por injeção direta no modo SCAN por a) ionização positiva, quadrupolo Q3; b) ionização positiva, quadrupolo Q1; c) ionização negativa, quadrupolo Q3 e d) ionização negativa, quadrupolo Q1.

Analisando os espectros de massa apresentados na figura 4.3 verifica-se que, de modo semelhante aos compostos apresentados anteriormente, a intensidade dos picos é muito superior no modo de ionização positiva. Verifica-se a existência de três picos bem definidos de  $m/z$  275, 306 e 347, no modo de ionização positiva, correspondendo, respetivamente à perda de  $\text{NHCH}_3$  ( $[\text{M}-\text{NHCH}_3]^+$ ), à sertralina protonada ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) e ao aducto formado com o ACN proveniente da fase móvel ( $[\text{M}+\text{CH}_3\text{CN}+\text{H}]^+$ ).

Na figura 4.4 são apresentados os espectros de massa obtidos para a análise de uma solução de norsesertalina, no modo de ionização positiva e negativa (nos quadrupolos Q1 e Q3).

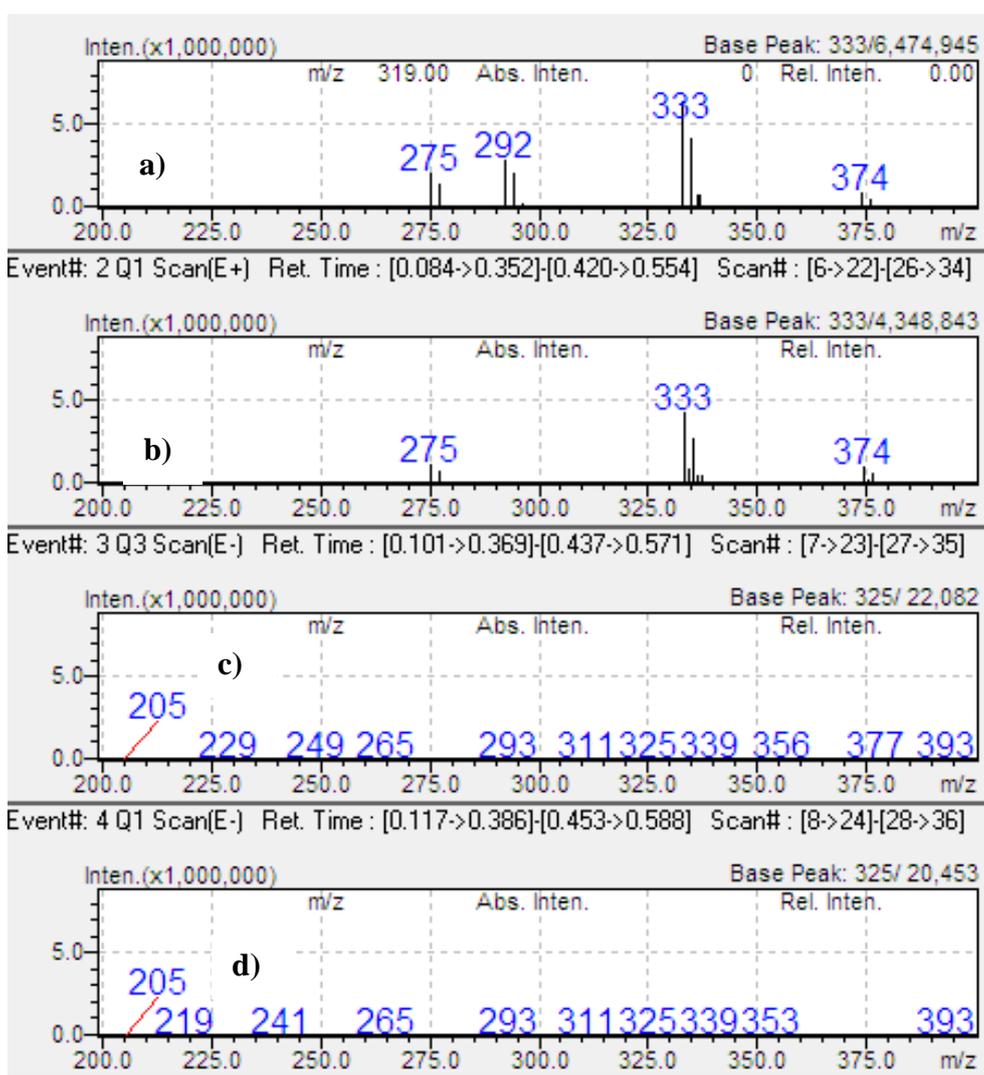


Figura 4.4 - Espectro de massa de uma solução 10 mg/L de norsesertalina em metanol, obtido por injeção direta no modo SCAN por a) ionização positiva, quadrupolo Q3; b) ionização positiva, quadrupolo Q1; c) ionização negativa, quadrupolo Q3 e d) ionização negativa, quadrupolo Q1.

Através dos espectros de massa traçados para a norsertralina (figura 4.4) verificou-se que também para este composto a intensidade dos picos obtidos no modo de ionização positiva é muito superior. Observa-se a existência de quatro picos de elevada intensidade no modo de ionização positiva. O pico de  $m/z$  292 corresponde à norsertralina protonada ( $[M+H]^+$ ). O pico com  $m/z$  de 275 corresponde ao fragmento da molécula obtido por perda de  $NH_2$  ( $[M-NH_2]^+$ ), por último o pico de  $m/z$  333 corresponde ao aducto que se forma entre a norsertralina e o ACN presente na fase móvel ( $[M+CH_3CN+H]^+$ ).

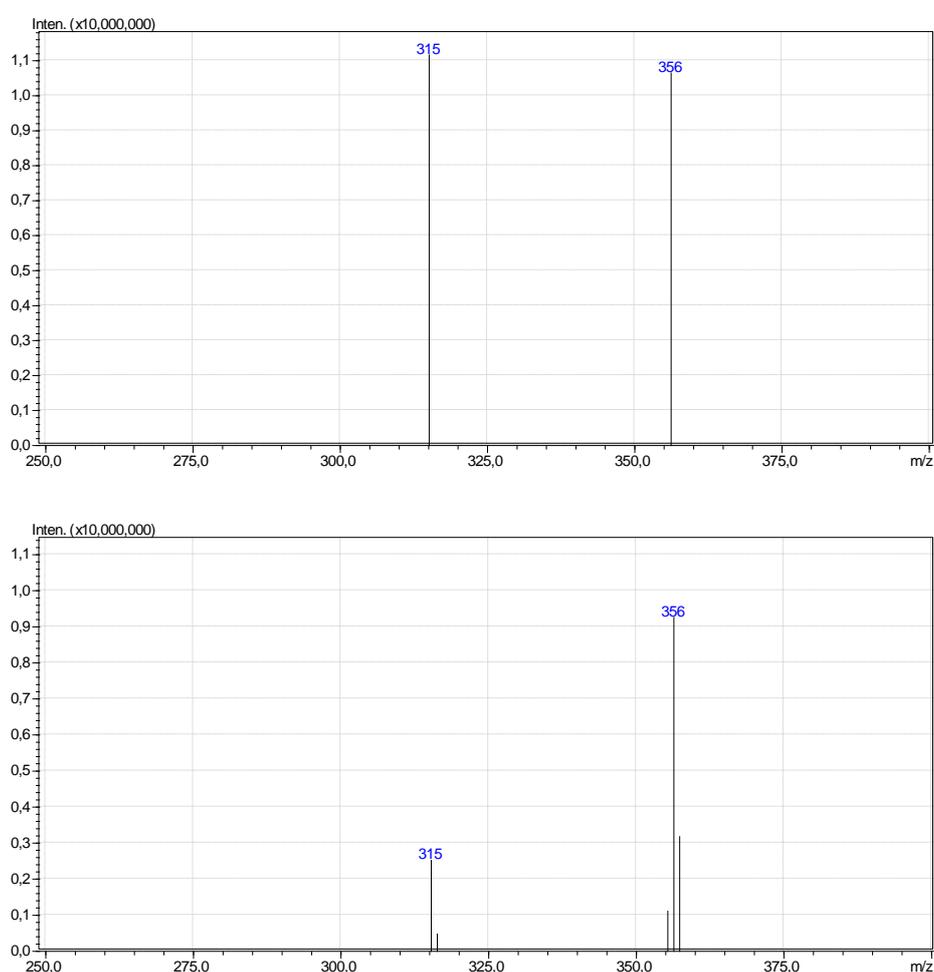


Figura 4.5 - Espectro de massa de uma solução 10 mg/L de fluoxetina deuterada em metanol, obtido por injeção direta no modo SCAN por a) ionização positiva, quadrupolo Q1 e b) ionização positiva, quadrupolo Q3.

Através dos espectros de massa da fluoxetina deuterada (figura 4.5), constatou-se que esta ioniza no modo de ionização positiva, originando um pico de  $m/z$  de 315. Esta razão massa/carga advém da massa molecular da fluoxetina deuterada (314 g/mol)

adicionada de um próton. Observou-se, também, no espectro de massa um pico de  $m/z$  356 correspondente ao aducto da fluoxetina deuterada com o ACN proveniente da fase móvel.

Estes resultados mostram que os compostos em estudo são detetados apenas no modo de ionização positiva. Com base nos resultados obtidos decidiu-se utilizar o modo de ionização positiva para a análise dos compostos em estudo.

#### 4.1.2 Otimização das condições no modo MRM

O modo monitorização de reação múltipla (MRM) foi utilizado na deteção e quantificação de fármacos e dos seus metabolitos. Sabendo qual a massa e a estrutura da molécula a analisar, é possível estabelecer o precursor de  $m/z$  e um fragmento de  $m/z$  correspondente (definindo a transição MRM). A MRM pode dizer-nos qual o ião produto e a respetiva intensidade, permitindo definir as condições dos três quadrupolos, a fim de ser detetado um único ião-produto de um dado ião precursor <sup>[22]</sup>.

Fez-se a injeção direta de soluções de citalopram, fluoxetina, sertralina, norsestralina e fluoxetina deuterada em metanol, com uma concentração de 10 mg/L, no modo de MRM, de modo a serem identificados os picos em  $m/z$  correspondentes a cada um dos fragmentos, de cada um dos compostos. Nesta etapa do trabalho foram utilizadas as mesmas condições experimentais que na fase anterior do trabalho, utilizou-se um volume de injeção da amostra de 5  $\mu$ L, utilizou-se uma fase móvel constituída por 30% H<sub>2</sub>O contendo 0,1% HCOOH e 70% ACN, com um caudal de 0,4 mL/min. O fluxo do gás nebulizador foi de 2,7 L/min, o do gás de secagem 12,0 L/min e a temperatura do bloco e da linha de dessolvatação foi de 230 °C, sendo estes parâmetros pré-definidos pelo equipamento. Cada uma das corridas teve a duração de 1,5 min.

Analisando os espectros de massa obtidos da fragmentação dos compostos em estudo, em particular os diferentes iões produto obtidos e a abundância correspondente, definiu-se o ião com maior abundância relativa como quantificador, e o segundo com maior abundância relativa como qualificador.

Na figura 4.6 é apresentado o espectro de massa, no modo MRM, obtido para a fragmentação da fluoxetina ( $m/z$  310).



Figura 4.6 - Espectro de massa MRM dos fragmentos de fluoxetina (solução 10 mg/L em metanol); íon precursor m/z 310,20.

Através da análise do espectro de massa de MRM, dos fragmentos do íon precursor da fluoxetina (figura 4.6), verificou-se que o íon precursor da fluoxetina de m/z 310,20, originou dois íões produto, com m/z 148,20 e 44,20 de intensidades bastante diferentes. Na tabela 4.1 estão apresentadas as razões m/z dos íões produto obtidos assim como as respectivas intensidades relativas. O íon produto de m/z 44,20 (de maior intensidade) foi definido como íon quantificador e o íon produto de m/z 148,20 como qualificador.

Tabela 4.1 - Íon precursor e íões produto presentes no espectro de massa MRM da fluoxetina e respectivas intensidades.

Íon precursor	Íon produto	Intensidade relativa do íon produto (%)
310,20	44,20	100
310,20	148,20	13,51

Na figura 4.7 é apresentado o espectro de massa, no modo MRM, obtido para a fragmentação do citalopram (m/z 325).

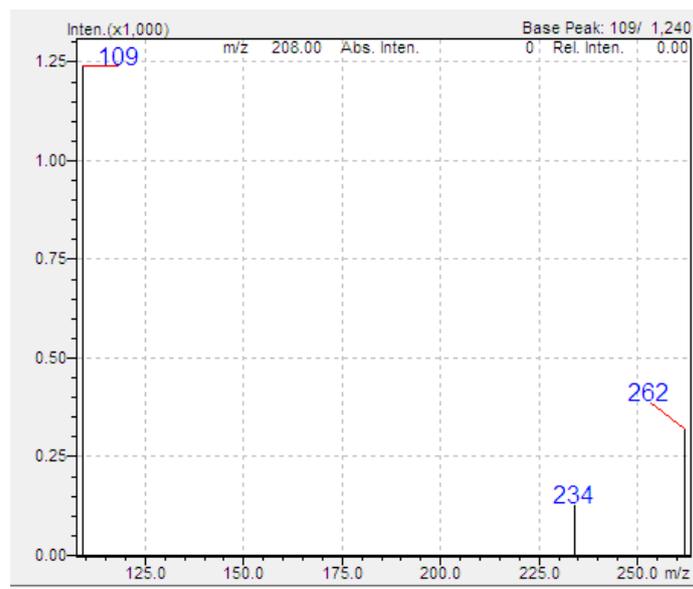


Figura 4.7 - Espectro de massa MRM dos fragmentos de citalopram (solução 10 mg/L em metanol); íon precursor m/z 325,00.

Através da análise do espectro de massa de MRM (figura 4.7), verificou-se que o íon precursor do citalopram (m/z 325), origina três íons produto cujas razões m/z estão indicadas na tabela 4.2. O íon produto de m/z 109,00 apresenta uma maior intensidade relativa tendo sido definido como íon quantificador, enquanto o íon produto de m/z 262,15 foi escolhido para íon qualificador, devido a ser o segundo mais abundante.

Tabela 4.2 - Íon precursor e íons produto presentes no espectro de massa MRM do citalopram e respectivas intensidades.

Íon precursor	Íon produto	Intensidade relativa do íon produto (%)
325,00	109,00	100
325,00	262,15	25,81
325,00	234,00	10,48

Na figura 4.8 é apresentado o espectro de massa, no modo MRM, obtido para a fragmentação da sertralina (m/z 306,10).

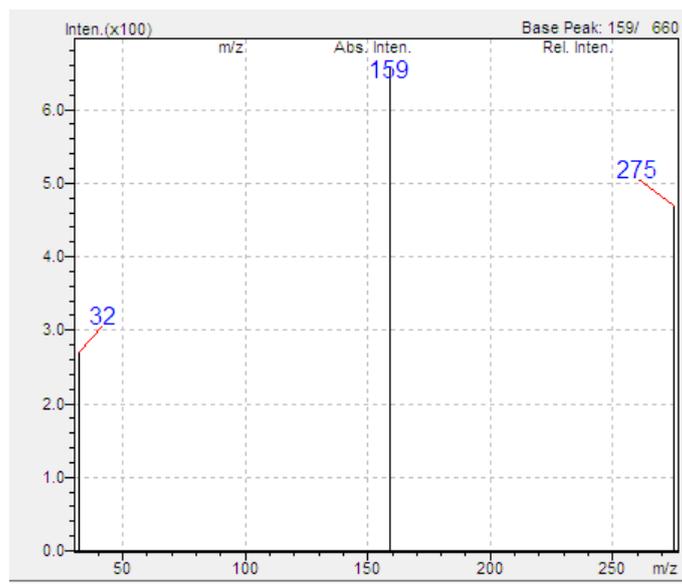


Figura 4.8 - Espectro de massa MRM dos fragmentos de uma solução de sertralina (solução 10 mg/L em metanol); íon precursor m/z 306,10.

Analisando o espectro de massa MRM dos fragmentos da sertralina (figura 4.8), verificou-se que o íon precursor da sertralina de m/z 306,10 origina três íons produto com diferentes intensidades relativas (tabela 4.3). Devido a serem os íons produto mais abundantes, os íons com m/z de 158,85 e 275,10 foram definidos como íon quantificador e qualificador, respectivamente.

Tabela 4.3 - Íon precursor e íons produto presentes no espectro de massa MRM da sertralina e respectivas intensidades.

Íon precursor	Íon produto	Intensidade relativa do íon produto (%)
306,10	158,85	100
306,10	275,10	71,21
306,10	32,00	40,91

Na figura 4.9 é apresentado o espectro de massa, no modo MRM, obtido para a fragmentação da norsertralina (m/z 333,10).

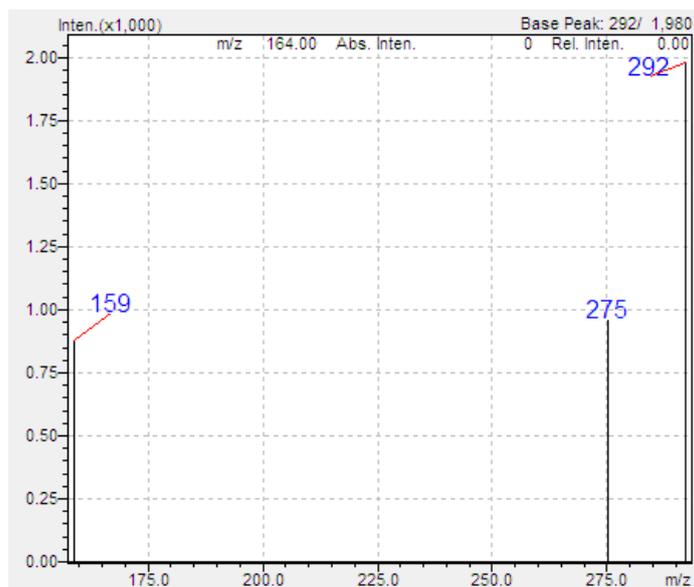


Figura 4.9: Espectro de massa MRM dos fragmentos da norsertalina (solução 10 mg/L em metanol); íon precursor m/z 333,10.

Da análise do espectro de massa de MRM (figura 4.9) concluiu-se que o íon precursor da norsertalina de m/z 333,10 origina três íons produto, tendo sido definido o íon de m/z 292,10 como íon quantificador e o íon de m/z 275,10 como íon qualificador, por estes serem os mais abundantes. Estes resultados estão apresentados na tabela 4.4.

Tabela 4.4 - Íon precursor e íons produto presentes no espectro de massa MRM da norsertalina e respetivas intensidades.

Íon precursor	Íon produto	Intensidade relativa do íon produto (%)
333,10	292,10	100
333,10	275,10	48,48
333,10	158,90	44,44

Na figura 4.10 é apresentado o espectro de massa, no modo MRM, obtido para a fragmentação da fluoxetina deuterada (m/z 315,30).

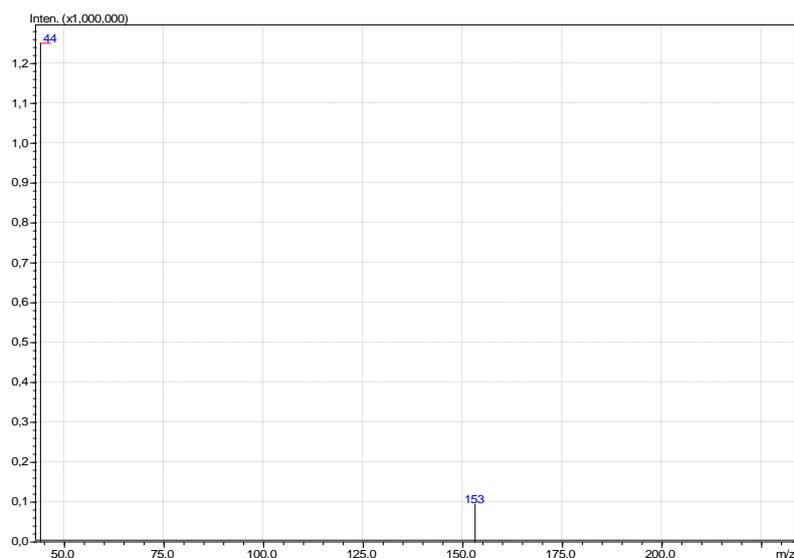


Figura 4.10 - Espectro de massa MRM dos fragmentos da fluoxetina deuterada (solução 10 mg/L em metanol); íon precursor m/z 315,30.

Através da análise do espectro de massa em MRM apresentado na figura 4.10, verificou-se que o íon precursor da fluoxetina deuterada (m/z 315,30) origina dois fragmentos, sendo o íon produto com m/z 44,00 o mais abundante (tabela 4.5) e por isso definido como íon quantificador.

Uma vez que a fluoxetina deuterada é um composto isotopicamente marcado, não é provável ser detetado em matrizes ambientais, tendo sido apenas monitorizada uma transição para este composto.

Tabela 4.5 - Íon precursor e íões produto presentes no espectro de massa MRM da fluoxetina deuterada e respectivas intensidades.

Íon precursor	Íon produto	Intensidade relativa do íon produto (%)
315,30	44,00	100
315,30	153,10	7,57

#### 4.1.3. Otimização dos parâmetros do analisador de massa, temperatura da linha de dessolvatação, a temperatura do bloco, o fluxo do gás nebulizador, o fluxo do gás de secagem e a voltagem da interface

Seguidamente serão apresentados os resultados obtidos na otimização dos diferentes parâmetros do analisador de massa, nomeadamente a temperatura da linha de dessolvatação, a temperatura do bloco, o fluxo do gás nebulizador, o fluxo do gás de secagem e a voltagem da interface.

Foi feito o estudo da temperatura da linha de dessolvatação entre 150 e 300 °C, analisando-se as áreas dos picos dos compostos para diferentes valores de temperatura, de maneira a verificar qual a temperatura da linha de dessolvatação que permite obter uma maior sensibilidade para todos os fármacos. Os resultados obtidos estão sumariados na figura 4.11.

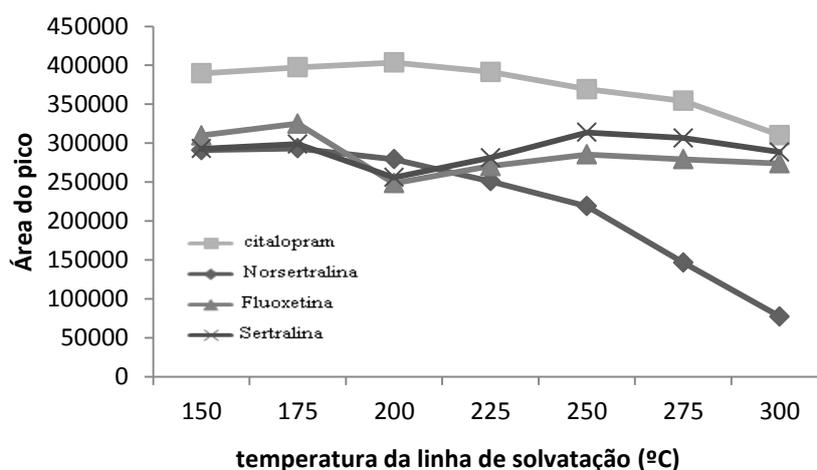


Figura 4.11 - Variação da área do pico obtido para cada fármaco em função do valor da temperatura da linha de dessolvatação.

Através da análise do gráfico, verifica-se que, para o citalopram, com o aumento da temperatura da linha de dessolvatação aumenta a área do pico até aos 200 °C, temperatura a partir da qual se regista uma diminuição da área do pico com o aumento da temperatura da linha de dessolvatação. A fluoxetina e a sertralina apresentam um comportamento semelhante face à variação da temperatura da linha de dessolvatação. Inicialmente, com o aumento da temperatura as áreas dos picos também aumentam, no

entanto aos 200 °C, as áreas dos picos diminuem um pouco e a partir deste valor voltam a aumentar. Para a norsertalina, à medida que a temperatura da linha de dessolvatação aumenta observa-se uma diminuição da área do seu pico. Com base nos resultados obtidos, definiu-se como adequada uma temperatura da linha de dessolvatação de 200 °C, pois este era o valor que reunia a melhor relação temperatura da linha de dessolvatação/ área comum para os quatro compostos em estudo.

Foi feito o estudo da temperatura do bloco entre 150 e 500 °C, determinando as áreas dos picos obtidas em função da temperatura, de modo a estabelecer a temperatura que permite obter uma maior sensibilidade para os vários fármacos. Os resultados obtidos são apresentados na figura 4.12.

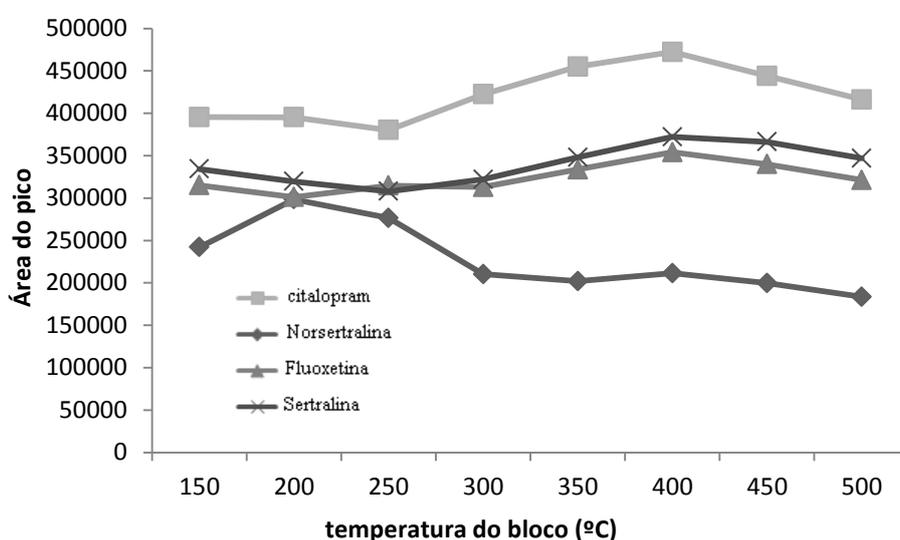


Figura 4.12 - Variação da área do pico obtido para cada fármaco em função do valor da temperatura do bloco.

Analisando o gráfico da figura 4.12, verifica-se que a área do citalopram praticamente não varia com a variação da temperatura do bloco até aos 250 °C, observando-se um aumento significativo da área do pico do citalopram quando a temperatura varia entre 250 e 400 °C. Para valores de temperatura do bloco superiores a 400 °C, observa-se uma diminuição nas áreas dos picos. A norsertalina apresenta um máximo na área de pico para uma temperatura do bloco de 200°C, registando-se uma diminuição da área do pico deste composto para temperaturas de bloco superiores. A fluoxetina e a sertralina apresentam um comportamento idêntico, as áreas dos picos diminuem ligeiramente entre 150 aos 250 °C, seguindo-se um aumento gradual das áreas até aos 400 °C,

observando-se novamente a partir deste valor um decréscimo nas áreas. O valor de temperatura do bloco escolhido para as análises posteriores foi de 200°C, sendo este valor uma solução de compromisso entre todos os compostos para permitir a obtenção de áreas relativamente elevadas para todos eles.

Foi feito o estudo do fluxo do gás nebulizador testando fluxos entre 2,0 e 3,0 L/min, e analisando as áreas obtidas para os picos dos diferentes fármacos. Na figura 4.13 é apresentada a área dos picos obtidos para cada fármaco em função do valor do fluxo do gás nebulizador utilizado.

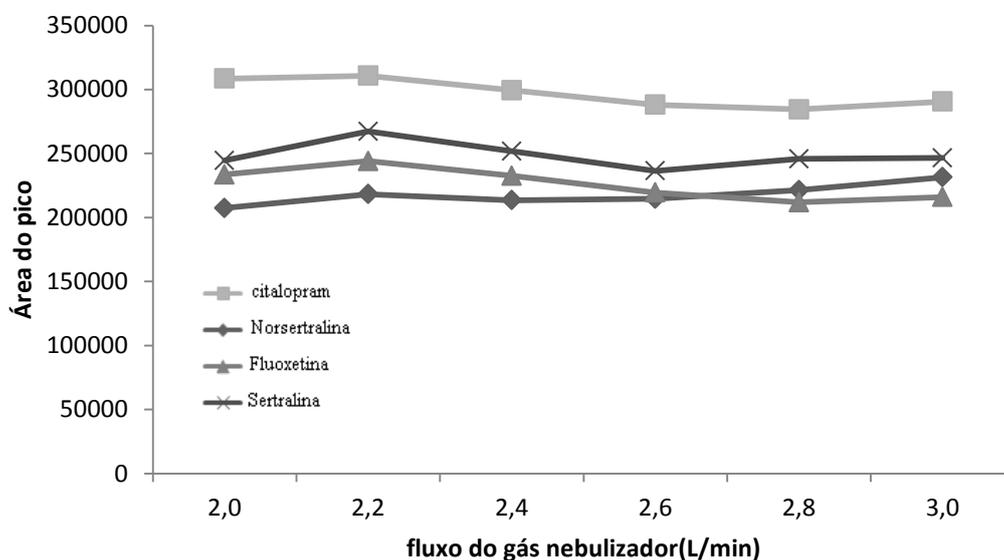


Figura 4.13 - Variação da área do pico obtido para cada fármaco em função do valor do fluxo do gás nebulizador.

Através da análise da figura 4.13, verifica-se que variação das áreas dos picos dos quatro fármacos com o fluxo do gás nebulizador é semelhante. Até aos 2,2 L/min as áreas dos picos aumentam, dos 2,2 aos 2,8 L/min há uma diminuição das áreas que voltam a aumentar ligeiramente até aos 3,0 L/min. Considerando a variação observada para as áreas dos picos dos diferentes fármacos com o fluxo do gás nebulizador, foi selecionado como fluxo ótimo o valor de 2,2 L/min.

Realizou-se também o estudo do fluxo do gás de secagem variando este parâmetro entre 10,0 e 17,0 L/min e analisando as áreas dos picos obtidas, de maneira a verificar qual o melhor valor deste parâmetro para os diferentes fármacos. Os resultados obtidos para a variação das áreas dos picos de cada fármaco em função do valor de fluxo de gás de secagem são apresentados na figura 4.14.

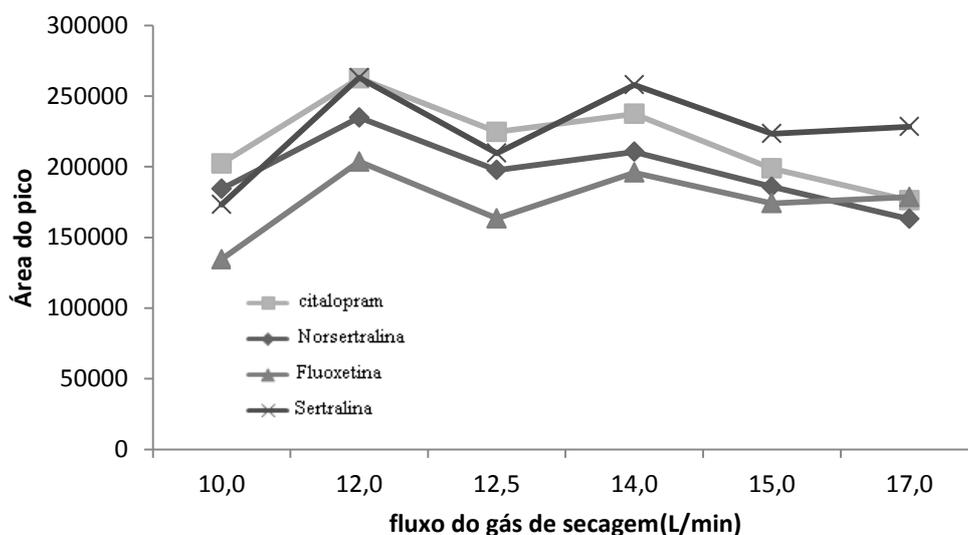


Figura 4.14 - Variação da área do pico de cada fármaco em função do valor de fluxo do gás de secagem.

Através da análise da figura 4.14, verifica-se que os quatro fármacos apresentam valores de área dos picos mais elevados para um fluxo do gás de secagem de 12,0 L/min, tendo então sido este valor escolhido como o fluxo de gás de secagem ótimo para a ionização dos fármacos em estudo.

Finalmente foi feito o estudo da voltagem da interface utilizando valores compreendidos entre 0,5 e 5 kV e analisando as áreas dos picos obtidas. Na figura 4.15 são apresentados os resultados da variação das áreas dos picos de cada fármaco em função do valor da voltagem do interface em estudo.

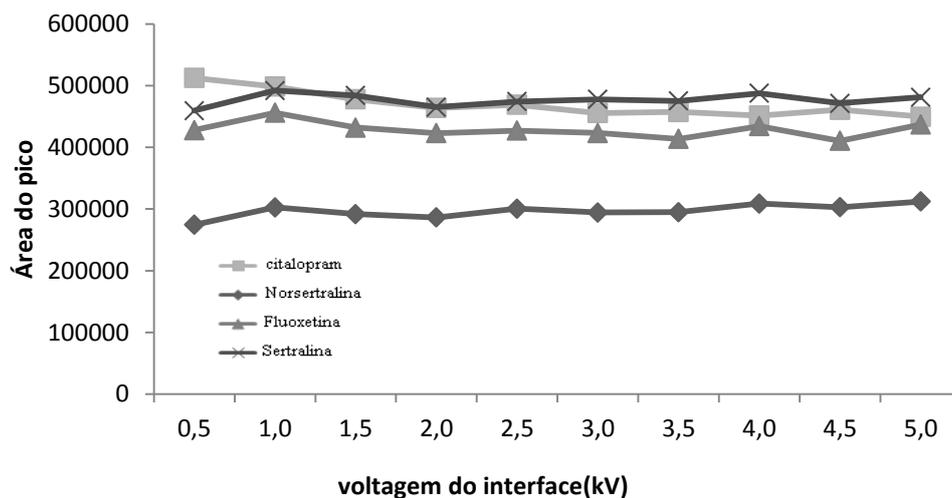


Figura 4.15 - Variação da área do pico obtido para cada fármaco em função do valor da voltagem da interface.

Através da análise da figura 4.15, verifica-se que os quatro fármacos apresentam comportamentos muito semelhantes, não se observando uma variação muito significativa na área dos picos com o aumento da voltagem da interface. As áreas de pico mais elevadas para cada composto foram registadas para uma voltagem da interface de 1 kV, tendo sido este o valor escolhido para as análises posteriores.

Na tabela 4.6 encontram-se sumariados os valores ótimos obtidos para os diferentes parâmetros do detetor MS.

Tabela 4.6 - Parâmetros do detetor MS otimizados.

Temperatura da linha de dessolvatação	200 °C
Temperatura do bloco	200 °C
Fluxo do gás nebulizador	2,2 L/min
Fluxo do gás de secagem	12,0 L/min
Voltagem do interface	1 kV

#### 4.1.4 Análise quantitativa utilizando o MRM

Os cinco compostos analisados (3 fármacos, 1 metabolito e 1 padrão interno) foram todos analisados no modo de ionização positiva. Para cada composto foram monitorizadas duas transições de MRM entre o íon precursor e os dois íões produto mais abundantes, com a exceção do padrão interno, que visto ser um composto isotopicamente marcado, não é provável ser detetado em matrizes ambientais, tendo sido apenas monitorizada uma transição.

Para os compostos em estudo, a primeira transição (MRM1) foi utilizada para quantificação, enquanto a segunda transição (MRM2) foi usada para confirmação da identidade do fármaco em estudo. Para além das transições de MRM, também foram utilizados outros critérios de identificação, nomeadamente a correspondência do tempo de retenção dos compostos nas soluções padrão com os tempos de retenção nas amostras; e a comparação da abundância relativa do analito nas duas transições de MRM selecionadas entre as soluções padrão e as amostras. Este critério foi avaliado através da determinação do rácio dos íões da primeira (MRM1) e da segunda transição (MRM2) nas soluções padrão e considera-se que um composto cumpre o presente critério se o seu rácio estiver dentro de um intervalo de  $\pm 20\%$  do rácio estabelecido com as soluções padrão. Na tabela 4.7 estão indicados os rácios dos íões da primeira e da segunda transição para os diferentes fármacos em estudo.

Tabela 4.7 - Rácio dos íões da primeira e da segunda transição (MRM1/MRM2) para os diferentes fármacos em estudo.

<b>Fármaco</b>	<b>Rácio dos íões (MRM1/MRM2) <math>\pm</math> DP (<math>n = 7</math>)</b>
<b>Citalopram</b>	3,44 $\pm$ 0,56
<b>Fluoxetina</b>	12,8 $\pm$ 2,9
<b>Norsertalina</b>	0,95 $\pm$ 0,10
<b>Sertralina</b>	1,00 $\pm$ 0,09

#### 4.1.5 Otimização das condições cromatográficas

Para além de terem sido otimizadas as condições de deteção no espectrómetro de massa, nomeadamente a temperatura da linha de solvatação, temperatura do bloco, fluxo do gás nebulizador, fluxo do gás de secagem e voltagem da interface, foi necessário otimizar as condições cromatográficas. A variação destes parâmetros teve como objetivo obter uma boa resolução dos picos cromatográficos dos fármacos em estudo.

O estudo do gradiente foi realizado utilizando uma mistura de soluções dos quatro fármacos com uma concentração de 1 mg/L. Este estudo tinha como objetivo separar os quatro picos no menor tempo possível e com uma boa resolução cromatográfica e, para isso, fez-se variar a composição e o fluxo da fase móvel num determinado intervalo de tempo. A composição dos diferentes gradientes testados até se conseguir obter uma boa separação cromatográfica está apresentada no anexo 1.

Na tabela 4.8 é apresentado o gradiente que permitiu separar os quatro picos em apenas nove minutos, obtendo-se uma boa resolução cromatográfica com um caudal de 0,3 mL/min. Este foi o gradiente selecionado para os estudos posteriores.

Tabela 4.8 - Composição da fase móvel selecionada para a análise, A= H<sub>2</sub>O contendo 1% HCOOH, B = ACN, caudal = 0,3 mL/min.

<b>Tempo (min)</b>	<b>% B</b>	<b>% A</b>
0	10	90
5,5	100	0
6,5	10	90
9	10	90

Na tabela 4.9 é apresentado um resumo da informação relativa aos tempos de retenção dos quatro fármacos em estudo, fluoxetina, citalopram, sertralina e norsertralina, e do padrão interno (fluoxetina deuterada), assim como dos iões precursores e correspondentes iões produto e energias de colisão utilizadas.

Tabela 4.9 - Tempos de retenção ( $t_r$ ) dos fármacos em estudo, fluoxetina, citalopram, sertralina e norsertalina, e do padrão interno (fluoxetina deuterada), íões precursores e respectivos íões produto e energias de colisão utilizadas. A análise foi realizada nas condições indicadas nas tabelas 4.6 e 4.8.

Fármaco	$t_r$ (min)	Quantificação			Confirmação	
		Íon Precursor (m/z)	Íon produto (m/z)	Q1 pre bias/CE/Q3 pre bias	Íon produto (m/z)	Q1 pre bias/CE/Q3 pre bias (V)
Citalopram	4,290	323,00	109,00	-30/-27/-32	262,15	-30/-19/-18
Fluoxetina deuterada	4,769	315,30	44,00	-11/-14/-19	—	—
Fluoxetina	4,773	310,20	44,20	-11/-14/-17	148,20	-11/-10/-16
Norsertalina	4,774	333,10	292,10	-12/-14/-19	275,10	-12/-6/-21
Sertralina	4,863	306,10	158,85	-15/-28/-16	275,10	-15/-14/-19

#### 4.1.6 Otimização dos parâmetros de SPE

Durante o processo de otimização dos parâmetros que influenciam a eficiência de extração por SPE foram testadas três colunas de extração diferentes (Bond Elut Plexa (200 mg, 6 mL) da *Agilent*, Strata-X (200 mg, 3 mL) da *Phenomenex* e Oasis MCX (150 mg, 6 mL) da *Waters*, assim como solventes e volumes de eluição distintos.

As diferentes colunas de extração foram testadas em diferentes condições experimentais de forma a se determinar aquelas que apresentavam as recuperações mais elevadas. A otimização deste parâmetro é importante para se maximizem as recuperações dos fármacos em amostras reais, melhorando assim a capacidade de detecção do método. As recuperações para os processos de SPE foram calculadas relativamente às concentrações de cada fármaco após SPE e as concentrações de uma mistura de fármacos a 50 µg/L sem extração por SPE, através da expressão:

$$\text{Recuperação} = (\text{concentração A}/\text{concentração B}) \times 100 \% \quad (4.1)$$

Onde,

Concentração A - concentração do analito obtido após o procedimento de extração.

Concentração B - concentração do analito adicionada à amostra (sem efetuar o procedimento de extração).

#### 4.1.6.1 Coluna Bond Elut Plexa (200 mg, 6 mL) da Agilent

O estudo sobre a coluna de extração mais indicada iniciou-se com a *Bond Elut Plexa* (200 mg, 6 mL) da *Agilent*. As condições iniciais de acondicionamento, lavagem, eluição e tratamento da amostra foram as seguintes:

- **Acondicionamento** com 6 mL MeOH, 6 mL H<sub>2</sub>O Mili-Q
- **Amostra:** 50 mL água Mili-Q com 1 mL mistura de padrões a 50 µg/L.
- **Lavagem** com 6 mL de H<sub>2</sub>O Mili-Q
- **Secagem** cerca de 20 minutos sob vácuo
- **Eluição** com 5 mL de MeOH
- **Tratamento da amostra:** i) Evaporar cada um dos extratos utilizando um sistema de azoto; ii) redissolver o extrato em 1 mL de MeOH:H<sub>2</sub>O (10:90); iii) filtrar o extrato utilizando filtros de PTFE/L de 0,22 µm; iv) agitar no vortex.

Utilizando as condições experimentais acima descritas apenas se recuperou 4,5% de sertralina, 0,9 % de fluoxetina, 41,0 % de citalopram e 1,8 % de norsertalina. De uma forma geral as recuperações foram extremamente reduzidas, sendo necessário alterar as condições de acondicionamento, lavagem e eluição de modo a aumentar a eficiência de extração. Neste sentido estudou-se o pH da amostra, soluções de acondicionamento e de eluição. Todas as análises foram efetuadas em duplicado e as extrações repetidas de modo a testar a reprodutibilidade dos resultados.

Na tabela 4.10 são apresentados os resultados das recuperações obtidas para cada uma das diferentes alterações das variáveis em estudo.

Tabela 4.10 - Recuperações obtidas para os fármacos em análise utilizando a coluna Bond Elut Plexa (200 mg, 6 mL) da *Agilent*, para cada um dos parâmetros em estudo.

Parâmetro em avaliação	Recuperações (%)			
	Sertralina	Fluoxetina	Citalopram	Norsertalina
- Sem ajuste de pH	4,4	0,63	18,0	2,8
- pH 2	3,4	0,75	26,6	1,3
- pH 11	8,3	5,5	21,9	8,2
- Eluição com 5 mL MeOH + 5 mL <i>n</i> -hexano	5,5	0,2	0,4	2,9
- Eluição com 5 mL MeOH + 5 mL 2% (v/v) HCOOH em MeOH	12,8	10,2	40,3	11,2
- pH 2 e eluição com 5 mL MeOH + 5 mL <i>n</i> -hexano	19,2	19,3	51,5	15,4
- pH 11 e eluição com 5 mL MeOH + 5 mL <i>n</i> -hexano	22,8	20,7	36,4	21,7

Da análise da tabela 4.10 verifica-se que se obtiveram recuperações reduzidas com a coluna *Bond Elut Plexa* (200 mg, 6 mL) da *Agilent*. Concluiu-se que esta não é uma coluna de extração adequada para os analitos de interesse neste estudo.

#### 4.1.6.2 Coluna *Strata-X* (200 mg, 3 mL) da *Phenomenex*

Dadas as baixas recuperações obtidas com a coluna *Bond Elut Plexa*, prosseguiu-se o estudo testando-se uma outra coluna, a *Strata-X* (200 mg, 3 mL) da *Phenomenex*. As condições iniciais de acondicionamento, lavagem, eluição e tratamento da amostra foram as seguintes:

- **Acondicionamento** com 6 mL MeOH, 6 mL H<sub>2</sub>O Mili-Q
- **Amostra** 50 mL água Mili-Q + 1 mL mistura de padrões a 50 µg/L.
- **Lavagem** com 6 mL de H<sub>2</sub>O Mili-Q
- **Secagem** cerca de 20 minutos sob vácuo
- **Eluição** com 5 mL de MeOH
- **Tratamento da amostra:** i) evaporar cada um dos extratos utilizando um sistema de azoto; ii) redissolver o extrato em 1 mL de MeOH:H<sub>2</sub>O (10:90); iii) filtrar o extrato utilizando filtros de PTFE/L de 0,22 µm; iv) agitar no vortex.

Os resultados obtidos continuaram a não ser satisfatórios por apresentarem recuperações baixas, da ordem dos 4,1 % para a sertralina, 0,9 % para a fluoxetina, 16,9 % para o citalopram e 3,9 % para a norsertalina. Similarmente à coluna *Bond Elut Plexa* estudou-se o pH da amostra, soluções de acondicionamento e de eluição, sendo as análises efetuadas em duplicado e as extrações repetidas de modo a testar a reprodutibilidade dos resultados.

Na tabela 4.11 apresentam-se os resultados das recuperações obtidas para cada uma das diferentes alterações das variáveis em estudo.

Tabela 4.11 - Recuperações obtidas para os fármacos em análise utilizando a coluna *Strata-X* (200 mg, 3 mL) da *Phenomenex*, para cada um dos parâmetros em estudo.

Parâmetro em avaliação	Recuperações (%)			
	Sertralina	Fluoxetina	Citalopram	Norsertalina
- pH 2 e eluição com 5 mL MeOH + 5 mL ACN	4,3	0,7	0,6	3,4
- pH 11 e eluição com 5 mL MeOH + 2% (v/v) HCOOH em MeOH	3,8	0,4	27,8	1,6

A análise dos resultados obtidos permitiu verificar que as taxas de recuperação eram reduzidas para esta coluna, não sendo por isso apropriada para a recuperação dos analitos em estudo.

#### **4.1.6.3 Coluna *Oasis MCX* (150 mg, 6mL) da *Waters Corporation***

Dadas as reduzidas recuperações obtidas com as duas colunas anteriormente estudadas selecionou-se para estudo uma terceira coluna, a *Oasis MCX* (150 mg, 6mL) da *Waters Corporation*. As condições iniciais de acondicionamento, lavagem, eluição e tratamento da amostra foram as seguintes:

- **Acondicionamento** com 6 mL MeOH, 6 mL H<sub>2</sub>O Mili-Q
- **Amostra** 50 mL água Mili-Q + 1 mL mistura de padrões a 50 µg/L.
- **Lavagem** com 5 mL 2% (v/v) HCOOH em H<sub>2</sub>O
- **Secagem** aproximadamente 20 minutos sob vácuo
- **Eluição** com 5 mL 5% (v/v) NH<sub>4</sub>OH em MeOH
- **Tratamento da amostra:** i) evaporar cada um dos extratos utilizando um sistema de azoto; ii) redissolver o extrato em 1 mL de MeOH:H<sub>2</sub>O (10:90), iii) filtrar o extrato utilizando filtros PTFE/L de 0,22 µm; iv) agitar no vortex.

Utilizando as condições acima descritas os resultados obtidos mostraram não ser aceitáveis por exibirem recuperações reduzidas de 4,5 % para a sertralina, 0,9 % para a fluoxetina, 29,7 % para o citalopram e 1,1 % para a norsertalina. Nestas circunstâncias procedeu-se à otimização do pH, soluções de acondicionamento, lavagem e eluição, sendo as análises efetuadas em duplicado e as extrações repetidas de modo a testar a reprodutibilidade dos resultados. Apresentam-se na tabela 4.12 as percentagens de recuperação obtidas com esta coluna.

Tabela 4.12 - Recuperações obtidas para os fármacos em análise utilizando a coluna *Oasis MCX* (150 mg, 6mL) da *Waters Corporation*, para cada um dos parâmetros em estudo.

	Recuperações (%)			
	Sertralina	Fluoxetina	Citalopram	Norsertalina
Acondicionamento com 6 mL MeOH, 6 mL H <sub>2</sub> O a pH 2 ; 50 mL amostra (mistura de padrões a 50 µg/L) com ajuste pH 2 Eluição com 5 mL de MeOH e 5 mL a 5% (v/v) de NH <sub>4</sub> OH em MeOH e 5 mL de MeOH, seguida de centrifugação (10 min)	49,8	36,6	59,6	41,6
Acondicionamento com 6 mL MeOH, 6 mL H <sub>2</sub> O a pH 2 ; 50 mL amostra (mistura de padrões a 10 µg/L) com ajuste pH 2 Eluição com 5 mL a 5% (v/v) de NH <sub>4</sub> OH em ACN e 5 mL de ACN, seguida de centrifugação (10 min)	28,4	16,6	43,6	13,6
Acondicionamento com 6 mL MeOH, 6 mL H <sub>2</sub> O a pH 2 ; 25 mL da amostra (mistura de padrões a 50 µg/L) e eluição com 5 mL 5% (v/v) NH <sub>4</sub> OH em MeOH + 5 mL 5% (v/v) NH <sub>4</sub> OH em MeOH 5 mL MeOH + 5 mL MeOH:NH <sub>4</sub> OH:DCM (20:2:78), seguida de centrifugação (10 min)	75,1	82,6	80,7	74,0
Acondicionamento com 6 mL MeOH, 6 mL H <sub>2</sub> O a pH 2 ; 25 mL da amostra (mistura de padrões a 50 µg/L) e eluição com 5 mL DCM:MeOH:NH <sub>4</sub> OH (88:10:2), seguida de centrifugação (10 min)	63,9	51,0	73,7	52,0
Acondicionamento com 6 mL MeOH, 6 mL H <sub>2</sub> O a pH 2 ; 25 mL da amostra (mistura de padrões a 50 µg/L) e eluição com 5 mL DCM:MeOH:NH <sub>4</sub> OH (78:20:2) + 5 mL 5% (v/v) NH <sub>4</sub> OH em MeOH, seguida de centrifugação (10 min)	66,2	49,5	56,1	54,9

A análise das taxas de recuperação obtidas com as diferentes condições experimentais permitiu concluir que se conseguiu recuperar 63,9 % de sertralina, 51,0 % de fluoxetina, 73,7 % de citalopram e 52,0 % de norsertalina usando as seguintes condições experimentais:

- Coluna: *Oasis MCX* (150 mg, 6 mL) da *Waters*
- Acondicionamento: 6 mL MeOH, 6 mL H<sub>2</sub>O Mili-Q pH 2
- 25 mL amostra + 1 mL mistura de padrões a 50 µg/L (amostra com spike).
- Lavagem: 5 mL 2% HCOOH em H<sub>2</sub>O
- Secagem (≈20 minutos) sob vácuo
- Eluição: 5 mL DCM:MeOH:NH<sub>4</sub>OH (88:10:2)
- Evaporar cada um dos extratos utilizando uma corrente suave de azoto
- Redissolver o extrato em 1 mL de MeOH:H<sub>2</sub>O (10:90)
- Agitar no vortex

- Transferir solução para um eppendorf e centrifugar durante 10 minutos a uma velocidade de 9000 rpm
- Transferir o sobrenadante para um vial e adicionar 10 µL de padrão interno.

## 4.2 Curvas de calibração

Para obter as curvas de calibração para os diferentes fármacos foram analisadas por UHPLC-MS/MS, nas condições estabelecidas anteriormente, 7 soluções padrão dos 4 fármacos com concentrações de 0,5; 1; 5; 10; 25; 50 e 100 µg/L, às quais foi adicionada a mesma quantidade de fluoxetina deuterada (padrão interno). A partir das áreas dos picos obtidos calculou-se a razão entre a área do pico de cada fármaco e a área do padrão interno. As curvas de calibração dos diferentes fármacos foram obtidas pela razão das áreas dos picos do composto e do padrão interno em função da razão das correspondentes concentrações. As curvas de calibração obtidas para os quatro compostos são apresentadas nas figuras 4.16 a 4.19.

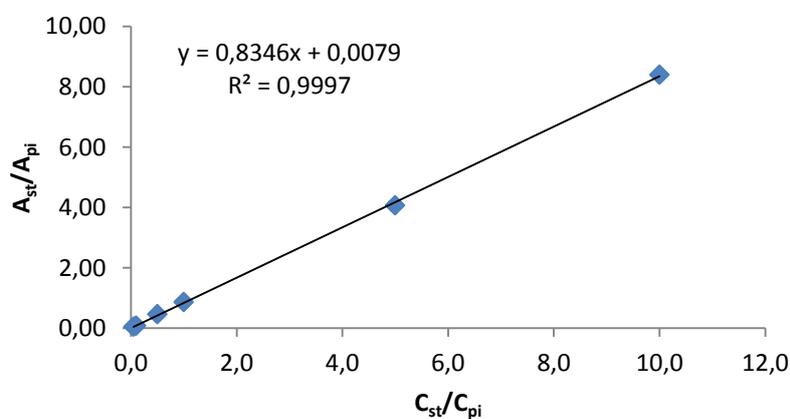


Figura 4.16 - Curva de calibração da razão das áreas dos picos da fluoxetina e do padrão interno ( $A_{st}/A_{pi}$ ) em função da razão das concentrações correspondentes ( $C_{st}/C_{pi}$ ) obtidos na análise por UHPLC-MS/MS.

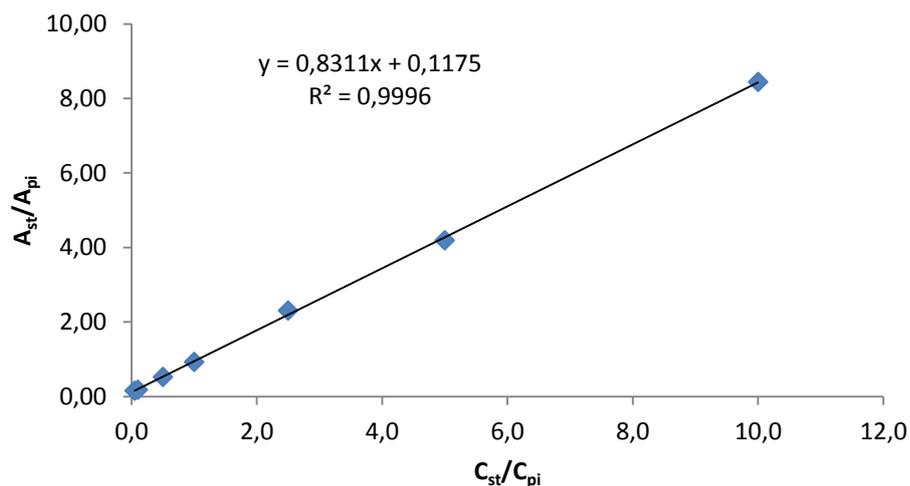


Figura 4.17 - Curva de calibração da razão das áreas dos picos da sertralina e do padrão interno ( $A_{st}/A_{pi}$ ) em função da razão das concentrações correspondentes ( $C_{st}/C_{pi}$ ) obtidos na análise por UHPLC-MS/MS.

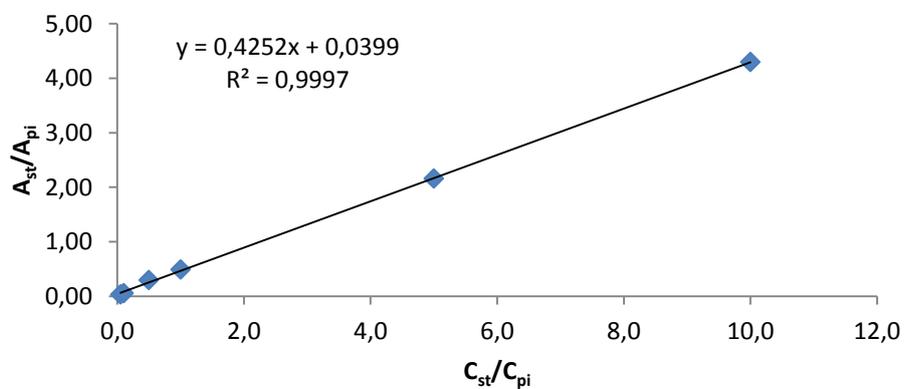


Figura 4.18 - Curva de calibração da razão das áreas dos picos do citalopram e do padrão interno ( $A_{st}/A_{pi}$ ) em função da razão das concentrações correspondentes ( $C_{st}/C_{pi}$ ) obtidos na análise por UHPLC-MS/MS.

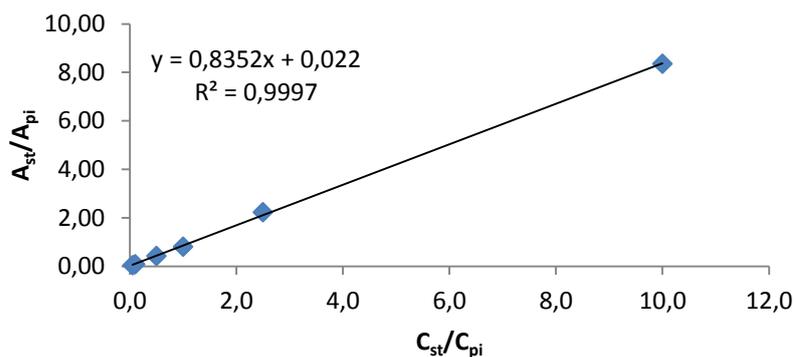


Figura 4.19 - Curva de calibração da razão das áreas dos picos da norsertalina e do padrão interno ( $A_{st}/A_{pi}$ ) em função da razão das concentrações correspondentes ( $C_{st}/C_{pi}$ ) obtidos na análise por UHPLC-MS/MS.

Analisando as curvas de calibração obtidas para cada um dos fármacos, verifica-se que existe uma relação linear entre a razão das áreas e a razão das concentrações para os quatro fármacos comprovada pelos coeficientes de correlação elevados (muito próximos de 1). Na tabela 4.13 são apresentadas os parâmetros obtidos para as curvas de calibração dos quatro fármacos em estudo.

Tabela 4.13 - Parâmetros das retas de calibração obtidas para a fluoxetina, a sertralina, o citalopram e a norsertalina, com as incertezas associadas, para um nível de confiança de 95 %.

Fármaco	Equação da reta	Coefficiente de correlação ( $r^2$ )
Fluoxetina	$y = (0,835 \pm 0,019)x + (0,0079 \pm 0,086)$	0,9997
Citalopram	$y = (0,4252 \pm 0,010)x + (0,040 \pm 0,047)$	0,9997
Sertralina	$y = (0,831 \pm 0,019)x + (0,118 \pm 0,081)$	0,9996
Norsertalina	$y = (0,835 \pm 0,022)x + (0,022 \pm 0,092)$	0,9997

A partir das curvas de calibração calcularam-se os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) para cada um dos fármacos. Os limites de detecção e de quantificação do método foram calculados a partir das curvas de calibração. Na tabela 4.14 estão apresentados os limites de detecção e quantificação obtidos.

Tabela 4.14 - Limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) determinados a partir das curvas de calibração para cada um dos fármacos.

<b>Composto</b>	<b>LOD (ng/L)</b>	<b>LOQ (ng/L)</b>
Sertralina	45,6	152
Fluoxetina	44,9	150
Citalopram	45,3	151
Norsertalina	47,6	159

Analisando os resultados apresentados na tabela 4.14 verifica-se que os LOD do método desenvolvido para a análise dos quatro fármacos em águas são muito semelhantes e variam entre 45 e 48 ng/L. Os valores obtidos para os LOQ variam entre 150 e 159 ng/L.

### **4.3 Aplicação do método a amostras de água do rio Lima**

Após a otimização de todo o método cromatográfico e do processo extrativo para a detecção em águas de superfície dos antidepressivos fluoxetina, citalopram e sertralina e de um metabolito, a norsertalina, o mesmo procedimento foi aplicado a uma amostra recolhida no rio Lima.

A amostra foi tratada por SPE utilizando o método otimizado, tendo-se adicionado a todas as amostras a mesma quantidade de padrão interno. As amostras foram tratadas e analisadas em duplicado. Os picos de cada fármaco foram identificados com base nos seus tempos de retenção e espectros de massa.

Foram determinadas as áreas dos picos de cada fármaco e do padrão interno e calculadas as razões das áreas. Utilizando as curvas de calibração determinaram-se as concentrações de cada fármaco nas duas réplicas de amostra de água do rio Lima analisadas, denominadas *rio Lima 1* e *rio Lima 2*. Como as soluções analisadas foram concentradas por SPE, foram determinados as concentrações dos compostos analisados na amostra de água do rio Lima. Na tabela 4.15 são apresentados as concentrações obtidas para cada fármaco no rio Lima, as concentrações estão em ng/L.

Tabela 4.15 - Concentrações obtidas para cada um dos fármacos nas amostras de água do rio Lima (ng/L).

	<b>Sertralina</b>	<b>Fluoxetina</b>	<b>Citalopram</b>	<b>Norsertalina</b>
<b>Rio Lima 1</b>	< LOQ	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Rio Lima 2</b>	162	n.d.	<LOD	<LOQ

n.d. – Não detetado

<LOD – Abaixo do limite de deteção

<LOQ – Abaixo do limite de quantificação

Os resultados obtidos mostram que na amostra de água do rio Lima os fármacos em estudo se encontram em concentrações inferiores aos limites de deteção ou de quantificação, ou seja em concentrações na ordem dos ng/L, ou inferiores, com exceção da sertralina que foi determinada numa das análises, sendo a concentração obtida 162 ng/L.

## CAPÍTULO 5

## CONCLUSÃO



## 5. Conclusão

Neste trabalho desenvolveu-se e otimizou-se uma metodologia analítica para a determinação de três antidepressivos, o citalopram, a fluoxetina e a sertralina assim como um metabolito a norsertralina, em águas superficiais. Com este objetivo utilizou-se uma metodologia de UHPLC-MS/MS com ionização por “electrospray” precedida de extração em fase sólida (SPE).

Na primeira fase do trabalho procedeu-se à otimização das condições experimentais do sistema de UHPLC-MS/MS, nomeadamente a otimização do analisador de massa, monitorização de reação múltipla, gradiente de eluição, temperatura da linha de solvatação, temperatura do bloco, fluxo do gás de secagem, fluxo do gás nebulizador e a voltagem do interface. As condições que permitiram obter picos cromatográficos com maior resolução e com maior sensibilidade, e num menor tempo de análise, foram: temperatura da linha de solvatação e temperatura do bloco a 200 °C, fluxo do gás nebulizador a 2,2 L/min, fluxo do gás de secagem 12,0 L/min, voltagem do interface a 1 kV, eluição em gradiente utilizando como fase móvel 0,1% ácido fórmico em água ultra-pura e ACN, com variação entre os 10 e os 100% de ACN, voltando no final da corrida aos 10% de ACN durante um tempo de análise de 9 minutos com um caudal de 0,3 L/min.

Foram também testados os diferentes parâmetros experimentais que afetam a recuperação destes compostos no procedimento de SPE, tendo-se verificado que as recuperações obtidas eram, em geral baixas para os quatro compostos estudados. Após otimização das condições experimentais conseguiu-se obter recuperações de 73,7% para o citalopram, de 51,0% para a fluoxetina, de 63,9% para a sertralina e de 52,0% para a norsertralina. Estas recuperações foram obtidas utilizando uma coluna *Oasis MCX* (150 mg, 6 mL) da *Waters*, acondicionada com 6 mL MeOH e 6 mL H<sub>2</sub>O Mili-Q pH 2. O volume de amostra foi de 50 mL e na etapa de lavagem usou-se 5 mL 2% HCOOH em H<sub>2</sub>O Mili-Q. Por fim, a eluição dos compostos de interesse foi feita com 5 mL DCM:MeOH:NH<sub>4</sub>OH (88:10:2).

Nestas condições foram determinados os limites de deteção e de quantificação para cada analito, tendo-se obtido, respetivamente, 45,3 ng/L e 151 ng/L para o citalopram; 44,9 ng/L e 150 ng/L para a fluoxetina; 45,6 ng/L e 152 ng/L para a sertralina; e 47,6 ng/L e 159 ng/L para a norsertralina.

Para testar a aplicabilidade do método desenvolvido para a quantificação de fármacos em amostras de águas superficiais analisou-se amostras de água provenientes do rio Lima. A concentração destes analitos na amostra de água do rio Lima analisada é muito baixa, sendo em geral inferior aos limites de detecção ou quantificação do método.

A partir dos resultados obtidos com este trabalho, podemos afirmar que a metodologia aqui proposta pode tornar-se uma ferramenta vantajosa, em estudos futuros, na monitorização de antidepressivos em águas superficiais e residuais.

## CAPÍTULO 6

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



## 5. Referências Bibliográficas

- [1] [http://www.infarmed.pt/portal/page/INFARMED/MONITORIZACAO\\_DO\\_MERCADO/OBSERVATORIO/DE\\_FICHEIROS/Estudo\\_psicofarmacos.pdf](http://www.infarmed.pt/portal/page/INFARMED/MONITORIZACAO_DO_MERCADO/OBSERVATORIO/DE_FICHEIROS/Estudo_psicofarmacos.pdf)
- [2] <http://www.mdsaude.com/2010/04/antidepressivos>
- [3] [http://www.infopedia.pt/\\$antidepressivos](http://www.infopedia.pt/$antidepressivos)
- [4] <http://www.actamedicaportuguesa.com/pdf/2011-24/1/091-098.pdf>
- [5] <http://pt.wikipedia.org/wiki/Antidepressivo>
- [6] <http://www.psiqweb.med.br/site/?area=NO/LerNoticia&idNoticia=153>
- [7] R.A. Moreno, D.H. Moreno, M.B.M. Soares, “Psicofarmacologia de antidepressivos”, *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 1999, **21**, 24-40.
- [8] B.J. Sadock, V.A. Sadock, N. Sussman. *Manual de Farmacologia Psiquiátrica de Kaplan & Sadock*. 4ª Edição, 2007, pag. 337-50.
- [9] J. Flórez, J.A. Armijo, A. Mediavilla. *Farmacologia humana*. 3ª Edição. 1997, pag. 549-63.
- [10] [www.chemicalize.org](http://www.chemicalize.org)
- [11] S. Jickells, A. Negrusz, *Clarke's Analytical Forensic Toxicology*, London, Pharmaceutical Press, 2008.
- [12] S. Fernandes, “Determinação de sertralina, venlafaxina e seus metabolitos ativos, em sangue e urina, por UPLC-MS/MS”. Tese de mestrado, Universidade de Coimbra, 2013.
- [13] Infarmed, *Resumo das Características do Medicamento Sertralina Winthrop 50 e 100 mg Comprimidos revestidos por película*. Aprovado a 13 de Novembro de 2008.
- [14] W.R. Barrionuevo, F.M. Lança, “Extração em fase solida (SPE) e micro extração em fase solida (SPME) de piretenoides em água”, *Química Nova*, 2001, **24**, 172-175.

- [15] Sigma Aldrich, *Guide to solid Phase extraction*, 1998.
- [16] W.R. Malfará, C. Bertucci, M.E. Queiroz, S.D. Carvalho, M.P. Bianchi, E.J. Cesarino, J.Á. Crippa, R.C. Queiróz, “Reliable HPLC method for therapeutic drug monitoring of frequently prescribed tricyclic and nontricyclic antidepressants”, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2007, **44**, 92-96.
- [17] J. Patel, E.P. Spencer, R.J. Flanagan, “HPLC of Sertraline and Norsertaline in Plasma or Serum” *Biomedical Chromatography*, 1996, **10**, 351-354.
- [18] Polettini, Aldo, *Applications of LC-MS in Toxicology*, London, Pharmaceutical Press (PhP), 2006.
- [19] C. Wu, A.L. Spongberg, J.D. Witter, “Use of solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry for simultaneous determination of various pharmaceuticals in surface water”, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 2008, **88**, 1033-1048.
- [20] W. Osswald, S. Guimarães. *Terapêutica Medicamentosa e suas Bases Farmacológicas*, 4ª Edição, Porto Editora, 2006, Capítulos 6,7,8 e 12.
- [21] M. Lader, *Avery's Drug Treatment*, 4ª Edição, Elsevier, 1997, pag 1416-1425.
- [22] D.M. Cox, F. Zhong, M. Du, E. Duchoslav, T. Sakuma, J. C. McDermott, “Multiple Reaction Monitoring as a Method for Identifying Protein Posttranslational Modifications”, *J. Biomol. Tech.* 2005, **16**, 83–90.
- [23] M.J. Hilton, K.V. Thomas, “Determination of selected human pharmaceutical compounds in effluent and surface water samples by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry”, *J. Chromatogr. A*, 2003, **1015**, 129-41.
- [24] P. Vazquez-Roig, V. Andreu, C. Blasco, Y. Picó, “Risk assessment on the presence of pharmaceuticals in sediments, soils and waters of the Pego–Oliva Marshlands” *Science of the Total Environment*, 2012, **440**, 24–32.

- [25] M.J. Gómez, M. Petrovic, A.R. Fernández-Alba, D. Barceló, “Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis in hospital effluente wastewaters”, *J. Chromatogr. A*, 2006, **1114**, 224-33.
- [26] L. Patrolecco, N. Ademollo, P. Grenni, A. Tolomei, A. Barra Caracciolo, S. Capri, “Simultaneous determination of human pharmaceuticals in water samples by solid phase extraction and HPLC with UV-fluorescence detection”, *Microchem. J.*, 2013, **167**, 165-171.
- [27] M. Gros, M. Petrovic, D. Barceló, “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*, 2006, **70**, 678-690.
- [28] T.V. Madureira, J.C. Barreiro, M.J. Rocha, Q.B. Cass, M.E. Tiritan, “Pharmaceutical trace analysis in aqueous environmental matrices by liquid chromatography-ion trap tandem mass spectrometry”, *J Chromatogr A*, 2009, **1216**, 7033-42.
- [29] J.C. Van De Steen, C.P. Stove, W.E. Lambert, “A field study on 8 pharmaceuticals and 1 pesticide in Belgium: Removal rates in waste water treatment plants and occurrence in surface water”, *Sci. Total Environ.*, 2010, **408**, 3448-53.
- [30] N.M. Vieno, T. Tuhkanen, L. Kronberg, “Analysis of neutral and basic pharmaceuticals in sewage treatment plants and in recipient rivers using solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry detection”, *J. Chromatogr. A*, 2006, **1134**, 101-11.
- [31] K. Wille, H. Noppe, K. Verheyden, J. Vanden-Bussche, E. De Wulf, P. Van Caeter P, “Validation and application of an LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of 13 pharmaceuticals in seawater”, *Anal. Bioanal. Chem.* 2010, **397**, 1797-808.

- [32] B. Kasprzyk-Hordern, R.M. Dinsdale, A.J. Guwy , “ Multiresidue methods for the analysis of pharmaceuticals, personal care products and illicit drugs in surface water and wastewater by solid-phase extraction and ultra-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry”, *Anal. Bioanal. Chem.* 2008, **391**, 1293-308.
- [33] E. Gracia-Lor, J.V. Sancho, F. Hernández, “Multi-class determination of around 50 pharmaceuticals , including 26 antibiotics, in environmental and wastewater samples by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry”, *J.Chromatogr. A*, 2011, **1218**, 2264-75.
- [34] R. López-Serna, M. Petrovic, D. Barceló, “Development of a fast instrumental method for the analysis of pharmaceuticals in environmental and wastewaters based on ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC)-tandem mass spectrometry (MS/MS)”, *Chemosphere*, 2011, **85**, 1390-99.

## ANEXOS



## **Anexo 1:**

Composição dos diferentes gradientes testados até se conseguir obter uma boa separação cromatográfica.

Tabela A.1: Primeiro gradiente de eluição testado.

<b>Tempo (min)</b>	<b>% ACN</b>	<b>% Água+0.1%HCOOH</b>
0	30	70
5	100	0
7	30	70
8	30	70

Com este gradiente, tabela A.1, utilizando-se um caudal de 0,2 mL/min, apenas se conseguiu identificar o pico correspondente ao citalopram, os restantes fármacos ainda não eram eluídos.

Tabela A.2: Segundo gradiente de eluição testado.

<b>Tempo (min)</b>	<b>% ACN</b>	<b>% Água+0.1%HCOOH</b>
0	30	70
2	85	15
6	100	0
8	30	70
10	30	70

Com este gradiente, tabela A.2, utilizando-se um caudal de 0,2 mL/min já conseguimos obter três picos correspondentes ao citalopram, fluoxetina e norsesertralina, mas os picos apareciam a tempos de retenção perto do fim da corrida. Nestas condições cromatográficas ainda não era possível eluir a sertralina.

Tabela A.3: Terceiro gradiente de eluição testado.

<b>Tempo (min)</b>	<b>% ACN</b>	<b>% Água+0.1%HCOOH</b>
0	50	50
2	85	15
6	100	0
8	100	0
10	50	50
15	50	50

Com este gradiente, tabela A.3, utilizando-se um caudal de 0,2 mL/min, já conseguimos separar os picos correspondentes aos quatro compostos, no entanto, estavam a sair perto do fim da corrida e a sua resolução cromatográfica não era adequada.

Tabela A.4: Quarto gradiente de eluição testado.

<b>Tempo (min)</b>	<b>% ACN</b>	<b>% Água+0.1%HCOOH</b>
0	50	50
1,5	85	15
5	100	0
7	100	0
9	50	50
10	50	50

Com este gradiente, tabela A.4, utilizando-se um caudal de 0,3 mL/min, já conseguimos obter os quatros picos dentro do intervalo de tempo pré-definido (10 minutos), mas os picos não estavam bem definidos e apresentavam fronting.

Tabela A.5: Quinto gradiente de eluição testado.

<b>Tempo (min)</b>	<b>% ACN</b>	<b>% Água+0.1%HCOOH</b>
0	50	50
5	100	0
6	100	0
8	50	50
10	50	50

Com este gradiente, tabela A.5, e utilizando-se um caudal de 0,3 mL/min, mantinha-se uma resolução cromatográfica inadequada.

Tabela A.6: Sexto gradiente de eluição testado.

<b>Tempo (min)</b>	<b>% ACN</b>	<b>% Água+0.1%HCOOH</b>
0	50	50
4	100	0
5	100	0
7	50	50
10	50	50

Com este gradiente, tabela A.6, e utilizando um caudal de 0,3 mL/min, continua a observar-se um arrastamento (tailing) nos picos dos compostos.

Tabela A.7: Sétimo gradiente de eluição testado.

<b>Tempo (min)</b>	<b>% ACN</b>	<b>% Água+0.1%HCOOH</b>
0	60	40
4	100	0
5	100	0
7	60	40
10	60	40

Com este gradiente, tabela A.7, utilizando um caudal de 0,3 mL/min, verificou-se que, quanto mais elevada fosse a percentagem inicial de acetonitrilo, pior era a resolução cromatográfica dos picos, pelo que se optou por diminuir a percentagem de solvente orgânico e aumentar a percentagem inicial de fase aquosa.