

EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE FÁRMACOS EM MATRIZES AQUOSAS

Ana Teresa Lopes Branco de Oliveira

*Dissertação apresentada à Escola Superior de Tecnologia e Gestão
do Instituto Politécnico de Bragança
para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química*

Orientadores

Prof. Doutora Ana Queiroz

Prof. Doutor António Ribeiro

Prof. Doutor Paulo Brito

“O melhor da vida é seguir em frente com todos os seus planos e sonhos, abraçar a vida e viver todos os dias com paixão, perder e ainda manter a fé e vencer enquanto agradece. Tudo isto porque o mundo pertence àqueles que ousam ir atrás do que querem. E porque a vida é realmente muito curta para ser insignificante.”

Charlie Chaplin

Agradecimentos

Quero agradecer a todos que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento pessoal e académico e por isso expresso aqui o meu mais sincero reconhecimento e agradecimento pelos ensinamentos, colaboração, dedicação, disponibilidade e apoio ao longo deste ano de Mestrado em Engenharia Química.

Assim, tudo isto não seria possível sem a orientação, a disponibilidade e paciência dos Professor Doutor António Ribeiro, Professora Doutora Ana Queiroz e Professor Doutor Paulo Brito os quais contribuíram para enriquecer, com grande dedicação, em todas as etapas subjacentes ao trabalho realizado.

Quero também expressar o meu agradecimento à Doutora Paula Placência, Responsável Técnica do Laboratório de Química Analítica, por toda a ajuda que me deu no meu trabalho e por todo o apoio que sempre me deu.

Um agradecimento especial à minha colega Ana Nemoto por ter partilhado a fase inicial deste trabalho comigo.

Um agradecimento especial à Catarina Gomes do Laboratório LSRE por toda a ajuda que me deu.

Ao Raul Mateus, quero agradecer pela enorme compreensão, pelo amor, partilha, companheirismo e apoio incondicional com que sempre me presenteou constantemente, contribuindo para chegar ao fim deste percurso.

Aos meus pais e irmãos que são e serão insubstituíveis em todas as fases da minha vida, e que sem eles nada disto seria possível, agradeço todos os conselhos e apoio que sempre me deram.

O meu muito OBRIGADO a todos!

Resumo

Os poluentes emergentes são substâncias potencialmente tóxicas que, embora encontradas em baixas concentrações, da ordem dos mg.L^{-1} ou inferior, podem produzir efeitos nocivos no meio ambiente. Devido às suas concentrações vestigiais, ainda não estão, na sua grande maioria, incluídos nos programas de controlo da qualidade da água nem nas regulamentações nacionais ou internacionais de controlo ambiental. Os Produtos Farmacêuticos e de Cuidados Pessoais (*Pharmaceutical and Personal Care Products* - PPCPs) representam um importante grupo de poluentes emergentes devido ao aumento do consumo mundial e à capacidade inerente de induzirem efeitos fisiológicos nocivos em doses muito baixas, o que suscita várias preocupações relacionadas com os possíveis efeitos adversos em humanos, animais e sistemas ambientais.

O objetivo primeiro deste trabalho é identificar os principais poluentes emergentes em meios hídricos, de meios populacionais com características semelhantes às do distrito de Bragança e selecionar alguns para estudo. Pretende-se também desenvolver e implementar experimentalmente um método expedito de extração em fase sólida (SPE) para compostos pertencentes a classes farmacológicas diferentes e sua posterior deteção e quantificação em matrizes aquosas usando cromatografia líquida acoplada com um detetor de arranjo de díodos (HPLC-DAD). O método a desenvolver deve ser aplicável a fármacos de classes diferentes e com um valor de pK_a elevado. A validação do método de extração e de quantificação será realizada através da sua implementação em amostras reais, como por exemplo, amostras fluviais, de piscinas ou estações de tratamento de águas residuais, entre outras.

Inicialmente foram selecionados para estudo dez fármacos (azitromicina, sulfametoxazol, carbamazepina, diclofenaco, naproxeno, ibuprofeno, ácido acetilsalicílico, cafeína, paracetamol e cetoprofeno), que foram divididos em dois grupos. No primeiro grupo foram colocados compostos com um valor de pK_a mais baixo e no segundo grupo os compostos com um valor de pK_a mais elevado. Esta subdivisão baseia-se no diferente comportamento ácido-base destes dois grupos com a consequente necessidade de realizar otimizações diferentes para as fases móveis utilizadas em cromatografia líquida. Para o grupo

de compostos com um valor de pKa menor utilizou-se uma coluna Nucleosil® C18, compatível com valores de pH compreendidos entre 2 e 8. Para o grupo de compostos com pKa mais elevado, utilizou-se uma coluna SiliaChrom® XT C18 compatível com uma gama de pH entre 1 e 12. A otimização do método de separação e quantificação foi realizada em diferentes etapas. Na primeira etapa, estudou-se a influência da composição do solvente na resolução cromatográfica de cada grupo de fármacos. Utilizaram-se, nesta primeira etapa, diferentes misturas entre acetonitrilo:água:modificador ácido (ácido trifluoroacético) e diferentes misturas entre metanol:água:modificador básico (dietilamina). De seguida, estudaram-se vários tipos de gradientes de solvente de forma a melhorar o tempo de análise da separação cromatográfica. Nesta otimização, selecionaram-se os comprimentos de onda para cada composto, de forma a maximizar o valor de absorvância, de modo a otimizar-se também os limites de deteção e quantificação do método cromatográfico.

Após a otimização de todo o processo de extração, separação e quantificação por SPE/HPLC-DAD, o método foi validado com a análise de oito amostras reais recolhidas em diferentes matrizes aquosas: Rio Sabor, Rio Onor, Rio Fervença, Piscina Municipal, Rio Sousa, um Ribeiro, água de torneira da rede de distribuição municipal, e água recolhida à saída da ETAR. Constatou-se que apenas a água à saída da ETAR estava contaminada com uma substância não identificada.

Palavras-chave: Poluentes emergentes; Compostos farmacêuticos; Ambiente; Extração em Fase Sólida; Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detetor de Arranjo de Díodos.

Abstract

Emerging pollutants are potentially toxic substances that, although found in low concentrations, in the order of mg/L or lower, can produce harmful effects on the environment. Due to their trace concentrations, they are for the most part not yet included in water quality control programs or national or international environmental control regulations. Pharmaceutical and Personal Care Products (PPCPs) represent an important group of emerging pollutants due to increasing world consumption and the inherent ability to induce harmful physiological effects at very low doses, which raises several concerns related to possible adverse effects on humans, animals and environmental systems.

The first objective of this work is to identify the main emerging pollutants in water from populations with similar characteristics to those of Bragança district and select some for study. It is also intended to experimentally develop and implement an expedited method of solid phase extraction (SPE) for compounds belonging to different pharmacological classes and their subsequent detection and quantification by liquid chromatography coupled with an array diode array detector (HPLC-DAD) in aqueous matrices. The method to be developed should be applicable to pharmaceutical drugs of different classes and with a high pKa value. The validation of the extraction and quantification method will be performed through its implementation in real samples, such as swimming pool samples, river samples or wastewater treatment plants, among others.

Initially, ten drugs were selected for study (azithromycin, sulfamethoxazole, carbamazepine, diclofenac, naproxen, ibuprofen, acetylsalicylic acid, caffeine, paracetamol and ketoprofen) which were divided into two groups. Compounds with a lower pKa value were placed in the first group and compounds with a higher pKa value in the second group. This subdivision is based on the different acid-base behaviour of these two groups with the consequent need to perform different optimizations for the mobile phases used in liquid chromatography. For the group of compounds with a lower pKa a Nucleosil® C18 column compatible with pH values between 2 and 8 was used. For the group of compounds with a higher pKa a SiliaChrom® XT C18 column compatible with pH range between 1 and 12 was used. The optimization of the separation and quantification method was

performed in different steps. In the first stage, the influence of solvent composition on the chromatographic resolution of each drug group was studied. Different mixtures between acetonitrile: water: acid modifier (trifluoroacetic acid) and different mixtures between methanol: water: basic modifier (diethylamine) were used in this first step. Then, various types of solvent gradients were studied in order to improve the time of chromatographic separation analysis. In this optimization, the wavelengths for each compound were selected in order to maximize the absorbance value, in order to optimize the detection and quantification limits of the chromatographic method.

After optimization of the entire extraction, separation and quantification process by SPE / HPLC-DAD, the method was validated by analysing eight real samples collected in different aqueous matrices: Sabor river, Onor river, Fervença river, Municipal Pool, Sousa river, a brook, tap water from the municipal distribution network, and water collected outside the City Waste Water Treatment Plant (WWTP). Only water leaving the WWTP was found to be contaminated with a non-identified substance.

Keywords: Emerging Pollutants; Pharmaceutical Compounds; Environment; Solid Phase Extraction; High Performance Liquid Chromatography with Diodes Array Detector.

Índice

Lista de Figuras	i
Lista de Tabelas	iv
Lista de Abreviaturas	vi
1. Introdução	1
1.1 Enquadramento e Motivação	1
1.2 Objetivos	2
2. Os Fármacos como Micropoluentes Prioritários	4
2.1 Contaminantes Emergentes	4
2.2 Legislação sobre contaminantes emergentes	5
2.3 Problema Ambiental	5
2.4 Fármacos mais utilizados	7
2.5 Fármacos selecionados para estudo	9
2.5.1 Analgésicos e Anti-inflamatórios	9
Ibuprofeno	9
Cetoprofeno	10
Ácido acetilsalicílico	11
Diclofenaco	11
Naproxeno	12
Paracetamol	12
2.5.2 Antibióticos	13
Azitromicina	13
Sulfametoxazol	14
2.5.3 Anticonvulsionante	15
Carbamazepina	15
2.5.4 Estimulador do Sistema Nervoso Central	16
Cafeína	16

3. Análise de Fármacos em Matrizes Aquosas	19
3.1 Técnicas de Extração	19
3.1.1 Extração Líquido – Líquido	19
3.1.2 Microextração em Fase Sólida	20
3.1.3 Extração em Fase Sólida	21
3.2 Métodos de Análise	23
3.3 Validação do Método Analítico	25
4. Descrição Experimental	26
4.1 Reagentes	26
4.2 Equipamento	27
4.3 Metodologia Experimental	28
5. Resultados e Discussão	31
5.1 Análise de fármacos por HPLC-DAD utilizando uma fase móvel ácida	31
5.1.1 Otimização da composição da fase móvel	31
5.1.2 Identificação do tempo de retenção e escolha do comprimento de onda para a análise de cada fármaco	34
5.1.3 Análise da mistura de fármacos com pKa superior a 5	37
5.1.4 Estudos com gradiente de solvente	38
5.2 Análise de fármacos por HPLC-DAD utilizando uma fase móvel alcalina ... 41	41
5.2.1 Otimização da composição da fase móvel	41
5.2.2 Identificação do tempo de retenção e escolha do comprimento de onda para a análise de cada fármaco	47
5.2.3 Estudo da influência da adição do modificador alcalino	49
5.2.4 Estudos com gradiente de solvente	52
5.3 Extração em Fase Sólida	56
5.3.1 Determinação das eficiências de extração no processo de extração utilizando a coluna Nucleosil 10-5 C18	57

5.3.2 Determinação das eficiências de extração do processo de extração utilizando a coluna SiliaChrom® XT C18	61
5.4 Validação do método analítico	66
5.5. Implementação do método analítico	70
6. Conclusão	76
7. Referências Bibliográficas	78
8. Anexos.....	86
Anexo A – Metodologia estatística utilizada na validação do método analítico	86
Anexo B – Tratamento estatístico das curvas de calibração	91
Sulfametoxazol	91
Paracetamol	93
Cafeína.....	95
Carbamazepina	97
Anexo C – Determinação das eficiências de extração utilizando na análise por HPLC-DAD uma coluna Nucleosil 100-5 C18)	99
Anexo D – Determinação das eficiências de extração utilizando na análise por HPLC-DAD uma coluna SiliaChrom XT C18	103
Anexo E – Folha de especificações da coluna cromatográfica Nucleosil 100-5 C18	107
Anexo E – Folha de especificações da coluna cromatográfica SiliaChrom XT C18	109

Lista de Figuras

Figura 1.	Possíveis fontes e percursos para a ocorrência de resíduos farmacêuticos no meio aquático	7
Figura 2.	Os 10 princípios ativos mais vendidos em Portugal em 2016	9
Figura 3.	Estrutura molecular do ibuprofeno	10
Figura 4.	Estrutura molecular do cetoprofeno	10
Figura 5.	Estrutura molecular do ácido acetilsalicílico	11
Figura 6.	Estrutura molecular do diclofenaco	11
Figura 7.	Estrutura molecular do naproxeno	12
Figura 8.	Estrutura molecular do paracetamol	13
Figura 9.	Estrutura molecular da azitromicina	14
Figura 10.	Estrutura molecular do sulfametoxazol	15
Figura 11.	Estrutura molecular da carbamazepina	15
Figura 12.	Estrutura molecular da cafeína	16
Figura 13.	Esquema de uma fibra e do processo de SPME	21
Figura 14.	Sequência das etapas da extração por SPE	22
Figura 15.	Sistema de HPLC-DAD, Jasco utilizado na análise de fármacos	27
Figura 16.	Sistema de SPE utilizado na extração de fármacos	28
Figura 17.	Efeito da composição de solvente, misturas acetonitrilo (ACN) e água (W), na análise cromatográfica de uma solução padrão de cetoprofeno a 100 mg.L ⁻¹	32
Figura 18.	Estudo do efeito da composição em TFA numa fase móvel 60ACN:40W:TFA na análise cromatográfica de Cetoprofeno	34
Figura 19.	Análise de 10 padrões individuais de fármacos com uma concentração de 100 ppm por HPLC-DAD. Sobreposição dos cromatogramas obtidos na análise dos padrões individuais	35
Figura 20.	Análise por HPLC-DAD de uma mistura dos 5 fármacos com uma concentração de 10 ppm a diferentes comprimentos de onda	38

- Figura 21.** Separação por HPLC-DAD da mistura de 5 fármacos a 10 40
mg.L⁻¹ para os três gradientes estudados
- Figura 22.** Valores experimentais de pressão (MPa) em função da 43
percentagem volumétrica de metanol em água
- Figura 23.** Viscosidades da mistura água-metanol em função da % 43
molar de metanol
- Figura 24.** Análise por HPLC-DAD de uma solução de paracetamol com 44
uma concentração de 100 ppm com diferentes composições
de solvente metanol:água
- Figura 25.** Separação da mistura padrão contendo 5 fármacos 5 46
(azitromicina, carbamazepina, cafeína, paracetamol e
sulfametoxazol) em diferentes composições metanol:água
com recolha de sinal utilizando 4 comprimentos de onda
distintos
- Figura 26.** Análise por HPLC-DAD dos padrões a 100 ppm de cafeína, 48
paracetamol e sulfametoxazol, numa fase móvel
30MeOH:70W e carbamazepina numa fase móvel
60MeOH:40W
- Figura 27.** Análise obtida por HPLC-DAD para o padrão de azitromicina 49
com concentração de 1000 ppm
- Figura 28.** Padrão de Azitromicina com 1000 e 100ppm com uma fase 51
móvel de 100MeOH:0.001DEA
- Figura 29.** Análise obtida por HPLC-DAD da mistura padrão dos 4 52
compostos com concentração de 100 ppm com diferentes
fases móveis
- Figura 30.** Análise por HPLC-DAD da uma mistura de 4 fármacos 53
utilizando o gradiente 1
- Figura 31.** Análise de uma mistura de fármacos por HPLC-DAD com o 54
gradiente 2
- Figura 32.** Análise de uma mistura de fármacos por HPLC-DAD com o 55
gradiente 3
- Figura 33.** Análise por HPLC-DAD de uma mistura de 4 fármacos com 55
o gradiente 3 e com uma percentagem de modificador
alcalino nula

- Figura 34.** Análise por HPLC-DAD da uma mistura padrão de 4 56
fármacos com a concentração de 100 ppm, gradiente 3
utilizando 0.005%DEA
- Figura 35.** Sequência das etapas utilizadas nas extrações em fase 57
sólida
- Figura 36.** Análise por HPLC-DAD, nos vários comprimentos de onda, 59
das 4 amostras recolhidas nas 4 etapas de SPE das
soluções padrão de paracetamol, cafeína, carbamazepina e
sulfametoxazol preparadas em água
- Figura 37.** Análise por HPLC-DAD das 4 amostras recolhidas nas 4 63
etapas de SPE de uma solução padrão de sulfametoxazol e
cafeína preparadas em água
- Figura 38.** Alguns dos pontos de recolha das amostras de água. 1 - Rio 70
Sabor, 2 - Rio Ferveça, 3 - Rio Onor
- Figura 39.** Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD para a análise do 71
branco com diferentes comprimentos de onda
- Figura 40.** Análise HPLC-DAD da Amostra de água do Rio Sabor nos 72
diferentes comprimentos de onda
- Figura 41.** Análise HPLC-DAD da Amostra de água à saída da ETAR 73
nos diferentes comprimentos de onda
- Figura 42.** Análise cromatográfica obtida por HPLC-DAD da eluição da 74
amostra do Rio Ferveça contaminada com uma mistura
padrão de 35 ppm (1- sulfametoxazol, 2 - paracetamol, 3 -
cafeína, 4 - carbamazepina)

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Algumas propriedades físico-químicas dos 10 fármacos em estudo	18
Tabela 2.	Exemplos de estudos envolvendo extração de fármacos por SPE. Apresentam-se os cartuchos comerciais, adsorventes, solventes e valores de recuperação obtidos	22
Tabela 3.	Técnicas mais usadas na extração e detecção de fármacos e os valores médios de concentrações encontrados	24
Tabela 4.	Características dos 10 reagentes usados para preparar os padrões analíticos	26
Tabela 5.	Influência da percentagem de TFA no valor do pH (fase móvel, 60ACN:40W)	33
Tabela 6.	Comprimento de onda correspondente ao valor máximo de absorvância e tempo de retenção para cada fármaco	36
Tabela 7.	Condições experimentais para os gradientes estudados	39
Tabela 8.	Estudo da influência da composição da fase móvel (misturas metanol:água) na pressão do sistema HPLC-DAD utilizado	42
Tabela 9.	Comprimento de onda ótimo correspondente ao valor máximo de absorvância e tempo de retenção para cada fármaco	48
Tabela 10.	Valores de pH da fase móvel em função das diferentes percentagens de metanol, água e dietilamina	50
Tabela 11.	Condições operatórias utilizadas no gradiente 1	53
Tabela 12.	Condições operatórias utilizadas no gradiente 2	53
Tabela 13.	Condições operatórias utilizadas no gradiente 3	54
Tabela 14.	Condições operatórias referentes à operação por SPE das várias misturas padrão de paracetamol, cafeína, carbamazepina e sulfametoxazol preparadas em água	58
Tabela 15.	Áreas e tempos de retenção das várias etapas da extração em fase sólida do padrão de paracetamol, cafeína, carbamazepina e sulfametoxazol com 100W	60

Tabela 16.	Eficiências de extração obtidas por SPE para os padrões individuais de paracetamol, cafeína, carbamazepina e sulfametoxazol	60
Tabela 17.	Condições operatórias referentes à operação por SPE das misturas padrão de sulfametoxazol, cafeína, paracetamol e carbamazepina preparadas em água	62
Tabela 18.	Áreas e tempos de retenção das várias etapas da extração em fase sólida do padrão de sulfametoxazol, cafeína, paracetamol e carbamazepina com 100W	63
Tabela 19.	Eficiências de extração obtidas por SPE para os padrões individuais de paracetamol, cafeína, carbamazepina e sulfametoxazol	64
Tabela 20.	Método e caudais da extração em fase sólida do padrão da mistura com 35 ppm	65
Tabela 21.	Áreas e tempos de retenção das etapas de eluição da extração em fase sólida e da amostra da 1 ^a extração da mistura com 100W	65
Tabela 22.	Resultados da percentagem de recuperação em massa para os vários compostos	65
Tabela 23.	Valores de comprimento de onda de análise por HPLC-DAD, gamas de linearidade, declive (b) e ordenada na origem (b) e respetivos erros a 95% de confiança, coeficientes de determinação (R^2), limites de deteção (LD) e de quantificação (LQ) e coeficiente de variação do método (CV_m) para os 4 fármacos estudados	67
Tabela 24.	Estudos de reprodutibilidade e repetibilidade nas análises de HPLC-DAD	69
Tabela 25.	Áreas e tempos de retenção das etapas de eluição da extração em fase sólida e da amostra da mistura com 100W	75
Tabela 26.	Eficiências de recuperação (em massa) para os 4 fármacos	75

Lista de Abreviaturas

ACN	Acetonitrilo
CLLE	Extração líquido-líquido contínua
COX	Ciclooxigenase
CV	Coeficiente de variação
DAD	Detetor de arranjo de díodos
DCI	Denominação comum internacional
DEA	Dietilamina
ESI	Ionização por spray eletrônico
ETAR	Estação de tratamento de águas residuais
ETE	Estação de tratamento de esgoto
GC	Cromatografia em fase gasosa
GC-MS	Cromatografia em fase gasosa – espectrometria de massa
hmR	<i>health market Research</i>
HPLC	Cromatografia em fase líquida de alta performance
LC-MS	Cromatografia em fase líquida - espectrometria de massa
LLE	Extração líquido-líquido
LD	Limite de deteção
LQ	Limite de quantificação
MeOH	Metanol
PMLiVE	<i>Pharmaceutical Live</i>
PPCP	Produtos farmacêuticos e de cuidado pessoal
SNC	Sistema nervoso central
SPE	Extração em fase sólida
SPME	Microextração em fase sólida
TFA	Ácido trifluoroacético
W	Água

1. Introdução

1.1 Enquadramento e Motivação

Os produtos e resíduos da indústria química e farmacêutica têm vindo a ganhar um destaque crescente desde o final do século passado na qualidade de micropoluentes emergentes presentes no ambiente aquático. Alguns produtos como fármacos, desinfetantes, detergentes, aditivos alimentares e produtos para cuidados pessoais, fazem parte de um vasto grupo de micropoluentes que potenciam efeitos secundários bastante nocivos, tanto para o meio ambiente como para a saúde pública. (Souza, 2011)

Dos fármacos prescritos mundialmente, estima-se que entre 50% a 90% sejam excretados na sua forma ativa ou como metabolitos, e, parte considerável desta percentagem seja lançada diretamente nas águas superficiais. (Rodrigues, 2011)

Os efeitos ecotoxicológicos dos fármacos são ainda desconhecidos, pois até há relativamente pouco tempo estas substâncias não eram vistas como potencialmente tóxicas para o meio ambiente, em parte devido à escassez, ou mesmo inexistência, de análises capazes de detetar concentrações na gama de $\mu\text{g.L}^{-1}$ a ng.L^{-1} . (Shihomatsu, 2015)

Atualmente, para a identificação e a quantificação de fármacos em matrizes aquosas, têm sido utilizadas técnicas de extração e métodos de análise bastante mais eficientes resultantes da grande evolução tecnológica das últimas décadas. A extração destes compostos é normalmente realizada com técnicas de extração em fase sólida (SPE) ou microextração em fase sólida (SPME) as quais possibilitam valores de eficiências de extração significativamente superiores às da extração em fase líquida (LLE) (Silva *et al.*, 2016). Em relação à análise destes analitos, é agora possível detetar e quantificar valores de $\mu\text{g.L}^{-1}$ ou até mesmo de ng.L^{-1} , muito em parte devido ao acoplamento de detetores de massa com os sistemas de cromatografia em fase líquida e gasosa, e também devido aos recentes avanços nas técnicas de extração empregues.

Os fármacos são uma das classes de contaminantes mais preocupantes em matrizes aquosas, uma vez que se tem verificado um aumento significativo no

seu consumo a nível mundial, tornando este tópico cada vez mais relevante. Como os perigos para o ser humano resultantes da presença destes fármacos nas matrizes aquosas não são atualmente bem conhecidos, a legislação que obriga a monitorização destes fármacos é ainda muito escassa ou mesmo inexistente. Esta temática é relativamente recente na comunidade científica e, portanto, apesar de existirem já algumas metodologias experimentais para a extração e quantificação de fármacos, o número de fármacos já estudado ainda é muito reduzido. Em Portugal, foram encontrados muito poucos estudos publicados (Paíga *et al.*, 2013; Salgado *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2015; Fortunato, 2014; Palma *et al.*, 2009 e Reis-Santos *et al.*, 2018) e não foi encontrado qualquer estudo realizado no distrito de Bragança.

1.2 Objetivos

Os objetivos principais deste estudo são:

- (i) Identificar os principais poluentes emergentes em meios hídricos do distrito de Bragança ou de meios populacionais comparáveis com os do distrito de Bragança e de entre estes selecionar alguns fármacos que sirvam de modelo para este estudo;
- (ii) Implementar experimentalmente um método expedito de extração em fase sólida (SPE) para fármacos pertencentes a classes farmacológicas diferentes;
- (iii) Desenvolver um método de deteção e quantificação por cromatografia em fase líquida com detetor e arranjo de díodos (HPLC-DAD) para fármacos em matrizes aquosas. Pretende-se que este método seja aplicável a fármacos de classes diferentes, nomeadamente:
 - Seleção da fase estacionária (tipo de coluna cromatográfica) mais adequada para análise de cada classe de fármacos;
 - Otimização da composição da fase móvel; Desenvolvimento de um método de gradiente caso se justifique;
 - Determinação dos parâmetros de validação do método de análise; Determinação das curvas de calibração, limites de deteção e de quantificação, parâmetros de repetibilidade e reprodutibilidade.

(iv) Validar o método analítico de extração e de quantificação através da sua implementação com amostras reais (amostras de piscinas, amostras fluviais, estações de tratamento de águas residuais, etc.).

Com este estudo pretende-se, essencialmente, implementar e validar um método analítico expedito para a deteção e quantificação de fármacos em amostras aquosas. Pretende-se contribuir para que o grupo de investigação disponha de uma metodologia analítica que possa ser aplicada numa etapa futura no desenvolvimento de estratégias para a remoção/eliminação de fármacos em efluentes aquosos.

2. Os Fármacos como Micropoluentes Prioritários

2.1 Contaminantes Emergentes

Atualmente, a indústria produz um elevado número de compostos orgânicos sintéticos, tanto para consumo doméstico como industrial, para os quais ainda não existe conhecimento suficiente das possíveis consequências nefastas para o ambiente e para os seres vivos. Alguns destes compostos representam uma nova classe de contaminantes pois, apesar da sua baixa concentração, apresentam, ainda assim, um potencial poluente significativo, sendo designados de “Contaminantes Emergentes”. Estes contaminantes têm a particularidade de não precisarem de persistir durante muito tempo no meio ambiente para causarem efeitos adversos, uma vez que as suas elevadas velocidades de transformação e de remoção são equilibradas por uma introdução contínua no meio ambiente e, conseqüentemente, provocarem por acumulação elevadas concentrações a longo prazo. (Becker, 2012)

Existem diversos grupos de substâncias que têm sido considerados como contaminantes emergentes. Os principais grupos são classificados em pesticidas, surfactantes, plastificantes, fármacos e produtos de higiene pessoal, entre outros (Santana, 2013). Uma importante classe destes compostos, que tem recebido cada vez mais atenção, é constituída pelos produtos usados nos cuidados pessoais (PPCPs, do inglês *Pharmaceuticals and Personal Care Products*) sendo utilizados em grandes quantidades em todo o mundo pela sociedade atual, os quais possuem, muitas vezes, produtos farmacêuticos como princípios ativos. (Daughton e Ternes, 1999)

Os fármacos são um grupo extenso e heterogéneo de compostos que são sintetizados com o intuito de prevenir infeções, reduzir sintomas e tratar doenças. (Becker, 2012)

Estas substâncias possuem normalmente um peso molecular baixo com uma estrutura química bem definida, possuindo propriedades farmacológicas usadas na medicina humana e veterinária. Deste modo, são desenvolvidos para serem perseverantes, ou seja, não perdem a sua atividade biológica até alcançarem o efeito terapêutico desejado. (Shihomatsu, 2015)

2.2 Legislação sobre contaminantes emergentes

Nos últimos anos tem vindo a ser cada vez mais reconhecida a necessidade de se gerir a proliferação, a incidência ambiental e o risco da presença de contaminantes emergentes nas águas superficiais, em particular na Europa. Os esforços legislativos levaram ao surgimento de listas dinâmicas de vigilância de contaminantes emergentes no contexto da Diretiva do Quadro da Água (Diretiva 2000/60/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de outubro de 2000), a qual estabeleceu a monitorização obrigatória em toda a União Europeia. (Reis-Santos *et al.*, 2018)

A Diretiva 2008/105/CE e a Diretiva 2013/39/EU referem que a poluição química das águas de superfície apresenta uma ameaça para o ambiente aquático e indicam formas de monitorizar substâncias químicas como o benzeno, o diclorometano, o naftaleno, entre outros.

A Decisão de Execução (UE) 2018/840 apresenta uma lista dinâmica de vigilância de contaminantes emergentes, nomeadamente de fármacos, como por exemplo, antibióticos como a amoxicilina e a ciprofloxacina. Esta Decisão indica ainda o método analítico e o método de extração mais apropriado para cada substância, particularmente para antibióticos da família dos macrólidos (azitromicina, eritromicina e claritromicina), neonicotinoídeos, metiocarbe, entre outras.

2.3 Problema Ambiental

Os fármacos são compostos químicos relativamente hidrofílicos, lipofílicos e biologicamente ativos. Podem ser administrados diretamente na pele ou por inalação, por via oral ou através de injeções ou infusões. Depois da sua administração, as moléculas são absorvidas, distribuídas, metabolizadas de forma parcial e por fim são eliminadas pelo corpo. (Tambosi, 2008)

Os resíduos farmacêuticos no ambiente tornaram-se numa importante área de estudo e o seu potencial impacto tanto a nível ambiental como nos seres vivos tem sido intensamente investigado nos últimos anos (Pflugger e Dietrich, 2001; Kolpin *et al.*, 2002; Bottoni *et al.*, 2010). Alguns estudos referem que já foram detetados mais de 150 princípios ativos de compostos farmacêuticos nos

efluentes de águas residuais e em águas superficiais. Estes compostos foram encontrados em concentrações muito baixas, na gama de ng.L^{-1} até mg.L^{-1} . (Dias, 2011)

As substâncias farmacêuticas eliminadas para o meio ambiente tornaram-se num assunto de crescente preocupação. Um claro exemplo desta preocupação é o etinilestradiol, um estrogénio presente em muitos anticoncecionais, que está a ser responsável, de certo modo, pela feminização dos peixes. Existem ainda outros compostos que afetam os organismos aquáticos como é o caso do propranolol, diclofenaco, genfibrozila, ibuprofeno e da fluoxetina. (Larsson *et al.*, 2007)

Existem vários fármacos muito utilizados, como a eritromicina, a ciclofosfamida, o naproxeno, sulfametoxazol e sulfassalazina, em que a persistência ambiental chega a ser superior a um ano. Um exemplo de persistência no meio ambiente bastante mais significativa é o ácido clofíbrico, o principal metabolito do clofibrato, usado essencialmente para a diminuição do colesterol e dos triglicérideos, tendo uma persistência ambiental estimada em 21 anos. (Zuccato *et al.*, 2000)

Na Figura 1, apresenta-se um diagrama com as possíveis fontes e alguns percursos para a ocorrência de resíduos farmacêuticos no meio ambiente. Os caminhos que os fármacos percorrem até chegarem ao meio ambiente são os mais diversos, desde a sua excreção por humanos ou animais, como os descartes irregulares de resíduos hospitalares.

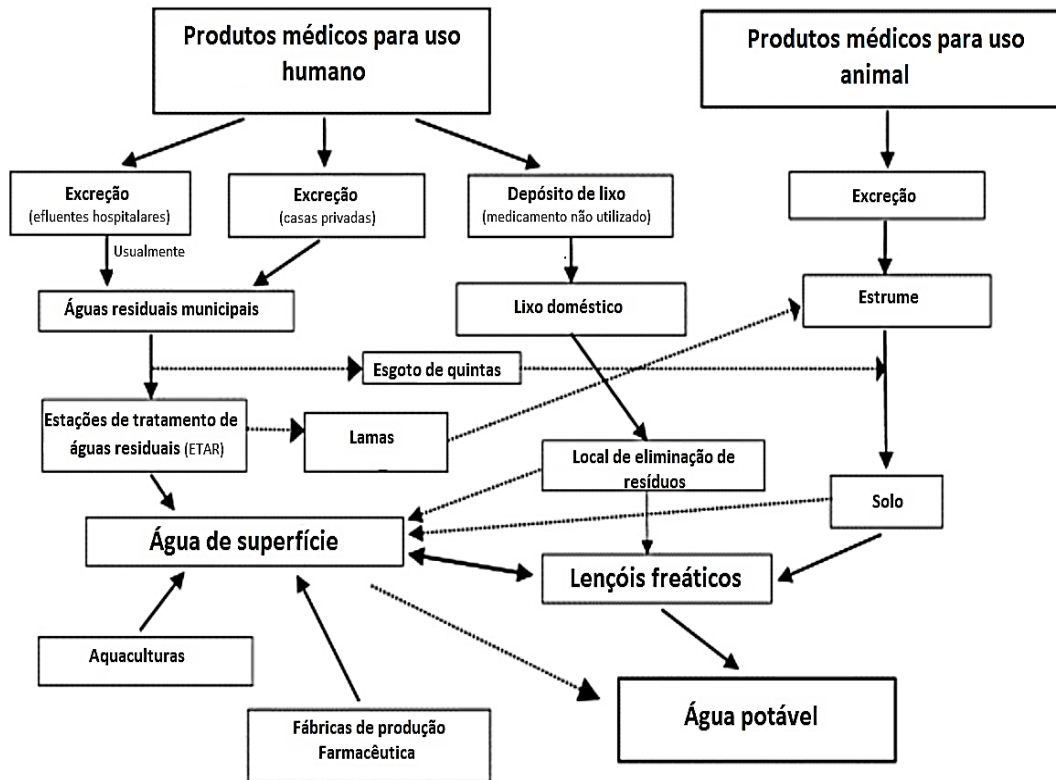


Figura 1. Possíveis fontes e percursos para a ocorrência de resíduos farmacêuticos no meio aquático. (Adaptado de Heberer, 2002)

2.4 Fármacos mais utilizados

Segundo a PMLiVE (Pharmaceutical Live, um dos principais grupos de *media* internacional do setor farmacêutico) os 5 fármacos mais vendidos a nível mundial, no ano de 2016 foram:

- Humira (adalimumab) – utilizado no tratamento de doenças como artrite reumatóide, doença de Crohn, entre outras;
- Harvoni (ledipasvir e sofosbuvir) – utilizado no tratamento da hepatite C;
- MabThera/Rituxan (rituximab) – utilizado no tratamento de alguns câncros no sangue;
- Avastin (bevacizumab) – utilizado no tratamento de vários tipos de cancro (pulmão, mama, etc);
- Herceptin (trastuzumab) – utilizado no tratamento do cancro da mama e do estômago.

A nível Europeu, segundo a Labiotech, *média* digital que é líder e que cobre a indústria europeia de biotecnologia, os 5 fármacos mais vendidos, no ano de 2017 foram:

- Herceptin (trastuzumab) - utilizado no tratamento do cancro da mama e do estômago;
- Avastin (bevacizumab) - utilizado no tratamento de vários tipos de cancro (pulmão, mama, etc);
- Xarelto (rivaroxaban) - indicado para prevenir a formação de coágulos de sangue nas veias;
- Eylea (aflibercept) - indicado para o tratamento de degeneração macular relacionada com a idade, glaucoma neovascular;
- Lantus (insulina glargina) - indicado para o tratamento de diabetes *mellitus* tipo 2 e também para o tratamento de diabetes *mellitus* tipo 1 para o controlo da hiperglicemia.

Em Portugal, segundo a Health Market Research (hmR), empresa de consultoria e elaboração de estudos de mercado, quantitativos e qualitativos, na área da saúde, os fármacos mais vendidos em 2016 pertenciam às classes dos antidiabéticos, reguladores de colesterol e triglicéridos, associações de antagonistas da angiotensina-II, antidepressivos e estabilizadores do humor, antipsicóticos e antirreumáticos não esteroides. Na Figura 2, encontram-se os 10 fármacos mais vendidos em Portugal no ano de 2016 organizados por Denominação Comum Internacional (DCI). De acordo com estes dados, as substâncias ativas com maior volume de vendas (em milhões de euros) foram a metformina+vildagliptina e a metformina+sitagliptina (tratamento da diabetes), a rosuvastina (tratamento da hipercolesterolemia, colesterol LDL alto), o diclofenaco (tratamento da dor e inflamação), o paracetamol (tratamento da dor e febre) e o ibuprofeno (tratamento da dor, febre e inflamação). Destaca-se, destes dados, o crescimento nas vendas do diclofenaco, do paracetamol e do ibuprofeno.



Figura 2. Os 10 princípios ativos mais vendidos em Portugal em 2016.

(Fonte: Adaptado de hmR)

2.5 Fármacos selecionados para estudo

Neste trabalho pretende-se desenvolver um método de análise e quantificação de alguns fármacos em meios aquosos. De forma a ter um estudo mais abrangente decidiu-se estudar 10 fármacos pertencentes a diferentes classes farmacológicas, como analgésicos, anti-inflamatórios não esteroides, antibióticos, um anti convulsionante e um estimulador do sistema nervoso central. Todos estes fármacos, apresentados de seguida, foram selecionados pela sua elevada prescrição médica e conseqüentemente pela sua maior probabilidade de contaminação ambiental, mesmo num distrito do interior do território nacional, como é o caso de Bragança.

2.5.1 Analgésicos e Anti-inflamatórios

Ibuprofeno

O ibuprofeno, ácido (RS)-2-(4-2-metilpropil) fenil propiónico, cuja estrutura molecular se apresenta na Figura 3, é um fármaco com ação anti-inflamatória não esteroide, antipirética e analgésica.

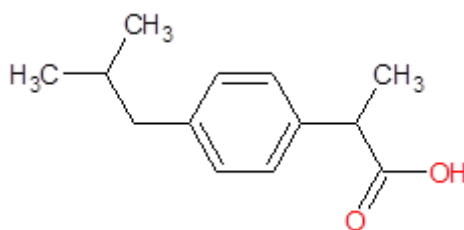


Figura 3. Estrutura molecular do ibuprofeno.

É um composto derivado do ácido propiônico sendo prescrito no tratamento de febre e dor (Fortunato, 2014). Atua por inibição da síntese de prostaglandinas através da inibição da cicloxigenase (COX-1 e COX-2). As prostaglandinas, substâncias encontradas em várias partes do organismo, desempenham um papel fundamental nos processos inflamatórios e consequentemente no surgimento de febre e dor. (Timoneda, 2017)

Cetoprofeno

O cetoprofeno, ácido (RS)-2-(3-benzoil-fenil) propanóico, cuja estrutura molecular se apresenta na Figura 4, é um anti-inflamatório não esteroide, com uma poderosa e eficaz ação no alívio da dor provocada por distúrbios traumáticos, reumáticos e orto-pediátricos devido às suas propriedades anti-inflamatórias e analgésicas. (Sarzi-Puttini *et al.*, 2013)

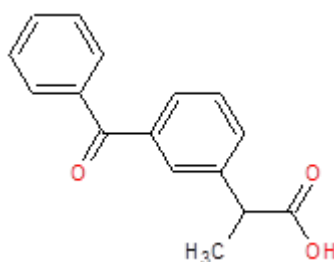


Figura 4. Estrutura molecular do cetoprofeno.

A sua atividade farmacêutica é devida à potente inibição da cicloxigenase através da ação do metabolismo do ácido araquidônico. (Leite, 2013)

Ácido acetilsalicílico

O ácido acetilsalicílico, conhecido comercialmente como aspirina, cuja estrutura molecular se apresenta na Figura 5, pertence ao grupo dos anti-inflamatórios não esteroides e é frequentemente prescrito no tratamento de febre, dor e inflamação. Este fármaco difere dos outros anti-inflamatórios no mecanismo de ação. No entanto, os salicilatos têm efeitos semelhantes, como é o caso do efeito antipirético, anti-inflamatório e analgésico. (Rao *et al.*, 2016)

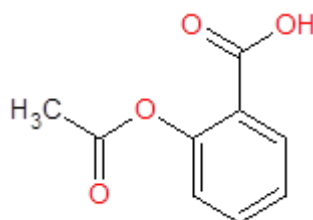


Figura 5. Estrutura molecular do ácido acetilsalicílico.

A aspirina inibe a cicloxigenase, mas ao contrário do que se verifica com grande parte de outros fármacos, afeta de forma irreversível mais a COX-1 do que a COX-2 da enzima. (Edwards, 2018)

Diclofenaco

O diclofenaco, 2-(2,6-diclofenil) amino benzenoacetato de sódio, cuja estrutura molecular se apresenta na Figura 6, é utilizado no tratamento de osteoartrose, artrite reumatoide e na redução de dor em lesões agudas. (Sousa, 2015)

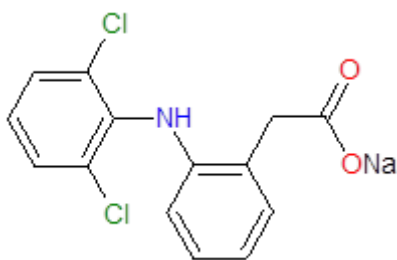


Figura 6. Estrutura molecular do diclofenaco.

Este composto é um anti-inflamatório não esteroide, com propriedades anti-inflamatórias, antipiréticas e analgésicas. Este fármaco inibe a cicloxigenase com maior incidência na variante COX-2 do que na COX-1. (Altman *et al.*, 2015)

Tem um tempo de semivida de apenas 2 horas, cerca de 65% do fármaco é eliminado na urina na sua forma original e 35% são eliminados através da bÍlis como metabolitos. (Sousa, 2015)

Naproxeno

O Naproxeno, ácido (S)-(+)-2-(6-metoxi-2-naftil) propiónico, cuja estrutura molecular se apresenta na Figura 7, pertence à classe dos fármacos anti-inflamatórios não esteroides e possui propriedades analgésicas e antipiréticas. O naproxeno é utilizado no alívio da dor ligeira a moderada, dores de cabeça, dismenorreia, sendo também aplicado no tratamento de doenças como a artrite reumatoide, osteoartrite e a gota aguda. (Miranda, 2014)

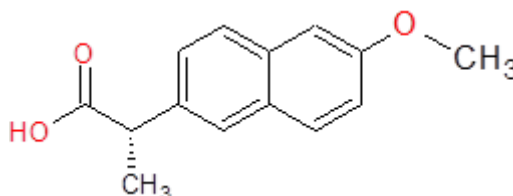


Figura 7. Estrutura molecular do naproxeno.

Este fármaco é um derivado do ácido propiónico e o seu mecanismo de atuação bloqueia a cicloxigenase que é responsável pela produção de algumas das substâncias químicas que surgem na resposta de lesões ou doenças (Nahar, 2012).

Paracetamol

O paracetamol, também conhecido por acetaminofeno, N-(4-hidroxifenil) etanamida, cuja estrutura molecular se apresenta na Figura 8, é um anti-inflamatório não esteroide, com propriedades analgésicas. Esta substância é, principalmente, metabolizada pelo fígado, onde grande parte é convertida em

compostos inativos pela formação de glicuronídeo e sulfatos, posteriormente excretados pelos rins. (Vicente, 2001)

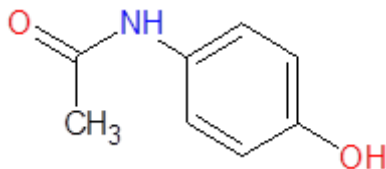


Figura 8. Estrutura molecular do paracetamol.

É um fármaco utilizado principalmente no alívio de dores leves a moderadas muitas vezes associadas a gripes e constipações e na diminuição da febre. (Fortunato, 2014)

Esta substância está entre os fármacos mais utilizados em todo o mundo na categoria de analgésicos moderados. (Mohamad *et al.*, 2018)

2.5.2 Antibióticos

Azitromicina

A azitromicina, N-metil-11-aza-10-deoxo-10-dihidroeritromicina A, cuja estrutura molecular se apresenta na Figura 9, é um antibiótico da classe dos azalídeos e pertence à subclasse dos antibióticos macrolídeos. É um derivado da eritromicina, mas sendo antibiótico, é ainda mais eficaz que esta. (Kabir, 2009)

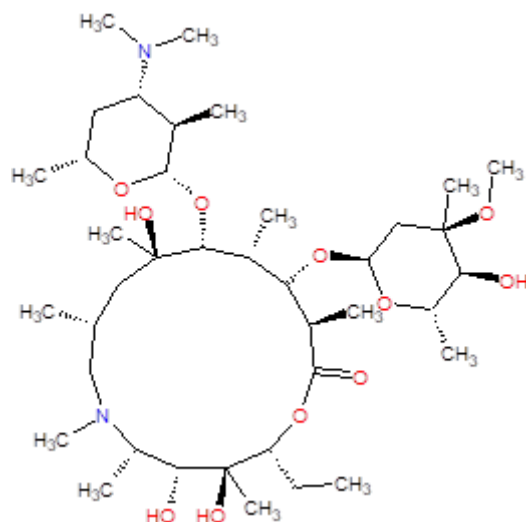


Figura 9. Estrutura molecular da azitromicina.

Este composto é ativo no combate de muitas bactérias patogênicas Gram-positivas, como por exemplo, *Streptococcus*, *Staphylococcus aureus*, *Propionibacterium acnes* e *Listeria monocytogenes*. Também existem algumas bactérias Gram-negativas que são sensíveis à azitromicina, como é o caso de *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Legionella pneumophila* e *Neisseria gonorrhoeae*. Este antibiótico tem um efeito bacteriostático em patogênicos sensíveis porque interfere na síntese proteica do ácido ribonucleico, ARN. (Wilms, 2005)

Sulfametoxazol

O sulfametoxazol, 4-amino-N(5-metilisoxazol-3-il)-benzenossulfonamida, cuja estrutura molecular se apresenta na Figura 10, é um antibiótico que pertence ao grupo das sulfonamidas, que são antibióticos sintéticos, derivados do ácido sulfanílico. É normalmente usado no tratamento de infecções humanas e animais. (Huerta, 2016)

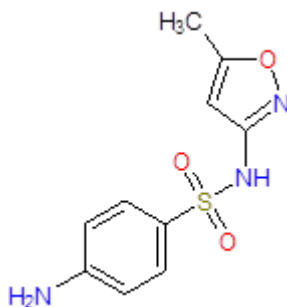


Figura 10. Estrutura molecular do sulfametoxazol.

As sulfonamidas possuem um efeito bacteriostático e inibem assim a síntese do ácido desoxirribonucleico (ADN). (Oliveira, 2017)

2.5.3 Anticonvulsionante

Carbamazepina

A carbamazepina, 2-hidroxi-propil-beta-ciclodextrina, cuja estrutura molecular se apresenta na Figura 11, é um fármaco anticonvulsionante sendo normalmente prescrito no tratamento da neuralgia do trigémio e no controlo da epilepsia e transtorno bipolar. (Santos, 2017)

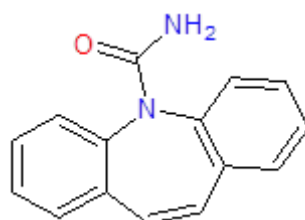


Figura 11. Estrutura molecular da carbamazepina.

Este fármaco é um derivado da carboxamida e o seu mecanismo de ação é associado à inibição dos canais de sódio dependentes de voltagem, podendo reduzir o fluxo de cálcio celular presente no organismo. (Capote, 2009)

2.5.4 Estimulador do Sistema Nervoso Central

Cafeína

A cafeína, 1,3,7-trimetilxantina, cuja estrutura molecular se apresenta na Figura 12, é um estimulante do sistema nervoso central. É um composto orgânico pertencente ao grupo dos alcaloides e é solúvel em água, álcool e benzeno. Após a sua ingestão este composto é eliminado na urina, do qual cerca de 0.5 a 3 % na sua forma intacta. (Silva, 2014)

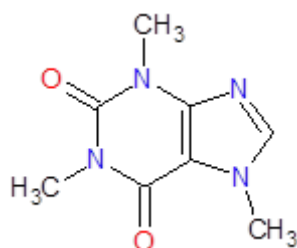


Figura 12. Estrutura molecular da cafeína.

A cafeína é um dos compostos mais consumidos no mundo pois encontra-se em muitos produtos como é o caso do café, chás, refrigerantes e chocolate. (Raimundo, 2011)

Este composto é bastante importante nas substâncias classificadas como micropoluentes emergentes pois, por semelhanças químicas, a sua ocorrência em matrizes aquosas pode significar a presença de outros contaminantes emergentes. (Santana, 2013)

Na Tabela 1 apresentam-se algumas propriedades físico-químicas referentes aos fármacos em estudo, nomeadamente a fórmula molecular, massa molar, coeficiente de partição, solubilidade em água e a constante de dissociação.

Analisando a Tabela 1 e pela observação dos dados de coeficiente de partição verifica-se que o único composto que possui mais afinidade em relação à água do que com uma fase orgânica (octanol) é a cafeína, os compostos como a aspirina, o paracetamol e o sulfametoxazol têm afinidades equivalentes para água ou uma fase orgânica, todos os restantes compostos são mais hidrofóbicos,

ou seja, têm uma maior afinidade com a fase orgânica, sendo o diclofenaco o composto mais hidrofóbico.

Quanto aos valores de solubilidade em água, os valores do diclofenaco e azitromicina são inferiores a 10 mg.L^{-1} , pelo que serão necessários métodos analíticos que possibilitem a sua deteção e quantificação em valores tão baixos. Os compostos mais solúveis em água são a cafeína e a aspirina.

O valor de pKa de cada composto é um parâmetro que afeta a retenção cromatográfica de compostos ionizáveis. Por exemplo, as bases encontram-se essencialmente na sua forma ionizada (>99%) se o valor de pH for igual a $\text{pKa}-2$ e essencialmente na sua forma não ionizada (>99%) se o valor de pH for igual a $\text{pKa}+2$. A forma não ionizada será menos polar (mais hidrofóbica), e consequentemente mais fortemente retida num sistema de fase-reversa. Assim, para valores de pH mais baixos os ácidos serão mais retidos enquanto as bases serão mais retidas para valores de pH mais elevados. (Dolan, 2019)

Deste modo, poderá ser vantajoso realizar a separação para valores mais baixos de pH para um dado grupo de compostos e utilizar um valor mais elevado de pH para outro tipo de compostos. No primeiro grupo poder-se-á incluir os compostos com um valor de pKa inferior a 5 (fixando o valor de pH inferior ou igual a 3), como sejam o ibuprofeno, cetoprofeno, aspirina, diclofenaco e naproxeno. No segundo grupo os restantes compostos com um valor de pKa superior a 5 (fixando um valor de pH superior ou igual a 7), como sejam o paracetamol, a azitromicina, o sulfametoxazol, a carbamazepina e a cafeína.

Tabela 1. Algumas propriedades físico-químicas dos 10 fármacos em estudo.

Fármaco	Fórmula Molecular	Massa Molar (g.mol ⁻¹)	Coefficiente de Partição (Log P)	Solubilidade em água (mg.L ⁻¹ , 25°C)	Constante de dissociação (pKa, 25°C)	Referências
Aspirina	C ₉ H ₈ O ₄	180.16	1.19	4600	3.49	PubChem/Drugbank
Cetoprofeno	C ₁₆ H ₁₄ O ₃	254.29	3.2/3.12	51/21.3(a 22°C)	3.88/4.45	PubChem/Drugbank
Diclofenaco	C ₁₄ H ₁₀ Cl ₂ NNaO ₂	296.14	4.51/4.2–4.5	2.4	4.2	PubChem/Queiroz, 2011
Naproxeno	C ₁₄ H ₁₄ O ₃	230.09	3.18	15.9	4.2	Miranda, 2014/Nam <i>et al.</i> , 2014
Ibuprofeno	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	206.29	3.97	21.0	4.91	PubChem/Nallani <i>et al.</i> , 2011
Sulfametoxazol	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S	253.20	0.89	610(a 37°C)	5.7/6.16	PubChem/Drugbank
Azitromicina	C ₃₈ H ₇₂ N ₂ O ₁₂	748.00	4.02/3.03	2.37	8.74/9.57	PubChem
Paracetamol	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	151.16	0.46	12.75	9.38	Castro, 2014
Cafeína	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	194.20	-0.07/-0.4	21600/11000	10.4	PubChem/Drugbank
Carbamazepina	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O	236.30	2.45	18/152	13.9/15.96	PubChem/Drugbank

3. Análise de Fármacos em Matrizes Aquosas

Como já foi referido, a monitorização de micropoluentes emergentes no ambiente é atualmente, um tema de bastante interesse e preocupação. Deste modo, têm sido aperfeiçoadas e desenvolvidas novas técnicas de extração e diversos métodos analíticos para a deteção e quantificação destes compostos em matrizes ambientais, como efluentes de Estações de Tratamento de Esgoto (ETE), águas superficiais e subterrâneas e Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETAR). (Queiroz, 2011)

O recente desenvolvimento tecnológico, principalmente ao nível dos adsorventes e dos equipamentos de deteção, permitiram um aumento considerável das eficiências de extração dos analitos presentes nas amostras e uma diminuição significativa dos limites de deteção e de quantificação.

3.1 Técnicas de Extração

A preparação da amostra, também chamada de tratamento, limpeza ou extração é uma parte importante no método analítico pois é uma etapa suscetível a erros experimentais significativos. As técnicas mais usadas para a extração de micropoluentes em matrizes ambientais são a Extração Líquido-Líquido (LLE - "*Liquid – Liquid Extraction*"), a Microextração em Fase Sólida (SPME - "*Solid Phase Micro Extraction*") e a Extração em Fase Sólida (SPE - "*Solid Phase Extraction*"). (Vijayaraj e Kumari, 2013)

3.1.1 Extração Líquido – Líquido

A extração líquido-líquido (LLE) é um processo de separação baseado na distribuição de um soluto entre duas fases e na miscibilidade parcial dos líquidos. Este processo é baseado na transferência de massa de soluto entre dois líquidos imiscíveis ou pouco miscíveis, que possuem a capacidade de realizar separações que não são viáveis por outros métodos. Pode-se dividir a extração líquido-líquido em duas etapas: na primeira etapa existe um contacto entre o solvente e a solução; na segunda etapa ocorre a partição da amostra entre as duas fases imiscíveis (orgânica e aquosa). (Souza, 2011)

3.1.2 Microextração em Fase Sólida

A microextração em fase sólida (SPME) é uma técnica de extração que utiliza um volume de solvente bastante reduzido. Consiste numa fibra de sílica fundida, que está coberta com um microfilme de um polímero ou adsorvente, que pode ser líquido, sólido ou uma mistura de ambos. (Franco, 2015)

A fibra de sílica (fase extratora) é acondicionada dentro da agulha de uma microseringa, para permitir a adsorção dos analitos. Esta extração pode ser executada das seguintes formas: imergindo a fibra diretamente na solução da amostra (DI-SPME) onde os analitos são concentrados durante 2 a 15 min, ou através da técnica de “*headspace*” (HS-SPME), na qual a amostra é aquecida e os componentes voláteis são adsorvidos na fibra exposta acima da solução. Após a extração, os analitos presentes na fibra são dessorvidos termicamente pela sua introdução no injetor aquecido de um cromatógrafo em fase gasosa ou pela sua dessorção num sistema de cromatografia em fase líquida. (Queiroz, 2011)

Na extração no modo direto, a fibra é exposta diretamente à amostra líquida. Para analitos com um coeficiente de partição alto, o tempo de extração pode ser maior devido à camada estática de água formada em torno da fibra. (Franco, 2015)

Na Figura 13 está representada uma fibra de microextração em fase sólida.

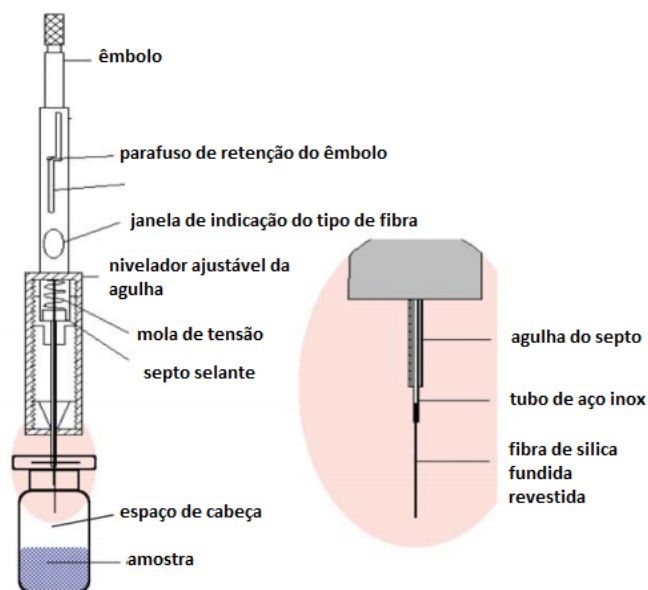


Figura 13. Esquema de uma fibra e do processo de SPME. (Fonte: Franco, 2015)

3.1.3 Extração em Fase Sólida

A extração em fase sólida (SPE) continua a ser a técnica mais utilizada na extração e pré-concentração de analitos provenientes de matrizes ambientais complexas. (Queiroz, 2011)

Esta técnica é rápida e possui valores de recuperação elevados na separação líquido-sólido sendo usada para extrair, concentrar e purificar analitos não voláteis e semivoláteis. (Shihomatsu, 2015)

A extração em fase sólida abrange a partição dos compostos entre um líquido (eluente) e uma fase sólida (adsorvente). Neste tipo de extração podem-se considerar 4 etapas: (i) Condicionamento do adsorvente (onde a fase móvel é condicionada com um solvente compatível com o material a ser ativado, devendo-se de seguida percolar o mesmo material com o solvente dos analitos); (ii) Adição da amostra (adiciona-se a amostra sobre a fase móvel anterior); (iii) Remoção dos interferentes (esta etapa pode ser opcional e consiste na lavagem ou limpeza da fase sólida com um solvente apropriado); (iv) Eluição dos analitos de interesse (esta fase traduz-se na eluição do analito num pequeno volume de eluente). (Vicente, 2001)

Um esquema representativo das etapas de extração por SPE é apresentado na Figura 14.

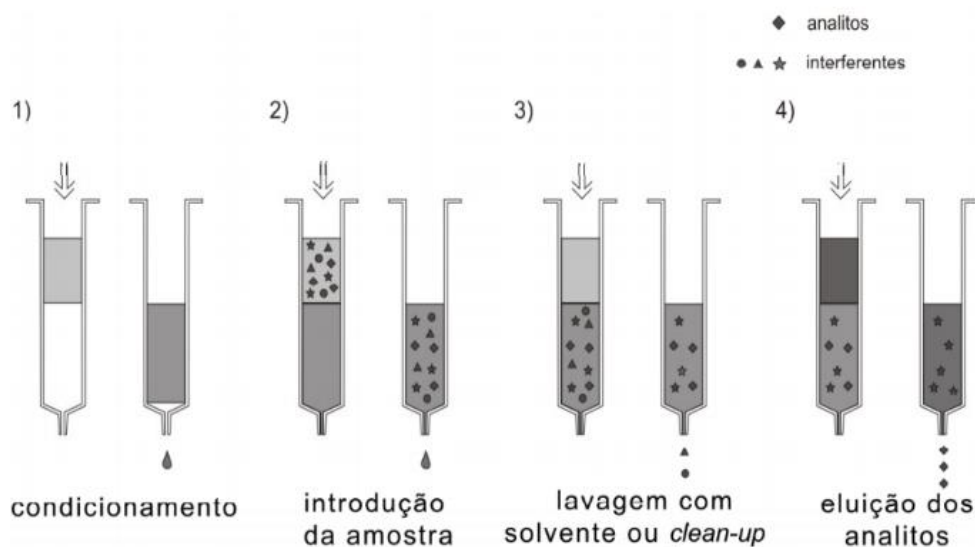


Figura 14. Sequência das etapas da extração por SPE. (Fonte: Néri, 2018)

Na Tabela 2 são apresentados alguns estudos publicados em que se utiliza a extração em fase sólida, sendo possível verificar qual o cartucho comercial usado e respetivo adsorvente, os solventes utilizados nas etapas de extração e os valores de recuperação obtidos para cada adsorvente.

Tabela 2. Exemplos de estudos envolvendo extração de fármacos por SPE. Apresentam-se os cartuchos comerciais, adsorventes, solventes e valores de eficiência de extração obtidos.

Cartucho comercial	Adsorvente	Fármacos	Eficiências de extração (%)	Referência
Bond Elut®	Sílica	Ibuprofeno e Diclofenaco	113, 108	Colaço, 2013
Oasis Max®	Polipropileno	Ibuprofeno, diclofenaco e naproxeno	94, 76, 81	Madikizela e Chimuka, 2017
Sampliq OPT	Divinilbenzeno	Paracetamol	91-99	Vicente, 2001
Oasis HLB®	N-Vinilpirrolidona e divinilbenzeno	Cetoprofeno	96	Madikizela et al, 2014

Analisando a Tabela 2 é possível verificar que as percentagens de extração para cada cartucho comercial são bastantes semelhantes nos diferentes fármacos analisados.

3.2 Métodos de Análise

Para fazer a separação, deteção e quantificação dos analitos recorre-se geralmente a métodos cromatográficos, como sejam a cromatografia em fase líquida (HPLC) e/ou a cromatografia em fase gasosa (GC). Na cromatografia em fase líquida, os compostos são separados entre uma fase móvel líquida e um enchimento sólido. Na cromatografia em fase gasosa, a amostra é vaporizada no topo de uma coluna capilar e a eluição é feita mediante o arraste por um gás inerte. (Vettorello *et al.*, 2017)

A utilização de métodos instrumentais avançados na análise em matrizes ambientais, como a cromatografia em fase gasosa com espetrometria de massa (GC-MS) ou a cromatografia em fase líquida com espetrometria de massa (LC-MS), permite a identificação de uma gama mais vasta de compostos, uma vez que o acoplamento com a espetrometria de massa possibilita limites de deteção (LD) mais baixos. A cromatografia em fase líquida com espetrometria de massa é a técnica mais usada na análise de substâncias farmacêuticas pois possui uma elevada sensibilidade. (Fatta *et al.*, 2007)

Na Tabela 3 são apresentadas algumas técnicas utilizadas na extração e deteção para os 10 fármacos selecionados para este estudo, presentes em diferentes matrizes aquosas. As amostras analisadas são provenientes de estações de tratamento de águas residuais (ETAR), estações de tratamento de esgotos (ETE) ou de águas superficiais. A informação apresentada permite verificar que a técnica de extração mais utilizada é a extração em fase sólida (SPE) e o método instrumental de análise mais empregue, para os fármacos, é a cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de arranjo de díodos (HPLC-DAD). Contudo, são também utilizados outros métodos como a cromatografia em fase líquida com espetrometria de massa e cromatografia gasosa com espetrometria de massa. Na Tabela 3 é também apresentada a concentração média encontrada em cada tipo de amostra.

Tabela 3. Técnicas mais usadas na extração e deteção de fármacos e os valores médios de concentrações encontrados.

Analito	Amostra	Extração/Separação	Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	LD/LQ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	País	Referência
Sulfametoxazol	Água de Superfície	SPE/HPLC-DAD	---	10.8/35	Portugal	Madureira <i>et al.</i> , 2010
Cafeína	Efluente ETAR	SPE/GC-MS	0.2551-22.21	0.0286/---	França	Togola e Budzinski, 2008
Ibuprofeno	Influente ETAR	SPE/HPLC-DAD	55-69	0.13/0.42	África do Sul	Madikizela e Chimuka, 2017
	Água de Superfície	SPE/HPLC-DAD	---	0.063/0.188	Polónia	Baranowska e Kowalski, 2011
	ETAR	SPE/HPLC-DAD/MS-ESI(+)	0.014-0.046	0.014/0.046	Portugal	Salgado <i>et al.</i> , 2010
Naproxeno	Influente ETAR	SPE/HPLC-DAD	15-20	0.04/0.12	África do Sul	Madikizela e Chimuka, 2017
	Água de Superfície	SPE/HPLC-DAD	0.753	0.007/0.021	Polónia	Baranowska e Kowalski, 2011
Cetoprofeno	Efluente ETE	SPE/GC-MS	0.08	0.01/---	Canadá	Lee <i>et al.</i> , 2005
	Água de Superfície	SPE/HPLC-DAD	0.258	0.004/0.013	Polónia	Baranowska e Kowalski, 2011
Diclofenaco	Efluente ETE	SPE/GC-MS	0.17	0.01/---	Canadá	Lee <i>et al.</i> , 2005
	Influente ETAR	SPE/HPLC-DAD	6.4-16	0.12/0.39	África do Sul	Madikizela e Chimuka, 2017
Paracetamol	Água de Superfície	SPE/GC-MS	0.0106-0.0723	---	França	Togola e Budzinski, 2008
	Água de Superfície	SPE/HPLC-DAD	0.073-0.021	0.007/0.020	Polónia	Baranowska e Kowalski, 2011
	Influente ETAR	SPE/LC-MS-ESI(+)	38.9	---/0.9	Arábia Saudita	Shraim <i>et al.</i> , 2017
Aspirina	Água de Superfície	SPE/HPLC-DAD	0.368	0.183/0.548	Polónia	Baranowska e Kowalski, 2011
Carbamazepina	Água de Superfície	SPE/HPLC-DAD	---	0.029/0.086	Polónia	Baranowska e Kowalski, 2011
	ETAR	SPE/HPLC-DAD/MS (ESI+)	0.002-0.007	2/7	Portugal	Salgado <i>et al.</i> , 2010

3.3 Validação do Método Analítico

Após o processo de desenvolvimento e otimização das condições de operação no processo de extração e das condições de operação do método de análise, é necessário validar toda a metodologia experimental desenvolvida. (Becker, 2012)

Neste trabalho, pretende-se validar uma metodologia baseada na técnica de extração por SPE seguida de análise por cromatografia em fase líquida com detetor de arranjo de díodos (HPLC-DAD). A validação desta metodologia é realizada através da determinação das recuperações obtidas no processo de extração por SPE e na determinação dos parâmetros estatísticos associados com o método de análise por HPLC-DAD. Para isso, determinam-se as curvas de calibração e respetivos erros associados, baseados numa distribuição *t de Student* com um nível de significância de 95%. Todas as equações envolvidas e cálculos realizados na validação do método analítico, como sejam os valores de recuperação, curvas de calibração, limites de deteção e quantificação, estudos de repetibilidade e reprodutibilidade encontram-se descritos na seção dos anexos.

4. Descrição Experimental

Este trabalho divide-se em duas etapas experimentais principais. Na primeira etapa, será otimizado um método de extração em fase sólida e um método de deteção e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de arranjo de díodos para fármacos pertencentes a diferentes classes farmacêuticas, como sejam, anti-inflamatórios não esteróides, antibióticos, analgésicos, anticonvulsionantes e estimuladores do sistema nervoso central. Na segunda etapa realiza-se a validação da metodologia experimental desenvolvida, implementando-a na monitorização de fármacos em amostras aquosas reais de diferentes pontos da região de Bragança.

4.1 Reagentes

Como solventes para a preparação dos padrões analíticos dos diferentes fármacos analisados utilizou-se água ultrapura (W) obtida utilizando um sistema de purificação Direct-Q® 3UV da marca Milli-Q (Millipore), acetonitrilo (ACN) e metanol (MeOH) ambos para HPLC da marca Carlo Erba (+99.9%), ácido trifluoroacético (TFA) e dietilamina (DEA), ambos da marca Sigma-Aldrich (+95%).

As características dos reagentes usados para preparação dos padrões analíticos utilizados encontram-se descritas na Tabela 4.

Tabela 4. Características dos 10 reagentes usados para preparar os padrões analíticos.

Classe Terapêutica	Composto	Pureza (%)	CAS Nº	Marca
Anti-inflamatório	Ibuprofeno	+99	15687-27-1	Alfa-Aesar
Anti-inflamatório	Diclofenaco	+95	15307-79-6	Alfa-Aesar
Anti-inflamatório	Naproxeno	+95	22204-53-1	Alfa-Aesar
Anti-inflamatório	Cetoprofeno	+98	22071-15-4	Sigma-Aldrich
Anti-inflamatório	Aspirina	+99	50-78-2	Alfa-Aesar
Antibiótico	Sulfametoxazol	+98	723-46-6	Sigma-Aldrich
Antibiótico	Azitromicina	+98	117772-70-0	Sigma-Aldrich
Analgésico	Paracetamol	+98	103-90-2	Alfa-Aesar
Estimulante do SNC	Cafeína	+99	58-08-2	Alfa-Aesar
Anticonvulsionante	Carbamazepina	+97	298-46-4	Sigma-Aldrich

4.2 Equipamento

Para identificação e quantificação dos padrões analíticos de cada fármaco, foi utilizado um sistema de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) da marca Jasco (série Extreme), acoplado com um detetor DAD, modelo DAD-MD-4010, uma bomba modelo PU-4180 RHPLC e um injetor manual da marca Rheodyne com um volume de injeção de 20 μL (ver Figura 15). Utilizaram-se duas colunas cromatográficas analíticas com um diâmetro de partícula de 5 μm : uma coluna Nucleosil 100-5 C18 da Macherey-Nagel (150 mm x 4.6 mm), e uma coluna SiliaChrom XT C18 da Silicycle (250 mm x 4.6 mm). O fabricante da primeira coluna recomenda uma gama de pH de trabalho de 2 a 8 valores e o da segunda coluna refere uma gama de pH de 1 a 12 (folhas de especificações na secção dos anexos). O caudal utilizado em todas as análises cromatográficas foi de 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.



Figura 15. Sistema de HPLC-DAD, Jasco utilizado na análise de fármacos.

Para a extração em fase sólida (SPE) foi utilizado o sistema Visiprep™ SPE Vacuum Manifold da Supelco, apresentado na Figura 16, e cartuchos CHROMABOND® HLB (60 μm) de 6 mL, com 500 mg de enchimento de *poli(divinilbenzeno-co-N-vinilpirrolidona)*.

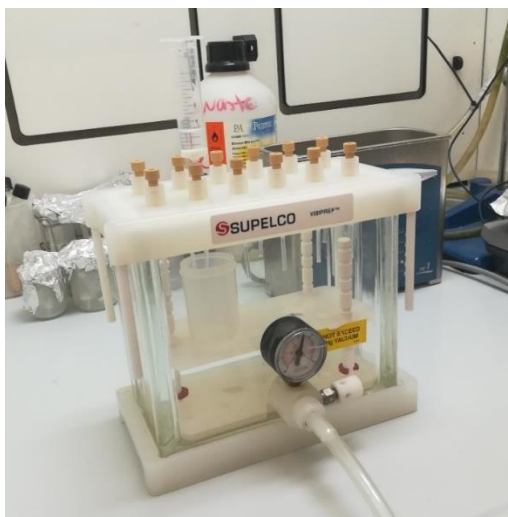


Figura 16. Sistema de SPE utilizado na extração de fármacos.

4.3 Metodologia Experimental

Para a determinação e quantificação de fármacos, são enumerados na literatura diferentes métodos analíticos, normalmente válidos para matrizes biológicas como sangue, tecido e urina. Contudo, algumas alterações nestes métodos são normalmente suficientes para amostras ambientais.

A partir da revisão bibliográfica verifica-se que a maioria das separações de fármacos por cromatografia líquida utiliza colunas de enchimento com uma fase estacionária C18. Alguns exemplos destas colunas C18 são a Shim-pack VP ODS da Shimadzu, a coluna XDB-C18 e a coluna Kinetex C18. Este tipo de colunas C18 são as mais comuns, provavelmente pelo facto de serem consideravelmente mais económicas. Este enchimento é compatível com valores de pH compreendido entre 2 e 8. Assim, decidiu-se começar os estudos de otimização do método cromatográfico com uma coluna Nucleosil 100-5 C18 da Macherey-Nagel.

Em relação às fases móveis utilizadas verifica-se que são, em geral, uma mistura entre água e acetonitrilo ou água e um álcool como o metanol ou o etanol (cromatografia em fase reversa). Quase todos os estudos encontrados referem a utilização de uma fase móvel com um modificador ácido (pH próximo de 3). Deve-se referir que a partir de alguns dados da literatura foram selecionadas as condições de operação iniciais de operação em HPLC para a otimização da

separação cromatográfica do conjunto dos 10 fármacos. Utilizou-se como fase móvel diferentes misturas entre acetonitrilo e água. Na fase inicial de otimização da composição de solvente, apresenta-se também um estudo da influência do valor de pH na separação cromatográfica, fazendo variar o valor de pH pela incorporação de diferentes quantidades de um modificador ácido (o ácido trifluoroacético).

Destes estudos prévios de resolução dos 10 fármacos, retiram-se os valores dos tempos de retenção individuais e simultaneamente os valores do comprimento de onda que maximizam o valor de absorvância para cada fármaco.

Depois destes estudos preliminares e devido às grandes diferenças nos valores de pKa dos 10 fármacos, decidiu-se separar os fármacos em dois grupos distintos. O primeiro grupo composto pelos anti-inflamatórios não esteróides, ou seja, compostos com pKa inferior a 5 e o segundo grupo composto por azitromicina, carbamazepina, cafeína, paracetamol e sulfametoxazol, ou seja, os compostos com pKa superior a 5. Este trabalho foca-se essencialmente em estudos realizados para o segundo grupo. O desenvolvimento de uma metodologia analítica semelhante para o primeiro grupo foi já realizada num trabalho de mestrado prévio (Nemoto, 2019). Aproveitando-se assim algumas das conclusões retiradas do estudo para o primeiro grupo, desenvolveu-se igualmente um método de gradiente de solvente na mesma coluna C18, utilizando um valor de pH de 2.5 para o segundo grupo.

De seguida, trocou-se a coluna analítica para uma coluna que permite trabalhar com valores de pH superiores a 8 e otimizou-se a separação cromatográfica do segundo grupo. Atendendo a que no final do processo de extração por SPE as amostras se encontram em metanol, decidiu-se estudar uma composição de solvente baseada em misturas água:metanol e utilizando um modificador alcalino (dietilamina) para fixar o valor de pH num valor superior a 8.

Apresenta-se, ainda, um estudo da influência na pressão do sistema cromatográfico da percentagem de metanol na mistura metanol:água. De seguida, escolhe-se uma molécula/fármaco que serve como referência (paracetamol) e estuda-se a dispersão e retenção obtida para as várias

composições metanol:água. Apresenta-se também um estudo da separação utilizando diferentes gradientes de solvente. Depois da seleção da composição do solvente e modo de operação (isocrático ou de gradiente), recolhem-se os valores dos tempos de retenção e do comprimento de onda para o qual o valor de absorvância de cada composto é máximo. Numa fase posterior, apresenta-se a influência do teor de dietilamina no valor de pH do solvente e seleciona-se a percentagem de modificador alcalino que minimize a dispersão e que simultaneamente mantenha um valor de pelo menos 2 unidades de pH abaixo do valor máximo recomendado pelo fabricante.

Na segunda parte do desenvolvimento do método, apresentam-se as condições de operação utilizadas e os estudos de eficiências de extração com os dois tipos de coluna e com a fase móvel selecionada correspondente.

Na terceira parte, apresentam-se os estudos referentes à validação do método que incluem as curvas de calibração individuais, os limites de deteção e quantificação e os estudos de repetibilidade e reprodutibilidade.

Finalmente, de forma a validar o método analítico, foram recolhidas 10 amostras de água de diferentes origens e locais: 8 provenientes do distrito de Bragança (Rio Sabor, Rio Onor, Rio Fervença, Piscina Municipal de Bragança, água da torneira da rede de distribuição municipal de Bragança e água à saída da ETAR de Bragança) e 2 do distrito do Porto (Rio Sousa e um Ribeiro). Os resultados apresentados para a implementação da metodologia experimental foram obtidos com a análise das amostras das diferentes matrizes aquosas recolhidas no distrito de Bragança.

5. Resultados e Discussão

Como já foi referido na seção da metodologia experimental, realizou-se numa primeira fase a otimização das condições operatórias em HPLC-DAD utilizando duas colunas com uma fase estacionária C18, mas com diferentes gamas de compatibilidade com o valor de pH da fase móvel.

Na segunda etapa experimental realizam-se análises de extração em fase sólida (SPE), cujas amostras são de seguida analisadas nos dois tipos de colunas utilizadas e com o método de separação e quantificação otimizado para cada coluna. Nesta etapa, realiza-se a seleção de um grupo de compostos cujos valores de pKa são superiores a 5 de forma a uma otimização mais eficiente da separação cromatográfica obtida.

Numa terceira etapa, após a validação da metodologia analítica para este grupo de compostos, realizam-se análises de extração em fase sólida, cujas amostras são de seguida analisadas com o método de cromatografia líquida otimizado.

Na etapa final, apresentam-se os principais parâmetros estatísticos que permitem validar o método analítico e as análises utilizadas para implementar o método utilizando amostras recolhidas em diferentes meios hídricos do distrito de Bragança.

5.1 Análise de fármacos por HPLC-DAD utilizando uma fase móvel ácida

5.1.1 Otimização da composição da fase móvel

A revisão bibliográfica permite verificar que a maior parte dos estudos publicados usam como fase móvel, para a análise de fármacos em matrizes aquosas, diferentes proporções ou gradientes de acetonitrilo (ACN) e água (W) acidificada com um modificador ácido com o ácido acético (Campos-Mañas *et al.*, 2017; Durigan *et al.*, 2012; Pedroso, 2007; Colaço, 2013). No nosso grupo de trabalho existe um trabalho recente em que se desenvolveu uma metodologia experimental para a análise de fármacos em matrizes hídricas. Tendo por base

o conhecimento já desenvolvido, iniciou-se a otimização da fase móvel em condições semelhantes às apresentadas nesse trabalho (Nemoto, 2019). Assim, numa primeira etapa, realizou-se o estudo do efeito da composição da fase móvel na dispersão cromatográfica e no tempo de retenção dos fármacos. Para este estudo utilizou-se uma coluna analítica Nucleosil 100-5 C18 compatível com uma gama de pH entre 2 e 8 unidades. Por uma questão de simplicidade, selecionou-se o cetoprofeno, como “composto padrão”, tendo-se preparado uma solução padrão com uma concentração de 100 mg.L^{-1} , utilizando como solvente a mesma composição da fase móvel (modo isocrático). Foram testadas três composições de fase móvel (40, 50 e 60% de acetonitrilo em água), sem utilização de modificador ácido. A análise dos resultados obtidos, apresentados na Figura 17, permite verificar que quanto maior a percentagem de acetonitrilo na fase móvel, maior é a intensidade do sinal obtido, menor é a dispersão e menor é a retenção apresentada pelo cetoprofeno. Assim, decidiu-se selecionar uma fase móvel constituída, em volume, por 60% de acetonitrilo e 40% de água (60ACN:40W).

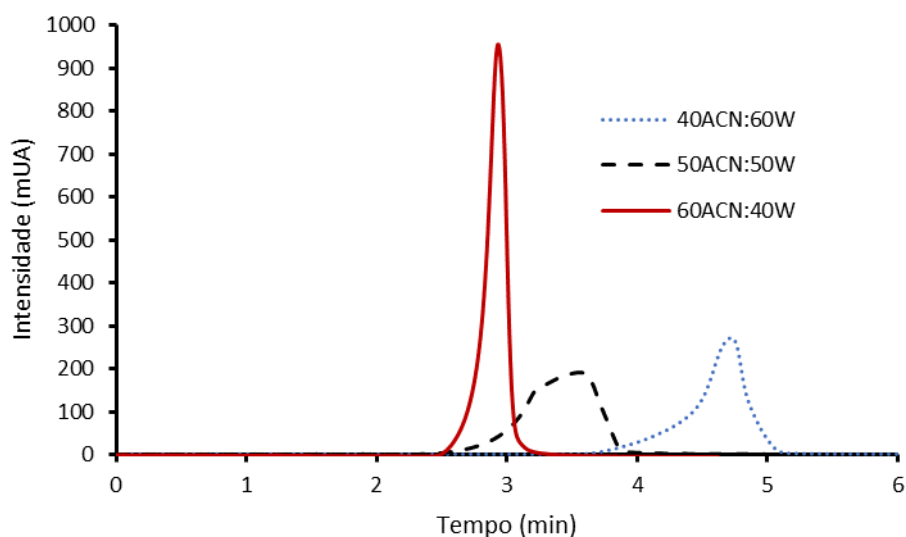


Figura 17. Efeito da composição de solvente, misturas acetonitrilo (ACN) e água (W), na análise cromatográfica de uma solução padrão de cetoprofeno a 100 mg.L^{-1} .

Depois da seleção da fase móvel, procedeu-se ao estudo do efeito da adição de pequenas quantidades de um modificador ácido (ácido trifluoroacético, TFA) no valor do pH da fase móvel composta por 60ACN:40W:TFA. Os resultados de pH obtidos são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Influência da percentagem de TFA no valor do pH (fase móvel, 60ACN:40W).

% TFA	pH	T (°C)
0	8.19	16.4
0.001	3.46	20.5
0.005	2.57	17.2
0.01	2.50	20.4
0.02	2.32	16.6
0.03	2.19	16.6
0.04	2.09	16.9
0.05	2.02	17.1
0.1	1.66	20.4

Analisando estes resultados, conclui-se que a não utilização de modificador ácido, corresponde a um valor de pH de 8, a utilização de 0.001% de TFA representa um valor de pH de cerca de 3.5 e que utilizando 0.01% de TFA obtém-se um valor de pH de 2.5, que já é muito próximo do limite inferior de pH (pH=2) para o enchimento desta coluna.

Com o objetivo de escolher o valor mais apropriado de pH, decidiu-se realizar 3 análises da mesma solução de cetoprofeno com uma concentração de 100 mg.L⁻¹ com a fase móvel selecionada de 60ACN:40W, com percentagens de TFA de 0, 0.01 e 0.1%. Os cromatogramas obtidos estão representados, de uma forma sobreposta, na Figura 18.

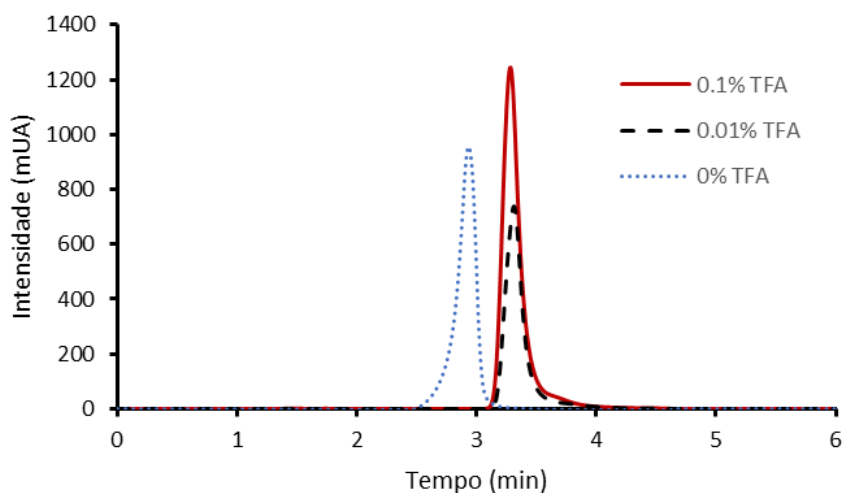


Figura 18. Estudo do efeito da composição em TFA numa fase móvel 60ACN:40W:TFA na análise cromatográfica de Cetoprofeno.

Estes resultados experimentais permitem verificar que a adição de TFA é benéfica em termos de dispersão e de intensidade de sinal obtidos na análise de cetoprofeno e provavelmente na análise dos restantes fármacos. Contudo, como já seria de esperar representa um pequeno aumento na retenção deste fármaco que tem um valor de pKa inferior a 5. Assim, a um pH inferior a 3 estará maioritariamente na sua forma não ionizada sendo menos polar (mais hidrofóbico) e por isso mais retido num sistema em fase reversa. A adição de 0.1%TFA representa os melhores resultados em termos de sinal obtido, contudo implica trabalhar com um valor de pH de 1.7, ligeiramente inferior ao limite de pH de 2 aconselhado pelo fabricante. Deste modo optou-se pela utilização de 0.01%TFA já que se obtém uma separação muito equivalente em termos de dispersão e de retenção.

5.1.2 Identificação do tempo de retenção e escolha do comprimento de onda para a análise de cada fármaco

Após a preparação dos 10 padrões analíticos individuais em metanol, com uma concentração de 100 mg.L^{-1} , procedeu-se à sua análise por HPLC-DAD de forma a identificar o seu tempo de retenção e escolher os comprimentos de onda “ótimos”, ou seja, o comprimento de onda para o qual a absorvância é máxima.

As condições operatórias utilizadas no sistema de HPLC-DAD foram as seguintes: caudal constante de 1 mL.min^{-1} , fase móvel com a composição

60ACN:40W:0.01TFA e varrimento do comprimento de onda entre 190 e 650 nm, sendo cada análise realizada em duplicado. Os cromatogramas obtidos nestas análises estão representados na Figura 19, sobrepostos de forma a uma melhor comparação em termos de tempos de retenção, dispersão e intensidade de sinal.

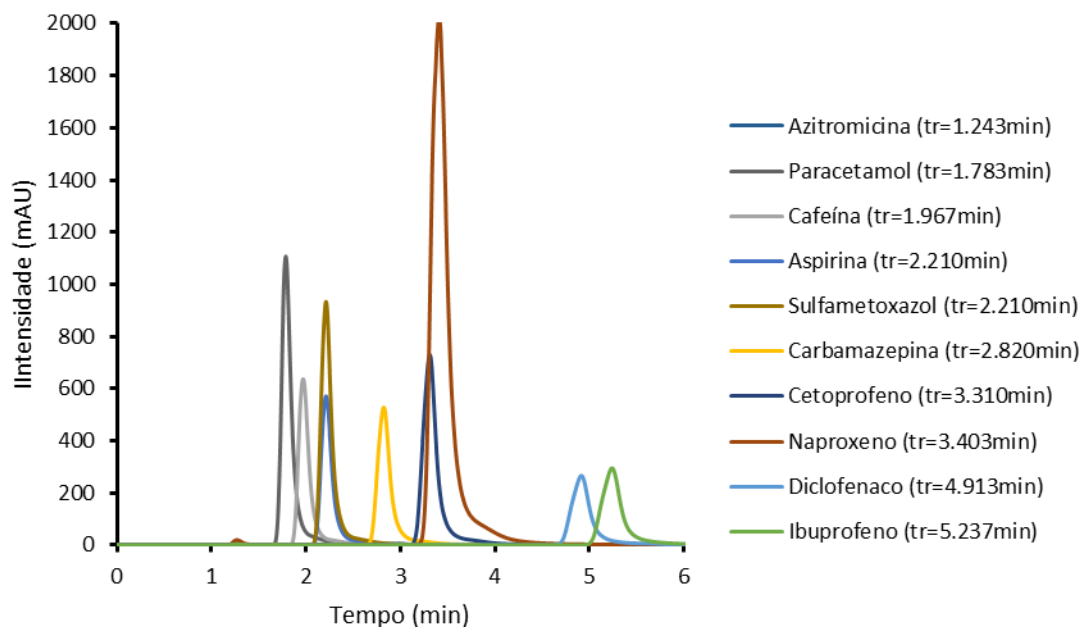


Figura 19. Análise de 10 padrões individuais de fármacos com uma concentração de 100 ppm por HPLC-DAD. Sobreposição dos cromatogramas obtidos na análise dos padrões individuais.

Na Tabela 6 encontram-se, para cada composto, o comprimento de onda selecionado, assim como o tempo de retenção obtido.

Tabela 6. Comprimento de onda correspondente ao valor máximo de absorvância e tempo de retenção para cada fármaco.

Ordem de Eluição	Fármaco	Comprimento de onda (nm)	Tempo de retenção (min)
1	Azitromicina	198	1.243
2	Paracetamol	245	1.783
3	Cafeína	272	1.967
4	Aspirina	224	2.210
5	Sulfametoxazol	268	2.210
6	Carbamazepina	284	2.820
7	Cetoprofeno	254	3.310
8	Naproxeno	224	3.403
9	Diclofenaco	275	4.913
10	Ibuprofeno	219	5.237

Analisando simultaneamente os dados apresentados na Figura 19 e na Tabela 6, verifica-se que a azitromicina tem um máximo de absorção a 198 nm e que esse valor é bastante inferior à intensidade do sinal obtido para todos os outros fármacos, pelo que se torna difícil, se não mesmo impossível, a sua deteção/quantificação para valores de concentração na ordem dos ng.L^{-1} . O valor de 198 nm é muito próximo do valor de cut-off dos solventes utilizados (190 nm para o acetonitrilo e 180 nm para a água) pelo que poderá existir sobreposição de picos.

Ao analisar os cromatogramas obtidos verifica-se que existem diversos fármacos com tempos de retenção muito próximos e que apesar da utilização de modificador ácido continua a existir alguma dispersão, principalmente na cauda final dos picos cromatográficos. Assim, será necessário proceder a uma otimização desta separação utilizando, por exemplo, o modo de gradiente de composição de solvente. Outra solução passará por desenvolver um método analítico para compostos com valores de pKa mais baixos (os anti-inflamatórios) e outro método analítico para os fármacos que têm valores de pKa mais elevados (ou seja, superiores a 5).

Resolveu-se nesta etapa dos trabalhos experimentais, dividir o conjunto de 10 fármacos em dois grupos distintos. No primeiro grupo colocaram-se os

fármacos com um valor de pKa inferior a 5, ou seja, o ibuprofeno, o cetoprofeno, a aspirina, o diclofenaco e o naproxeno. No segundo grupo colocaram-se o paracetamol, a azitromicina, o sulfametoxazol, a carbamazepina e a cafeína. Deve-se referir que neste trabalho se apresentam todos os estudos efetuados para o desenvolvimento de um método de análise completo para os fármacos do grupo 2.

5.1.3 Análise da mistura de fármacos com pKa superior a 5

A fase móvel para análise dos 10 padrões analíticos, ibuprofeno, diclofenaco, naproxeno, cetoprofeno, aspirina, sulfametoxazol, azitromicina, paracetamol, cafeína e carbamazepina, foi preparada adicionando-se 300 mL de acetonitrilo (ACN) a 200 mL de água ultrapura (W) e 50 μ L de TFA, na proporção volumétrica de 60ACN:40W:0.01TFA.

Como o objetivo nesta etapa experimental é encontrar as condições ótimas de operação em HPLC-DAD para a separação do conjunto dos 5 fármacos (azitromicina, paracetamol, cafeína, sulfametoxazol e carbamazepina), preparou-se uma solução mistura padrão em 60ACN:40W:0.01TFA contendo todos os 5 fármacos numa concentração de 10 mg.L⁻¹.

De seguida, analisou-se a mistura padrão dos fármacos com a mesma composição de solvente: 60ACN:40W:0.01TFA. Na Figura 20 encontram-se os cromatogramas obtidos utilizando um caudal de 1 mL.min⁻¹, para 4 comprimentos de onda diferentes. O equipamento utilizado permite selecionar até um máximo de 4 canais individuais para os comprimentos de onda, assim sendo selecionaram-se 4 comprimentos de onda médios entre 202 nm e 280 nm.

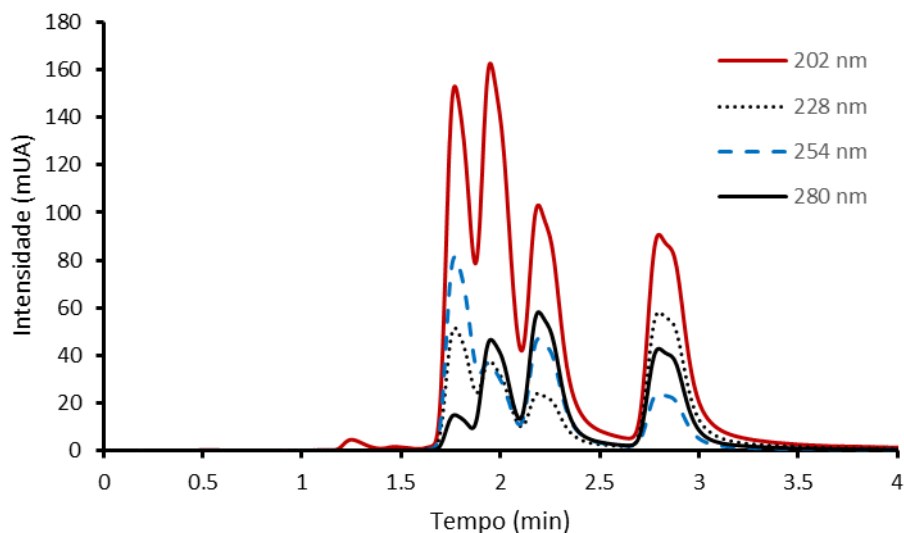


Figura 20. Análise por HPLC-DAD de uma mistura dos 5 fármacos com uma concentração de 10 ppm a diferentes comprimentos de onda.

Pode-se verificar por estes resultados, que a composição da fase móvel utilizada na análise de profenos (Nemoto, 2019) não é a mais apropriada para a análise do grupo de compostos propostos para este estudo (atrás referido como “grupo 2”). Não existe resolução suficiente para se realizar a quantificação de cada um destes fármacos.

Assim, realizaram-se testes em modo de gradiente de solvente com o objetivo de melhorar a separação dos 5 fármacos, na mesma coluna e com um solvente baseado em diferentes misturas acetonitrilo:água com 0.01%TFA.

5.1.4 Estudos com gradiente de solvente

De modo a melhorar a qualidade da separação (aumento de resolução), foram testados 3 gradientes diferentes, descritos na Tabela 7. Para este estudo utilizou-se a mesma solução padrão contendo os 5 fármacos numa concentração individual de 10 mg.L^{-1} . O caudal utilizado foi de 1 mL.min^{-1} . Os resultados destas análises em modo gradiente de solvente estão apresentados na Figura 21. Refira-se que se utilizou uma composição de 0.01%TFA constante, pelo que o valor de pH é constante ao longo de todo o gradiente.

Tabela 7. Condições experimentais para os gradientes de solvente estudados.

	Tempo (min)	ACN (%)	W (%)
Gradiente 1	0	20	80
	5	25	75
Gradiente 2	0	20	80
	5	25	75
	10	30	70
	15	35	65
	20	40	60
Gradiente 3	0	20	80
	10	30	70
	20	50	50

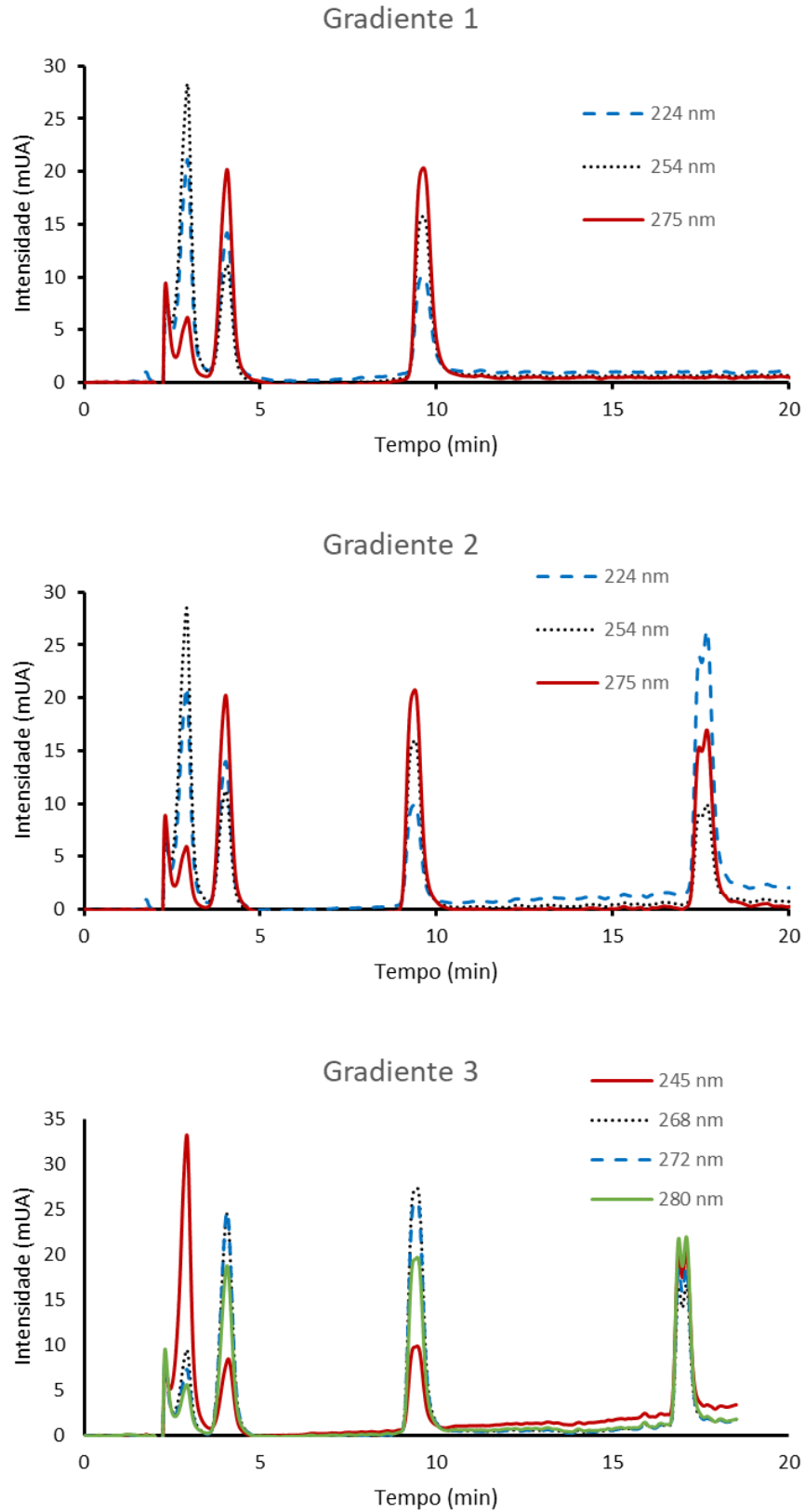


Figura 21. Separação por HPLC-DAD da mistura de 5 fármacos a 10 mg.L^{-1} para os três gradientes estudados (ver Tabela 7).

Analisando os cromatogramas apresentados na Figura 21 é possível entender que no primeiro gradiente ainda não existe separação total de todos os compostos, no gradiente 2 praticamente já não existe sobreposição, mas de forma a diminuir o tempo de retenção desenvolveu-se ainda um terceiro gradiente conseguindo-se esse objetivo ainda que de forma ligeira.

Nesta etapa do trabalho decidiu-se utilizar um solvente com um pH elevado e também uma nova coluna cromatográfica, uma vez que a primeira coluna utilizada tem um limite superior que não deve ultrapassar o valor de pH=8 e será mais adequado trabalhar com um pH muito próximo ou até um pouco superior a esse valor para os fármacos de carácter básico.

5.2 Análise de fármacos por HPLC-DAD utilizando uma fase móvel alcalina

Nesta etapa foi necessário dividir o trabalho experimental devido à restrição que a coluna cromatográfica possui em relação à gama de pH permitida. Assim são apresentados os resultados experimentais para os fármacos com pKa superior a 5 unidades (azitromicina, paracetamol, cafeína, sulfametoxazol e carbamazepina).

O novo método analítico é desenvolvido utilizando uma coluna cromatográfica *SiliaChrom*[®] XT C18, a qual possui uma gama de operação de pH de 1 a 12 (a folha de especificações encontra-se na secção dos anexos).

5.2.1 Otimização da composição da fase móvel

Na literatura podem-se também encontrar alguns estudos para a separação de fármacos nos quais é referida a utilização de uma fase móvel composta por metanol e água em diferentes proporções (Ibáñez *et al.*, 2017, Rodrigues, 2011, Baranowska e Kowalski, 2011).

Assim, numa primeira etapa experimental decidiu-se confirmar, por questões de segurança, se a utilização de uma mistura água e metanol significa quedas de pressão significativas na nova coluna utilizada. O fabricante refere uma pressão máxima de 400 bar. As medidas de pressão em função de várias

composições de fase móvel utilizadas, utilizando um caudal constante de 1 mL.min⁻¹, encontram-se descritas na Tabela 8 e a sua representação gráfica é apresentada na Figura 22. Realizaram-se análises para otimizar a composição da fase móvel para utilizar na separação do grupo de 5 fármacos. Para estes estudos utilizou-se uma solução padrão de paracetamol (fármaco utilizado como “composto padrão”) e uma solução padrão com a mistura dos 5 fármacos. Ambas as soluções padrão foram preparadas em metanol e com uma concentração individual de 100 mg.L⁻¹.

Tabela 8. Estudo da influência da composição da fase móvel (misturas metanol:água) na pressão do sistema HPLC-DAD utilizado.

% Metanol	% Água	Pressão (MPa)
100	0	6.7
90	10	9.4
85	15	10.9
80	20	12.6
75	25	13.6
70	30	14.7
65	35	15.7
60	40	17.5
50	50	18.4
40	60	18.6
30	70	16.4
20	80	15.2
10	90	12.6

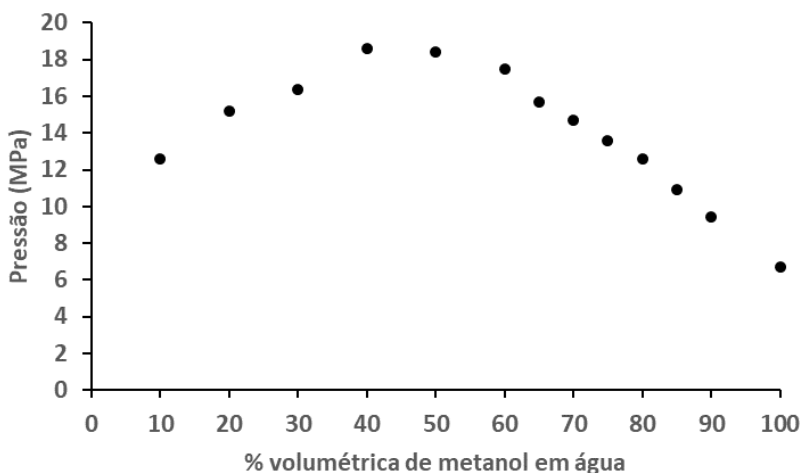


Figura 22. Valores experimentais de pressão (MPa) em função da porcentagem volumétrica de metanol em água.

Verifica-se que a pressão do sistema cromatográfico aumenta à medida que se adiciona água, mas depois diminui quando a porcentagem de água é bastante mais significativa que a de metanol. Isto acontece pois as moléculas de álcool em soluções aquosas exercem forte influência na estrutura da água e assim os sistemas álcool-água mostram conseqüentemente algumas anomalias em várias propriedades físicas (Kubota *et al.*, 1980). Esta influência pode ser verificada no gráfico da Figura 23 onde são representadas as viscosidades da mistura metanol-água a diferentes temperaturas e é possível constatar que a viscosidade aumenta até aproximadamente 30% de metanol, mas depois começa a diminuir.

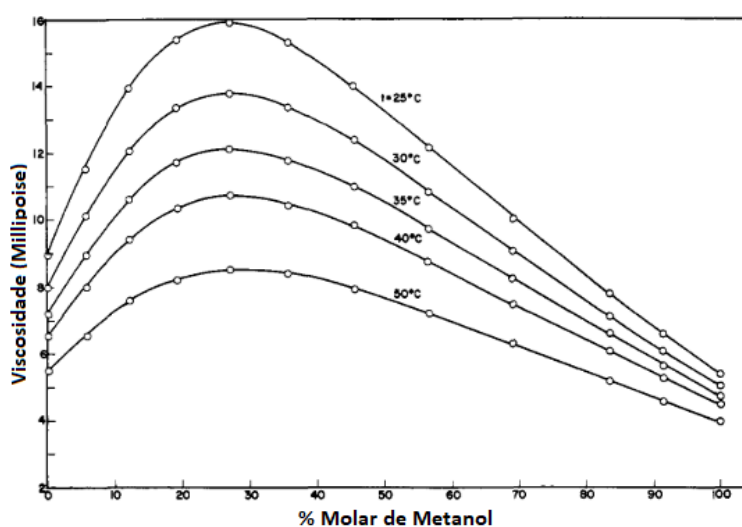


Figura 23. Viscosidades da mistura água-metanol em função da % molar de metanol. (Fonte: Mikhail & Kimel, 1961)

O mesmo acontece com a pressão registada experimentalmente através do sistema HPLC-DAD utilizado neste trabalho, como se pode observar na Tabela 8 e no gráfico da Figura 22.

Utilizando diferentes soluções padrão de paracetamol, preparadas com uma concentração de 100 mg.L^{-1} , e utilizando a própria composição de eluente como solvente, procedeu-se à sua análise utilizando as várias composições de solvente. Os resultados obtidos encontram-se representados nos cromatogramas mais representativos da Figura 24.

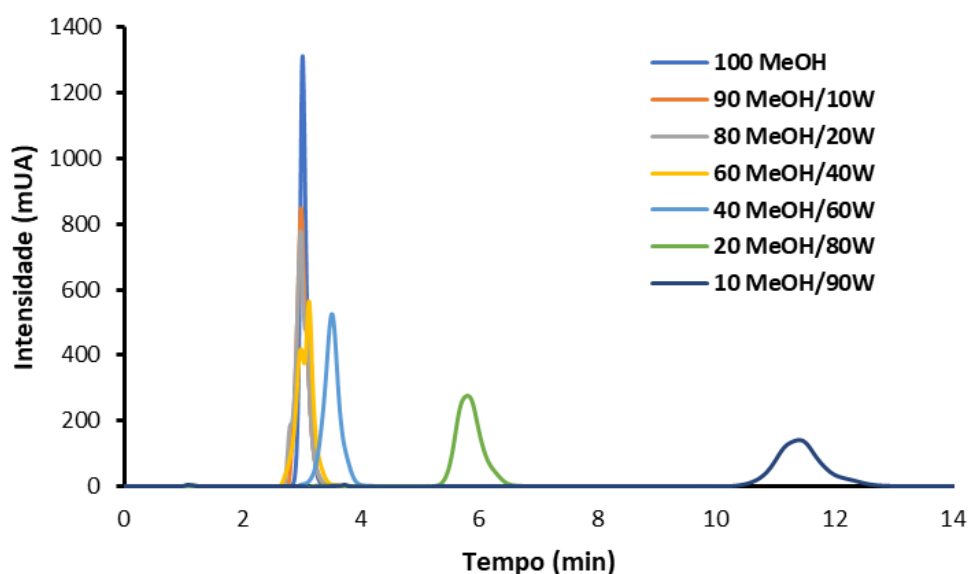


Figura 24. Análise por HPLC-DAD de uma solução de paracetamol com uma concentração de 100 ppm com diferentes composições de solvente metanol:água.

O pico é mais alto e estreito, ou seja, possui menos dispersão, quando se utiliza apenas metanol e vai ficando cada vez mais disperso com o aumento da composição em água. Pode verificar-se ainda que a partir de 40% metanol:60% água o paracetamol começa a ser significativamente mais retido.

Para analisar a separação dos compostos em estudo (azitromicina, carbamazepina, cafeína, paracetamol e sulfametoxazol), em função das composições de metanol/água na fase móvel, preparou-se, como já foi referido, uma solução padrão com a mistura dos 5 compostos em 100% de metanol com uma concentração individual de 100 mg.L^{-1} . Na Figura 25 é possível verificar o

comportamento da mistura padrão com as diferentes percentagens de metanol/água conforme as condições da Tabela 8.

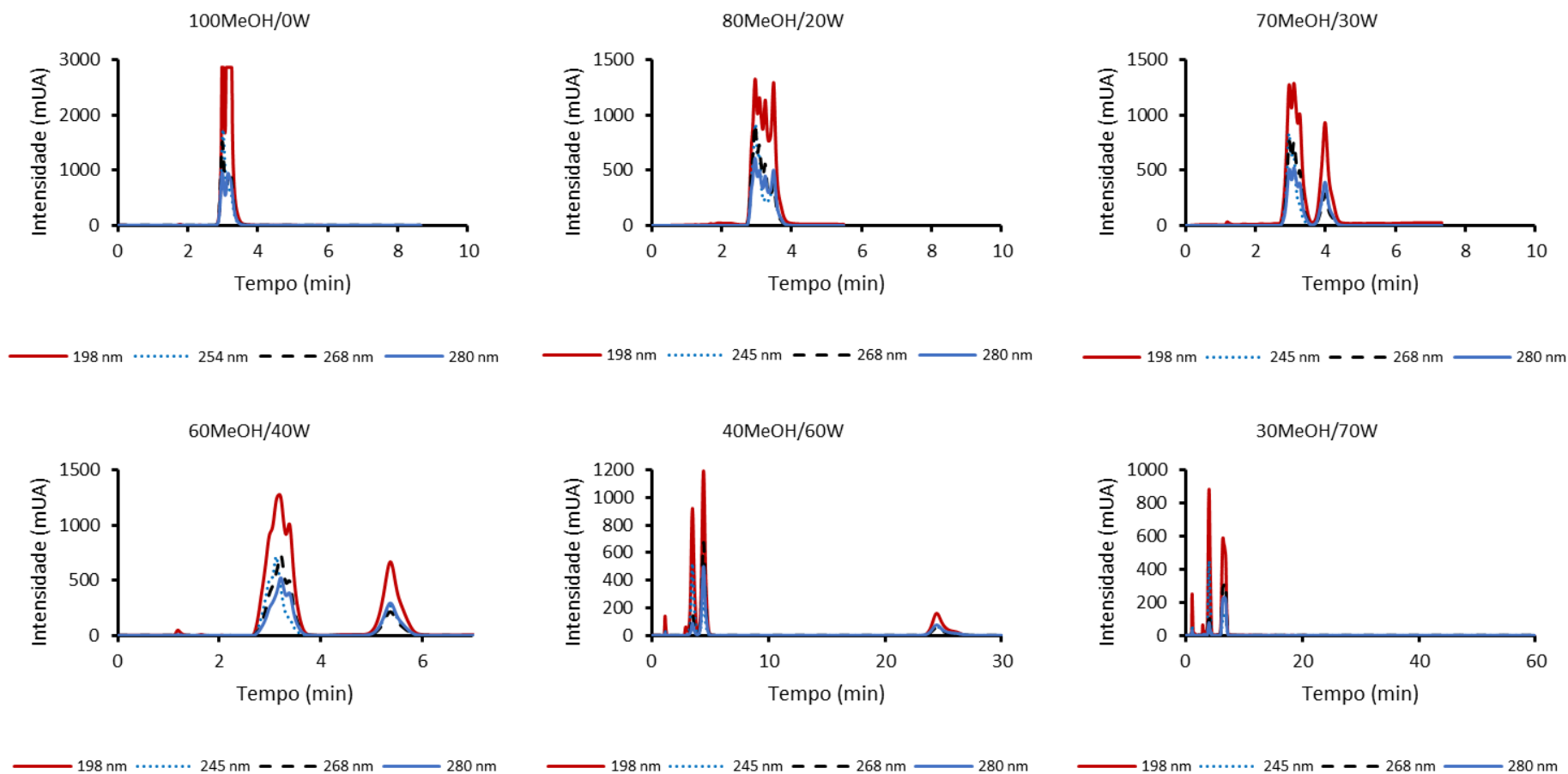


Figura 25. Separação por HPLC-DAD da mistura padrão contendo 5 fármacos (azitromicina, carbamazepina, cafeína, paracetamol e sulfametoxazol) em diferentes composições metanol:água com recolha de sinal utilizando 4 comprimentos de onda distintos.

Analisando a Figura 25 é possível verificar que com 100% metanol os compostos estão todos sobrepostos, não havendo qualquer tipo de separação. Esta sobreposição vai desaparecendo à medida que se aumenta a quantidade de água na fase móvel utilizada. Com uma fase móvel de 30%MeOH/70%W já não existe praticamente sobreposição dos compostos, mas em contrapartida o tempo de análise aumentou significativamente pois os compostos não saem todos em 60 minutos sendo necessário um tempo superior.

5.2.2 Identificação do tempo de retenção e escolha do comprimento de onda para a análise de cada fármaco

Depois da otimização da composição da fase móvel e da escolha do modo de operação de solvente procedeu-se à identificação do tempo de retenção e do comprimento de onda para a qual a absorvância de cada composto é máxima. Para isso foram preparados todos os padrões individuais (azitromicina, sulfametoxazol, carbamazepina, cafeína e paracetamol) em 100% de metanol com uma concentração de 100 ppm.

As fases móveis utilizadas para a identificação dos compostos foram de 30% metanol:70%água para os compostos com menor tempo de retenção (azitromicina, cafeína e paracetamol) e 60%metanol:40%água para os compostos mais retidos (sulfametoxazol e carbamazepina). Todas as análises foram realizadas com um caudal de 1 mL.min⁻¹. Os resultados obtidos encontram-se representados na Figura 26 e os respetivos tempos de retenção e comprimentos de onda escolhidos para a maximização do valor da absorvância são apresentados na Tabela 9.

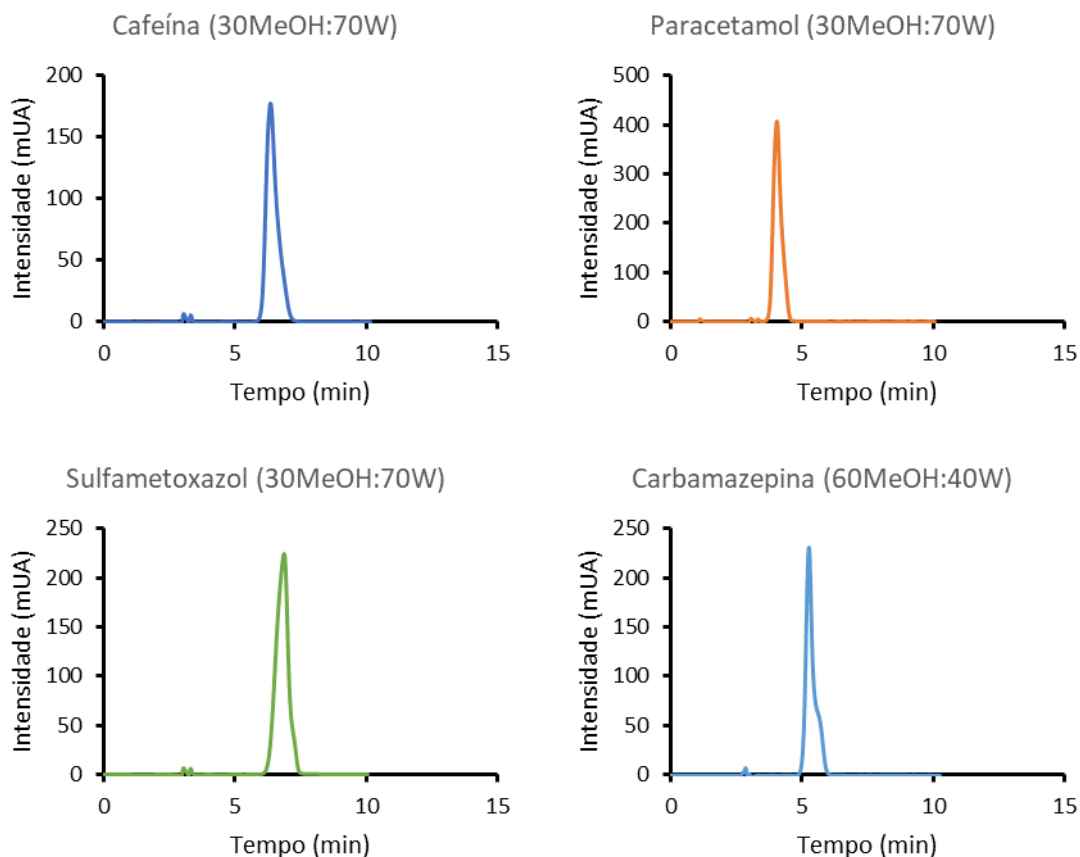


Figura 26. Análise por HPLC-DAD dos padrões a 100 ppm de cafeína, paracetamol e sulfametoxazol, numa fase móvel 30MeOH:70W e carbamazepina numa fase móvel 60MeOH:40W.

Tabela 9. Comprimento de onda ótimo correspondente ao valor máximo de absorvância e tempo de retenção para cada fármaco.

Composto	Comprimento de Onda (nm)	Tempo de Retenção (min)	Fase Móvel
Paracetamol	245	4.043	30 MeOH / 70W
Cafeína	272	6.360	30 MeOH / 70W
Sulfametoxazol	255	6.887	30 MeOH / 70W
Carbamazepina	280	5.267	60 MeOH / 40W

Para a identificação da azitromicina foi necessário proceder a mais algumas análises, uma vez que com as fases móveis utilizadas para os restantes compostos não era possível visualizar o sinal relativo a este composto, provavelmente devido à sua fraca intensidade. Assim, analisou-se a azitromicina com uma fase móvel de 100% metanol, um caudal de 1 mL.min⁻¹ e utilizando

diferentes comprimentos de onda. Os cromatogramas destas análises encontram-se representados na Figura 27.

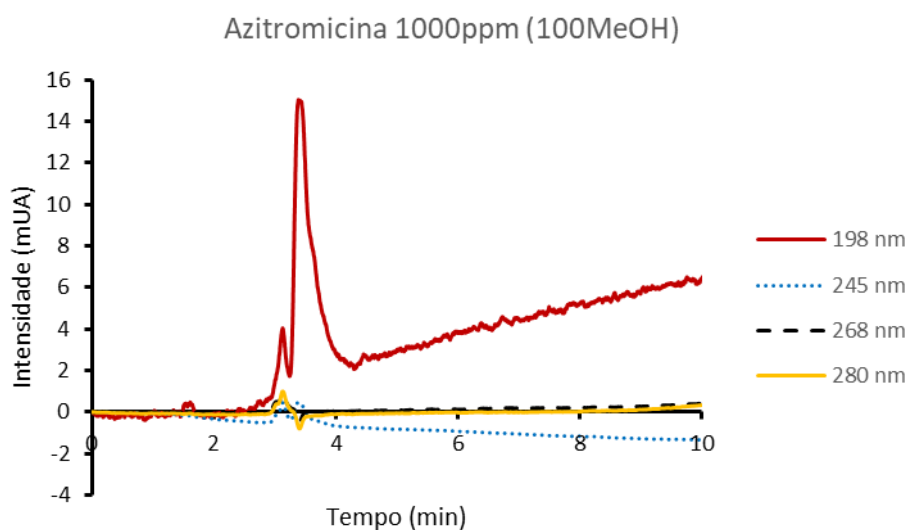


Figura 27. Análise obtida por HPLC-DAD para o padrão de azitromicina com concentração de 1000 ppm.

Pela análise da Figura 27, verifica-se que a azitromicina, utilizando uma fase móvel de 100% de metanol, apresenta uma intensidade de sinal mais forte para um comprimento de onda de 198 nm. Contudo, este sinal continua a ser demasiado fraco quando comparado com os sinais obtidos para os restantes compostos.

Analisando os resultados apresentados na Figura 26, verifica-se que todos os compostos apresentam alguma dispersão, mais significativa na cauda do pico cromatográfico. Para tentar ultrapassar este problema, optou-se por adicionar um pouco de modificador básico (dietilamina) à fase móvel.

5.2.3 Estudo da influência da adição do modificador alcalino

De forma semelhante ao que já foi apresentado para o estudo da introdução de um modificador ácido na fase móvel, procedeu-se à preparação de várias misturas metanol:água:dietilamina (DEA) de forma a se poder confirmar o valor de pH que estas representam. Na Tabela 10 encontram-se os valores do pH obtido em função das diferentes composições (em volume) de metanol, água e dietilamina.

Tabela 10. Valores de pH da fase móvel em função das diferentes percentagens de metanol, água e dietilamina.

%MeOH	%W	%DEA	pH	T (°C)
10	90	0	5.40	25.0
10	90	0.001	8.72	20.1
10	90	0.005	10.65	20.2
20	80	0	4.68	25.0
20	80	0.001	9.52	20.1
20	80	0.005	10.65	20.8
40	60	0	4.50	25.0
40	60	0.001	9.04	20.1
40	60	0.005	10.59	20.9
60	40	0	5.46	25.0
60	40	0.001	8.40	19.8
60	40	0.005	10.58	20.8
80	20	0	6.22	25.0
80	20	0.001	7.79	20.5
80	20	0.005	10.33	20.7
90	10	0	8.74	23.2
90	10	0.001	9.03	22.3
90	10	0.005	10.20	22.7
100	0	0	5.90	25.0
100	0	0.001	8.37	20.2
100	0	0.005	9.60	20.6

Pela análise destes resultados, pode-se concluir que a utilização de uma percentagem de 0.001% em DEA permite assegurar um valor de pH igual ou mesmo superior a 8. Este facto poderá garantir a não ionização dos fármacos seleccionados promovendo uma maior interação com a fase móvel, e consequentemente um pouco mais de retenção.

Para os estudos com dietilamina utilizaram-se os mesmos padrões individuais já preparados anteriormente em 100% de metanol com concentração de 100 ppm. Na Figura 28 encontram-se os cromatogramas obtidos por HPLC-DAD para o padrão de azitromicina com concentração de 1000 e 100 ppm analisados com uma fase móvel de 100%metanol:0.001% dietilamina e um caudal de 1 mL.min⁻¹. Comparando o cromatograma da Figura 28 com o da

Figura 27 é possível verificar que o pico obtido com dietilamina (saindo em aproximadamente 4 minutos) possui menos dispersão.

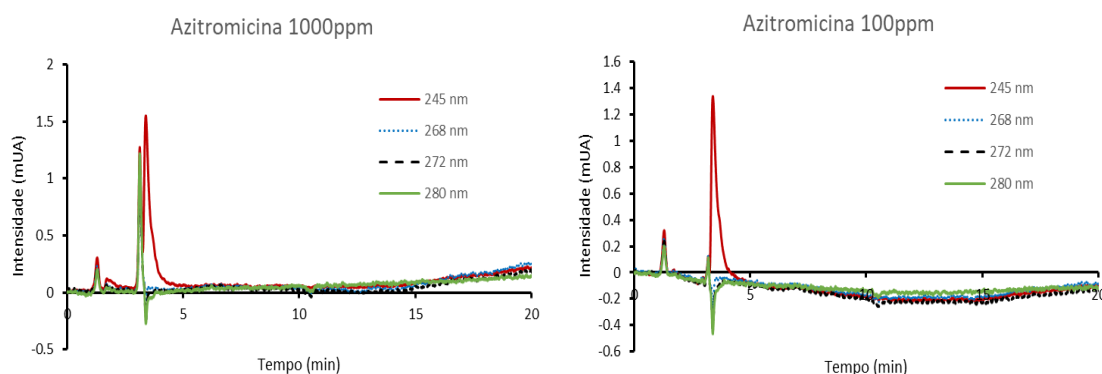


Figura 28. Padrão de Azitromicina com 1000 e 100 ppm com uma fase móvel de 100MeOH:0.001DEA.

Contudo, o sinal obtido continua a ter muito pouca intensidade, o que afetará todas as análises para este composto. Assim, concluiu-se que com esta fase móvel (metanol, água e dietilamina), e com esta coluna e condições cromatográficas, não será possível analisar a azitromicina com o mesmo rigor que os restantes compostos. Deste modo, decidiu-se não continuar a fazer análises com este composto, otimizando o método apenas com os restantes 4 fármacos (sulfametoxazol, paracetamol, cafeína e carbamazepina).

De seguida, preparou-se uma nova solução padrão com a mistura dos 4 compostos (paracetamol, cafeína, sulfametoxazol e carbamazepina) com uma concentração de 100 ppm utilizando metanol puro como solvente. A análise desta mistura padrão com várias proporções de metanol:água com 0.001% de dietilamina foi realizada para estudar a influência da adição do modificador alcalino na qualidade da separação cromatográfica. Os resultados desta análise encontram-se na Figura 29.

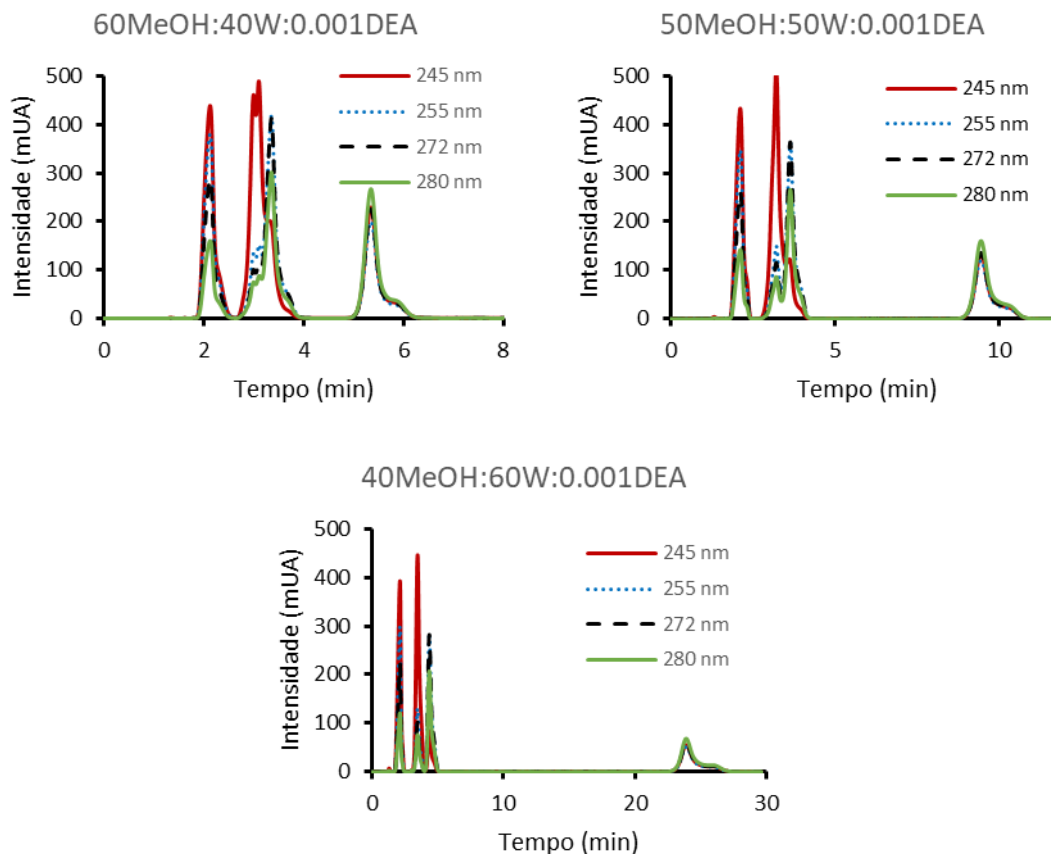


Figura 29. Análise obtida por HPLC-DAD da mistura padrão dos 4 compostos com concentração de 10 0ppm com diferentes fases móveis.

Verifica-se que o aumento do teor em água aumenta significativamente a retenção e com isso a resolução cromatográfica. Contudo, como se pode ver para um teor de 60% em água o tempo de análise aumenta demasiado. Para ultrapassar este problema, decidiu-se estudar um gradiente de solvente que possibilitasse a melhoria da separação e simultaneamente reduzisse o tempo total de análise.

5.3.4 Estudos com gradiente de solvente

Os estudos com gradiente de solvente foram realizados utilizando uma solução padrão com a mistura dos 4 fármacos com uma concentração individual de 100 mg.L^{-1} e um caudal constante de 1 mL.min^{-1} .

O primeiro gradiente a ser testado foi o gradiente 1, apresentado na Tabela 11. Os resultados obtidos com este gradiente encontram-se representados na Figura 30 onde é possível verificar que todos os compostos estão quase

separados, mas ainda existe uma pequena sobreposição devido a alguma dispersão apresentada em todos os picos cromatográficos, mais intensa nas suas caudas.

Tabela 11. Condições operatórias utilizadas no gradiente 1.

Tempo (min)	%Metanol	%Água	%DEA
0	40	60	0.001
6	60	40	0.001
12	60	40	0.001

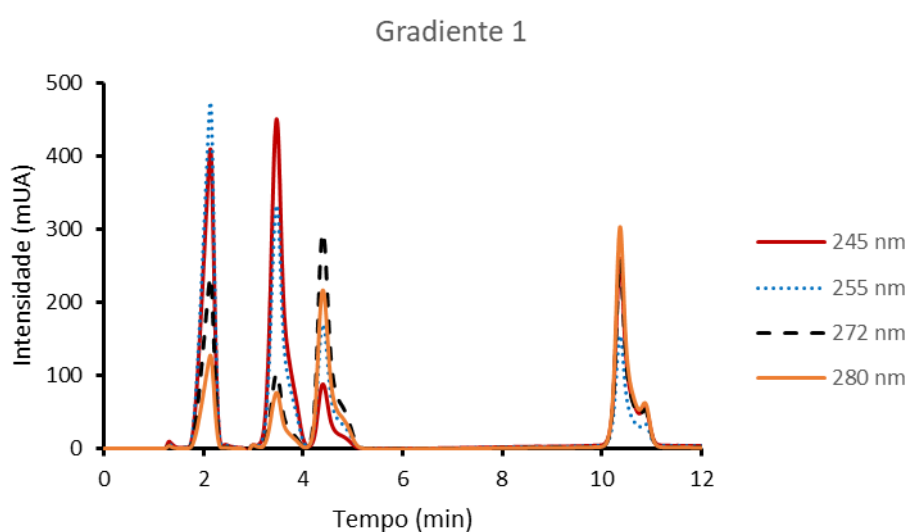


Figura 30. Análise por HPLC-DAD da uma mistura de 4 fármacos utilizando o gradiente 1 (ver Tabela 11).

Para se melhorar a resolução entre o segundo e o terceiro compostos mais retidos, estudou-se um segundo gradiente apresentado na Tabela 12. O cromatograma obtido com este gradiente encontra-se na Figura 31, podendo se verificar que com este gradiente já não existe sobreposição de compostos.

Tabela 12. Condições operatórias utilizadas no gradiente 2.

Tempo (min)	%Metanol	%Água	%DEA
0	35	65	0.001
5	70	30	0.001
10	70	30	0.001

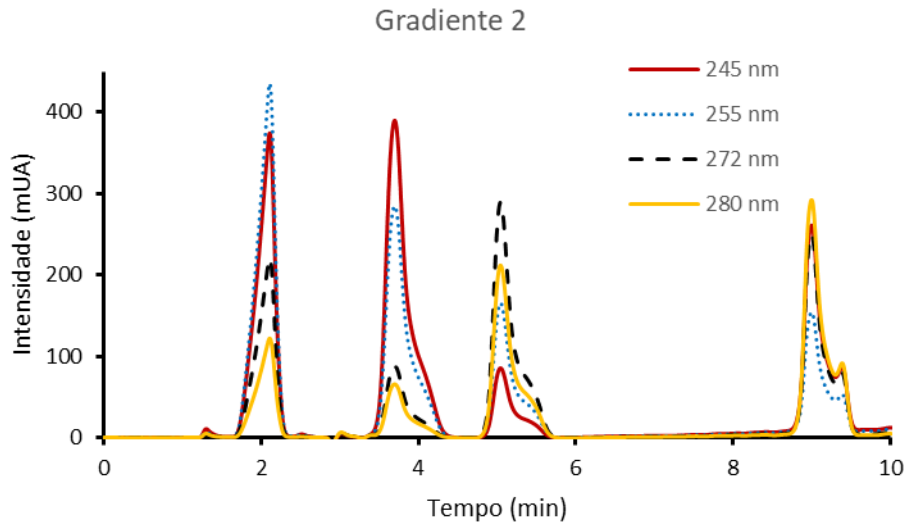


Figura 31. Análise de uma mistura de fármacos por HPLC-DAD com o gradiente 2 (ver Tabela 12).

Contudo, de modo a diminuir o tempo de análise testou-se um terceiro gradiente, apresentado na Tabela 13. O cromatograma obtido com este gradiente encontra-se representado na Figura 32, onde é possível verificar que o tempo de análise diminuiu ligeiramente.

Tabela 13. Condições operatórias utilizadas no gradiente 3.

Tempo (min)	%Metanol	%Água	%DEA
0	35	65	0.001
5	75	25	0.001
10	75	25	0.001

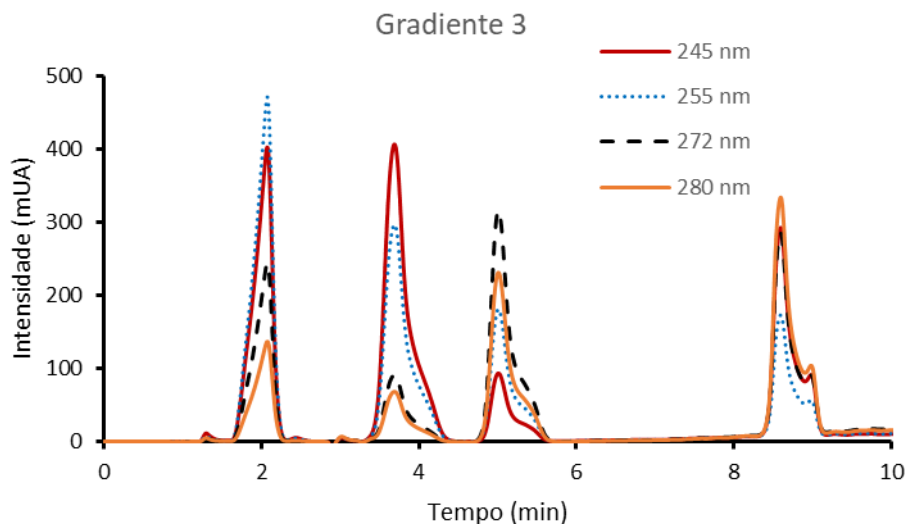


Figura 32. Análise de uma mistura de fármacos por HPLC-DAD com o gradiente 3 (ver Tabela 13).

Após a análise dos gradientes das Tabelas 11, 12 e 13 concluiu-se que o gradiente 3 permite a melhor separação dos compostos com menor tempo de análise, por isso decidiu-se utilizar este gradiente. Para perceber se a quantidade de dietilamina melhorava a resolução dos picos procedeu-se à análise com o gradiente 3 com 0% e 0.005% de dietilamina, os resultados destas análises encontram-se nas Figuras 33 e 34.

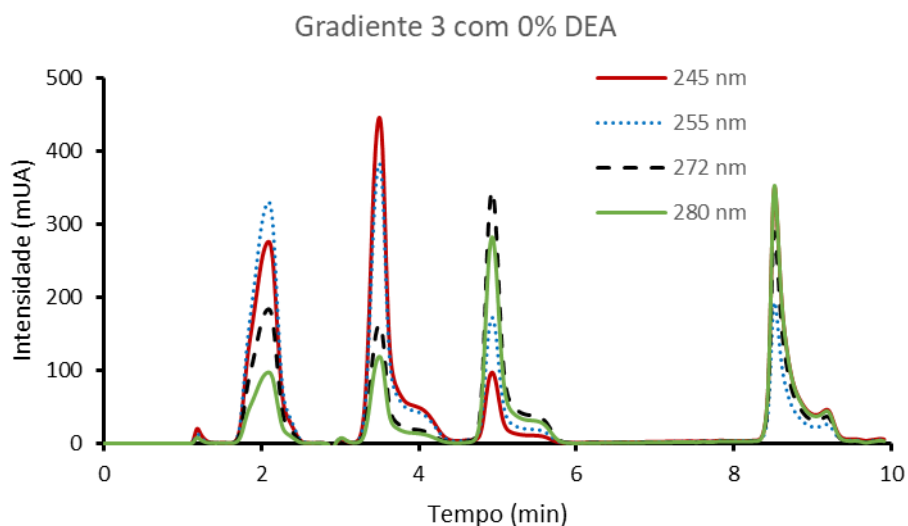


Figura 33. Análise por HPLC-DAD de uma mistura de 4 fármacos com o gradiente 3 (ver Tabela 13) e com uma percentagem de modificador alcalino nula.

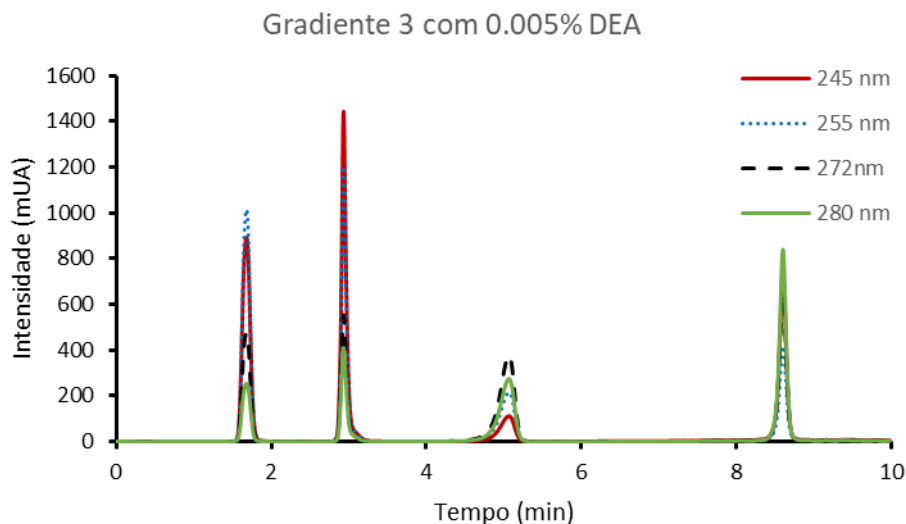


Figura 34. Análise por HPLC-DAD da uma mistura padrão de 4 fármacos com a concentração de 100 ppm, gradiente 3 utilizando 0.005%DEA.

Analisando os cromatogramas das Figuras 32, 33 e 34 é possível verificar a menor dispersão e conseqüentemente que a melhor resolução é obtida utilizando 0.005%DEA. Também é possível verificar que a intensidade/altura dos picos cromatográficos é bastante maior quando se utiliza 0.005% de DEA. Por este facto, a fase móvel seleccionada para o método de quantificação foi o gradiente 3, da Tabela 13, com uma percentagem de 0.005% de dietilamina. Refira-se que esta percentagem representa um valor de pH entre 10 e 11 unidades, pelo que se trabalha numa situação próxima do limite mais elevado da gama de pH recomendada pelo fabricante (pH=12).

5.3 Extração em Fase Sólida

Para a técnica de extração em fase sólida (SPE) foram utilizados cartuchos CHROMABOND® HLB, de 6 mL, com 500 mg de enchimento de poli(divinilbenzeno-co-N-vinilpirrolidona) com um tamanho de partícula de 60 μm . O condicionamento dos cartuchos foi realizado com 5 mL de metanol e 5 mL de água destilada para remoção de possíveis contaminantes. Em seguida, a amostra foi concentrada e extraída, introduzindo-se 10 mL de amostra no cartucho. A etapa de lavagem foi feita passando 5 mL de água destilada e de seguida fez-se a etapa de eluição com 8 mL de metanol. No esquema da Figura

35 é possível visualizar a sequência das etapas da técnica utilizada para a extração em fase sólida.

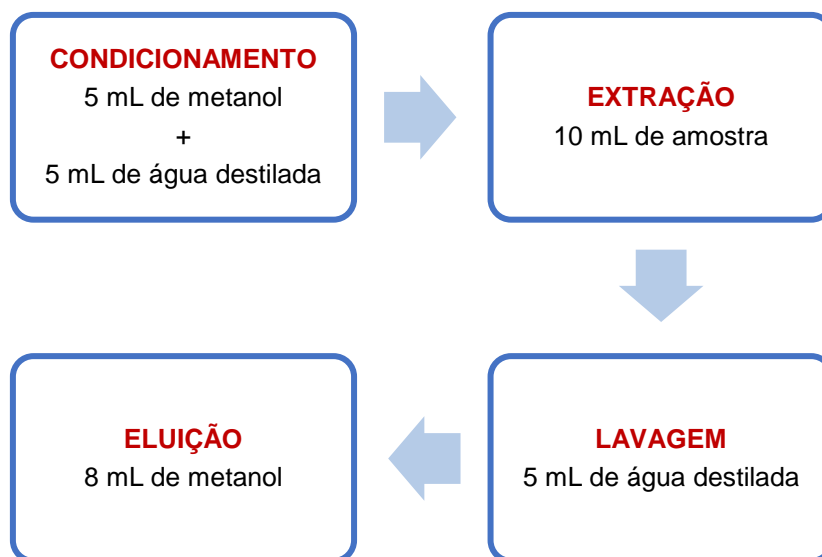


Figura 35. Sequência das etapas utilizadas nas extrações em fase sólida.

As eficiências de extração foram calculadas recorrendo à Equação 1, utilizando os dados das massas iniciais (m_0) e residuais (m_e) da cada analito no final de cada extração.

$$\text{Eficiência de Extração (\%)} = \frac{m_0 - m_e}{m_0} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

5.3.1 Determinação das eficiências de extração no processo de extração utilizando a coluna Nucleosil 10-5 C18

Para a determinação das eficiências de extração obtidas por SPE, realizaram-se extrações com soluções padrão individuais de paracetamol, cafeína e sulfametoxazol com uma concentração de 35 ppm e carbamazepina com uma concentração de 19 ppm. Todas estas soluções foram preparadas em água ultrapura. As concentrações referidas foram selecionadas um pouco abaixo dos respetivos valores de solubilidade em água.

As condições operatórias utilizadas no sistema de HPLC-DAD foram as seguintes: caudal de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ e fase móvel de 60ACN:40W:0.01TFA.

As condições operatórias utilizadas nas diferentes etapas de SPE para os padrões individuais de paracetamol, cafeína, carbamazepina e sulfametoxazol estão descritas na Tabela 14 e os resultados da análise por HPLC-DAD das 4 amostras recolhidas encontram-se apresentados na Figura 36 e na Tabela 15.

Tabela 14. Condições operatórias referentes à operação por SPE das várias misturas padrão de paracetamol, cafeína, carbamazepina e sulfametoxazol preparadas em água.

Composto	Etapas	Volume (mL)	Tempo total (min)	Q (mL.min⁻¹)
Paracetamol	Condicionamento (metanol)	5	17.68	0.28
	Condicionamento (água)	5	12.58	0.40
	Extração	10	15.13	0.66
	Lavagem	5	7.67	0.65
	Eluição	8	36.30	0.22
Cafeína	Condicionamento (metanol)	5	21.73	0.23
	Condicionamento (água)	5	11.57	0.43
	Extração	10	24.48	0.41
	Lavagem	5	8.22	0.61
	Eluição	8	39.22	0.20
Carbamazepina	Condicionamento (metanol)	5	31.58	0.16
	Condicionamento (água)	5	10.43	0.48
	Extração	10	9.83	1.02
	Lavagem	5	5.02	1.00
	Eluição	8	33.25	0.24
Sulfametoxazol	Condicionamento (metanol)	5	16.73	0.30
	Condicionamento (água)	5	7.50	0.67
	Extração	10	20.18	0.50
	Lavagem	5	6.18	0.81
	Eluição	8	52.18	0.15

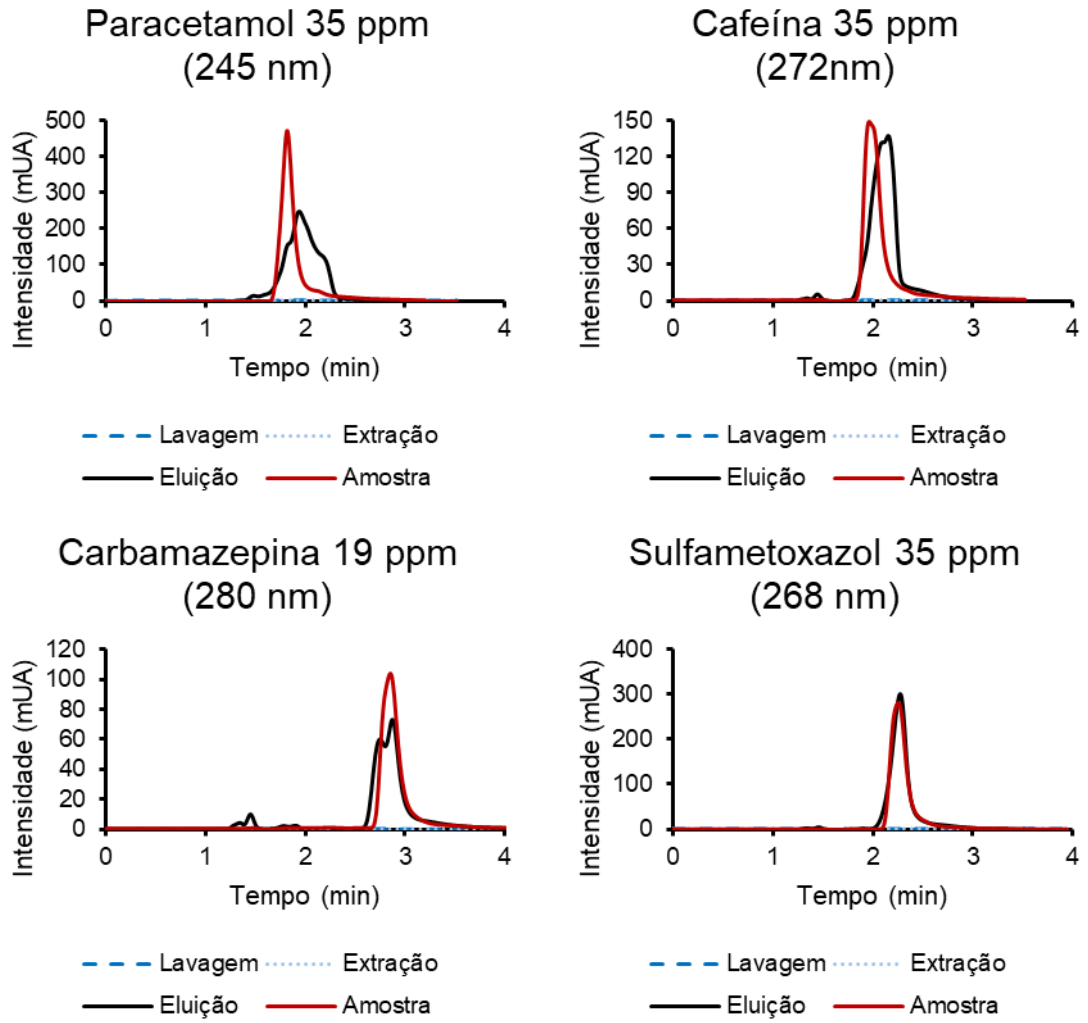


Figura 36. Análise por HPLC-DAD, nos vários comprimentos de onda, das 4 amostras recolhidas nas 4 etapas de SPE das soluções padrão de paracetamol, cafeína, carbamazepina e sulfametoxazol preparadas em água.

Tabela 15. Áreas e tempos de retenção das várias etapas da extração em fase sólida do padrão de paracetamol, cafeína, carbamazepina e sulfametoxazol com 100W.

Composto	Etapa	Área (μ UA)	Tempo de Retenção (min)
Paracetamol	Lavagem	-----	-----
	Extração	-----	-----
	Eluição	5696412	1.953
	Amostra	4841274	1.817
Cafeína	Lavagem	-----	-----
	Extração	-----	-----
	Eluição	2487469	2.153
	Amostra	1976910	1.963
Carbamazepina	Lavagem	-----	-----
	Extração	-----	-----
	Eluição	1270668	2.877
	Amostra	1339165	2.857
Sulfametoxazol	Lavagem	-----	-----
	Extração	-----	-----
	Eluição	3545177	2.270
	Amostra	3277527	2.253

Analisando os resultados da Figura 36 e da Tabela 15 pode concluir-se que não houve perda de fármaco nas etapas de lavagem e extração já que os sinais são nulos. Verifica-se uma ligeira diferença nos tempos de retenção e dispersão na análise da amostra recolhida na fase de eluição que poderão ser devidas a não se utilizar TFA na preparação da solução padrão e o solvente que se utiliza na eluição (metanol) ser diferente da composição da fase móvel (acetonitrilo:água).

Na Tabela 16 encontram-se as eficiências de extração obtidas por SPE para os padrões individuais de paracetamol, cafeína, carbamazepina e sulfametoxazol preparados em água.

Tabela 16. Eficiências de extração obtidas por SPE para os padrões individuais de paracetamol, cafeína, carbamazepina e sulfametoxazol.

Composto	% Eficiência de Extração
Paracetamol	94.1
Cafeína	100.7
Carbamazepina	75.9
Sulfametoxazol	86.5

5.3.2 Determinação das eficiências de extração do processo de extração utilizando a coluna SiliaChrom® XT C18

Para a realização das experiências de extração em fase sólida e determinação dos valores de recuperação, foram preparadas 4 soluções padrão individuais de paracetamol, cafeína, sulfametoxazol e carbamazepina em água ultrapura, com uma concentração de 35 ppm, esta concentração foi selecionada tendo em conta os valores de solubilidade encontrados na literatura para cada composto. As extrações por SPE foram efetuadas seguindo as etapas descritas na Figura 35.

As condições operatórias utilizadas no sistema de HPLC-DAD foram as seguintes: caudal de 1 mL.min⁻¹, com o gradiente 3 descrito na Tabela 13 e utilizando uma fase móvel com 0.005 % de dietilamina.

As condições operatórias utilizadas nas diferentes etapas de SPE estão apresentadas na Tabela 17 e os resultados da análise por HPLC-DAD das 4 amostras recolhidas encontram-se apresentados na Figura 37 e na Tabela 18.

Tabela 17. Condições operatórias referentes à operação por SPE das misturas padrão de sulfametoxazol, cafeína, paracetamol e carbamazepina preparadas em água.

	Etapa	Volume (mL)	Tempo total (min)	Q (mL.min ⁻¹)
Sulfametoxazol	Condicionamento (metanol)	5	20.32	0.25
	Condicionamento (água)	5	7.00	0.71
	Extração	10	20.13	0.50
	Lavagem	5	11.33	0.44
	Eluição	8	22.27	0.36
Cafeína	Condicionamento (metanol)	5	9.25	0.54
	Condicionamento (água)	5	5.00	1.00
	Extração	10	18.03	0.55
	Lavagem	5	15.92	0.31
	Eluição	8	29.00	0.28
Paracetamol	Condicionamento (metanol)	5	12.33	0.41
	Condicionamento (água)	5	7.82	0.64
	Extração	10	10.33	0.97
	Lavagem	5	9.83	0.51
	Eluição	8	27.67	0.29
Carbamazepina	Condicionamento (metanol)	5	20.73	0.24
	Condicionamento (água)	5	4.45	1.12
	Extração	10	20.03	0.50
	Lavagem	5	7.28	0.69
	Eluição	8	26.08	0.31

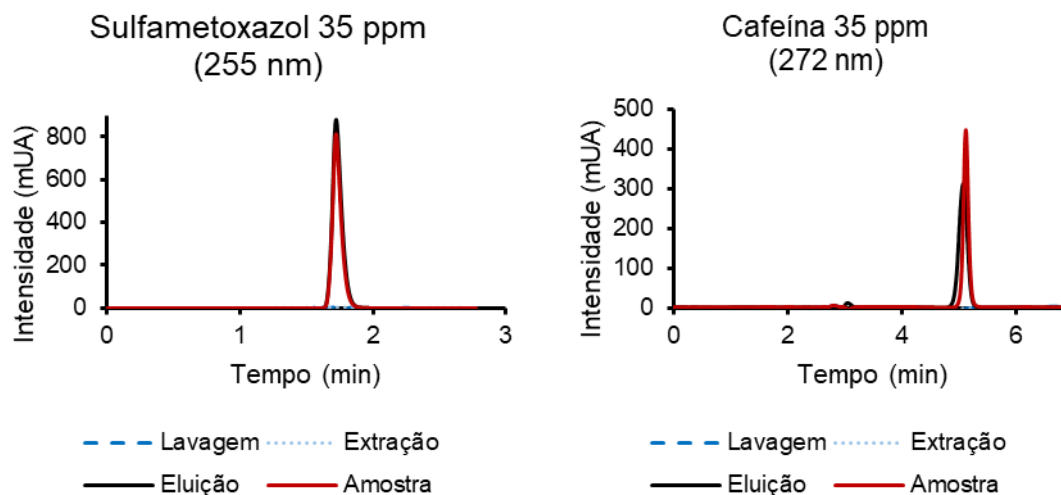


Figura 37. Análise por HPLC-DAD das 4 amostras recolhidas nas 4 etapas de SPE de uma solução padrão de sulfametoxazol e cafeína preparadas em água.

Tabela 18. Áreas e tempos de retenção das várias etapas da extração em fase sólida do padrão de sulfametoxazol, cafeína, paracetamol e carbamazepina em água.

	Etapa	Área (μ UA)	Tempo de Retenção (min)
Sulfametoxazol	Lavagem	-----	-----
	Extração	-----	-----
	Eluição	4322091	1.727
	Amostra	3788039	1.727
Cafeína	Lavagem	-----	-----
	Extração	-----	-----
	Eluição	3329020	5.077
	Amostra	2917792	5.127
Paracetamol	Lavagem	-----	-----
	Extração	-----	-----
	Eluição	3677707	3.500
	Amostra	3488595	3.563
Carbamazepina	Lavagem	-----	-----
	Extração	-----	-----
	Eluição	2163844	2.877
	Amostra	1339165	2.857

Analisando os resultados da Figura 37 e da Tabela 18 pode concluir-se que não houve perda de fármaco nas etapas de lavagem e extração já que os sinais são nulos.

Na Tabela 19 encontram-se as eficiências de extração obtidas por SPE para os padrões individuais de paracetamol, cafeína, carbamazepina e sulfametoxazol.

Tabela 19. Eficiências de extração obtidas por SPE para os padrões individuais de paracetamol, cafeína, carbamazepina e sulfametoxazol.

Composto	% Eficiência de Extração
Paracetamol	84.3
Cafeína	91.3
Carbamazepina	84.2
Sulfametoxazol	91.3

Determinação das eficiências de extração utilizando uma mistura padrão contendo os 4 fármacos

De modo a estudar se a presença simultânea de vários fármacos numa amostra influencia as eficiências de extração (se existe competição na adsorção) foram determinadas as eficiências de extração utilizando uma solução padrão contendo a mistura dos 4 fármacos com uma concentração de 35 ppm em água ultrapura.

As condições operatórias utilizadas no sistema de HPLC-DAD foram as seguintes: caudal de 1 mL.min⁻¹, com o gradiente 3 da Tabela 13 com 0.005 % de dietilamina.

As condições operatórias utilizadas no processo de SPE da mistura padrão encontram-se descritas na Tabela 20.

Tabela 20. Método e caudais da extração em fase sólida do padrão da mistura com 35 ppm.

Etapa	Volume (mL)	Tempo total (min)	Caudal (mL.min ⁻¹)
Condicionamento (metanol)	5	8.37	0.60
Condicionamento (água)	5	8.22	0.61
Extração	10	23.18	0.43
Lavagem	5	4.68	1.07
Eluição	8	24.67	0.32

Os resultados cromatográficos da análise da solução padrão da mistura com uma concentração individual de 35 ppm encontram-se na Tabela 21 e as eficiências de extração obtidas encontram-se na Tabela 22.

Tabela 21. Áreas e tempos de retenção das etapas de eluição da extração em fase sólida e da amostra da 1ª extração da mistura com 100W.

Composto	Etapa	Área (μUA)	Tempo de Retenção (min)
Carbamazepina	Eluição	2479531	8.530
	Amostra	1879140	8.510
Sulfametoxazol	Eluição	3324683	1.650
	Amostra	2433239	1.653
Paracetamol	Eluição	3560714	2.930
	Amostra	2740485	3.147
Cafeína	Eluição	3015790	5.047
	Amostra	2193334	5.093

Tabela 22. Resultados da percentagem de recuperação em massa e em concentração para os vários compostos.

Composto	Recuperação em Massa (%)
Carbamazepina	105.56
Sulfametoxazol	109.31
Paracetamol	103.94
Cafeína	110.00

Comparando as eficiências de extração dos padrões individuais obtidas nas duas colunas, pode concluir-se, que as extrações obtidas com a coluna SiliaChrom XT C18, e com a fase móvel composta por metanol, água e dietilamina foram superiores às extrações obtidas com a coluna Nucleosil 100-5

C18. Este facto pode dever-se a que a fase móvel composta por metanol, água e dietilamina tem mais afinidade com as amostras obtidas por extração em SPE, uma vez que estas estão diluídas em metanol.

Em relação aos resultados obtidos para o padrão de mistura, na coluna SiliaChrom XT C18, pode verificar-se que todas as eficiências de extração são superiores a 100% logo é possível provar que não existe efeito de competição dos fármacos pelo adsorvente (uma possível hipótese poder-se-á dever ao facto de as concentrações utilizadas serem muito baixas para que isso aconteça).

5.4 Validação do método analítico

O método de análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD) foi validado através da determinação das curvas de calibração (linearidade), dos limites de deteção (LD), dos limites de quantificação (LQ), repetibilidade e reprodutibilidade para cada um dos 4 fármacos estudados. O método analítico baseado na análise cromatográfica permite detetar concentrações de 0.005, 0.04, 0.04 e 0.3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para sulfametoxazol, paracetamol, cafeína e carbamazepina respetivamente.

A linearidade de cada composto foi determinada a partir de um conjunto de medições experimentais e avaliada de acordo com os coeficientes de determinação obtidos experimentalmente. Foram obtidas gamas de linearidade desde os 5 ppb até os 100 ppm. Na Tabela 23 apresentam-se as curvas de calibração obtidas para os 4 fármacos estudados, assim como os respetivos dados estatísticos calculados: gama(s) de linearidade, número de pontos utilizado em cada gama (n), declive (a), ordenada na origem (b), erros associados ao declive e ordenada na origem baseados num nível de significância de 95%, coeficiente de determinação, limites de deteção e de quantificação. valores dos coeficientes de correlação das equações de regressão linear, limite de deteção e limite de quantificação para cada composto estudado, em cada gama de linearidade, o número de pontos existentes em cada gama (n) obtidos por análise no HPLC-DAD.

Tabela 23. Valores de comprimento de onda de análise por HPLC-DAD, gamas de linearidade, declive (b) e ordenada na origem (a) e respetivos erros a 95% de confiança, coeficientes de determinação (R^2), limites de deteção (LD) e de quantificação (LQ) e coeficiente de variação do método (CV_m) para os 4 fármacos estudados.

Composto	λ (nm)	Gama linear (mg.L ⁻¹)	n	Ordenada	Declive	R^2	LD (mg.L ⁻¹)	LQ (mg.L ⁻¹)	CV_m (%)
				$a \pm ts_a$	$b \pm ts_a$				
Carbamazepina	268	0.3-100	13	25173 ± 31015	53528 ± 814	0.9995	0.099	0.300	3.85
		0.3-0.75	6	2969 ± 5533	36914 ± 9799	0.9647	0.099	0.300	6.88
		1-100	7	82300 ± 37742	52728 ± 727	0.9999	0.330	1.000	1.32
Cafeína	272	0.04-100	22	-2287 ± 323857	52168 ± 301	0.9999	0.013	0.040	1.32
		0.04-1	6	827 ± 2882	51590 ± 5514	0.9941	0.013	0.040	9.67
		1-100	7	-6363 ± 30273	52226 ± 583	0.9999	0.330	1.000	1.07
Paracetamol	245	0.25-100	14	56825 ± 77516	64484 ± 2111	0.9973	0.083	0.250	9.13
		0.25-1	8	-12893 ± 6297	69623 ± 10326	0.9784	0.083	0.250	7.18
		1-100	7	199628 ± 151676	62484 ± 2921	0.9983	0.330	1.000	4.48
Sulfametoxazol	255	0.005-100	22	23760 ± 20212	70484 ± 690	0.9996	0.005	0.002	4.77
		0.005-0.1	7	1837 ± 533	103658 ± 11323	0.9911	0.002	0.005	9.21
		0.1-1	10	462 ± 4466	96201 ± 8275	0.9880	0.033	0.100	6.60
		1-100	7	98319 ± 68670	69436 ± 1322	0.9997	0.330	1.000	1.83

Dentro das gamas lineares mais abrangentes, descritas na Tabela 23, o método de análise por HPLC-DAD é linear conforme comprovam os valores dos coeficientes de determinação (R^2) que são todos superiores a 0.9973.

Em relação aos limites de detecção obtidos para cada fármaco, pode-se fazer uma comparação com os valores recolhidos da literatura e que estão apresentados na Tabela 3. Para a carbamazepina, o valor de LD é de 99 mg.L⁻¹, sendo consideravelmente superior a 2 ng.L⁻¹ publicado por Salgado *et al.*, 2010. Refira-se, contudo que este valor foi obtido utilizando equipamento HPLC-DAD/MS (ESI+), sendo por isso um método menos acessível. Para a cafeína, o valor do LD é de 13 mg.L⁻¹, este valor é também superior ao valor obtido de 12 ng.L⁻¹ referido por Montagner e Jardim, 2011. Este autor refere ainda os valores de LD de 0.013 e 0.012 mg.L⁻¹ para cafeína e paracetamol, os quais são muito inferiores aos apresentados neste trabalho de 13 e 83 mg.L⁻¹.

Precisão

Os estudos de precisão foram realizados com o cálculo da repetibilidade e da reprodutibilidade utilizando uma solução padrão da mistura dos 4 fármacos com uma concentração de 50 ppm preparada em metanol.

Para a repetibilidade, realizou-se um conjunto de 6 análises no mesmo dia e com as condições do gradiente 3 (ver Tabela 13) com 0.005 % de dietilamina.

A reprodutibilidade foi determinada com um conjunto de 6 análises da solução padrão da mistura em 6 dias diferentes e com as mesmas condições, ou seja, o gradiente 3 da Tabela 13 com 0.005 % de dietilamina.

Os valores de repetibilidade e reprodutibilidade obtidos encontram-se na Tabela 24, expressos em coeficiente de variação (CV, em %).

Tabela 24. Estudos de reprodutibilidade e repetibilidade nas análises de HPLC-DAD.

Composto	Reprodutibilidade	Repetibilidade
	CV (%)	CV (%)
Sulfametoxazol	1.36	2.07
Paracetamol	2.81	1.94
Cafeína	2.40	2.17
Carbamazepina	2.32	1.80

Estes resultados conferem uma boa qualidade precisão ao método de análise, uma vez que tanto para a repetibilidade como para a reprodutibilidade se obtiveram valores e coeficientes de variação inferiores a 3% para os 4 fármacos estudados.

5.5. Implementação do método analítico

De forma a validar o método analítico foram recolhidas e analisadas 8 amostras de água de diferentes origens e locais do distrito de Bragança. Os pontos de recolha foram o Rio Sabor, Rio Onor, Rio Fervença, Piscina Municipal de Bragança, água da torneira da rede de distribuição municipal de Bragança e água à saída da ETAR de Bragança, foram também analisadas as águas do Rio Sousa e de um Ribeiro. Na Figura 38 encontram-se as fotografias de alguns dos pontos de recolha das amostras de água analisadas.



Figura 38. Alguns dos pontos de recolha das amostras de água. 1 - Rio Sabor, 2 - Rio Fervença, 3 - Rio Onor.

Procedeu-se à análise por HPLC-DAD de uma amostra em branco (100% metanol) para estudar quais as possíveis interferências que poderiam ser causadas na linha de base pelas diferentes composições da fase móvel utilizadas (metanol, água e dietilamina) e o solvente utilizado para a eluição das amostras na extração em fase sólida (metanol). Este procedimento é importante

devido ao facto de que as concentrações dos micropoluentes encontradas nas amostras de água são bastante diminutas e as interferências de sinal sendo impercetíveis para concentrações elevadas, podem ser bastante problemáticas para concentrações mais pequenas. Na Figura 39 é possível visualizar todas as interferências para valores de intensidade de sinal baixos que são visíveis utilizando o gradiente da Tabela 13 com 0.005 % de dietilamina nos 4 comprimentos de onda utilizados para cada composto.

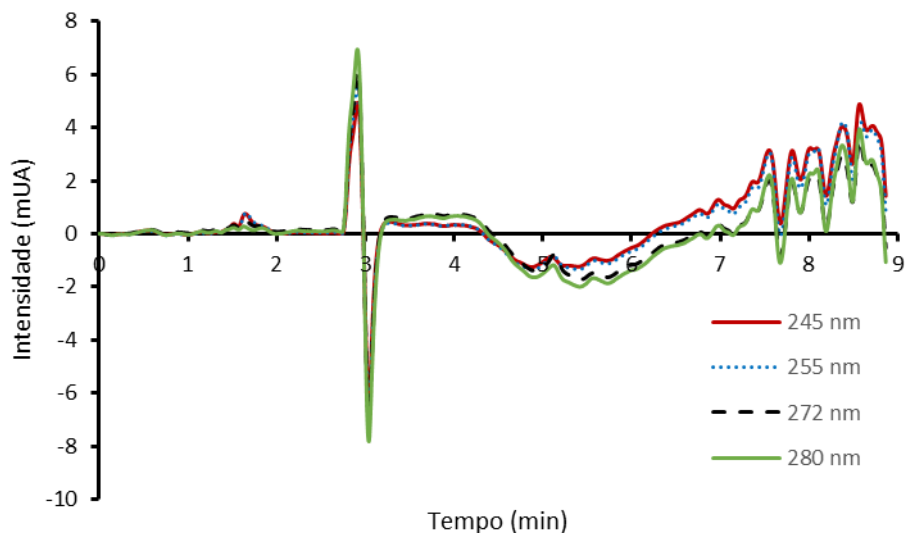


Figura 39. Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD para a análise do branco com diferentes comprimentos de onda.

Analisando o cromatograma da Figura 39 é possível visualizar um pico aproximadamente nos 1.75 minutos relativo à água e outro nos 3 minutos relativo ao metanol e o restante será ruído de sinal.

Após a identificação de todas as possíveis interferências que poderiam aparecer no cromatograma, procedeu-se à extração em fase sólida de todas as amostras recolhidas e posteriormente à sua análise por HPLC-DAD.

Na Figura 40 encontra-se o cromatograma obtido por HPLC-DAD do Rio Sabor nos diferentes comprimentos de onda, onde é possível verificar que a amostra não possui qualquer contaminante, podendo afirmar-se que apenas aparecem os picos relativos à água e ao metanol. Esta informação foi confirmada através do detetor DAD onde é possível verificar os espetros de absorção dos compostos e onde apenas é possível verificar a existência destes dois picos.

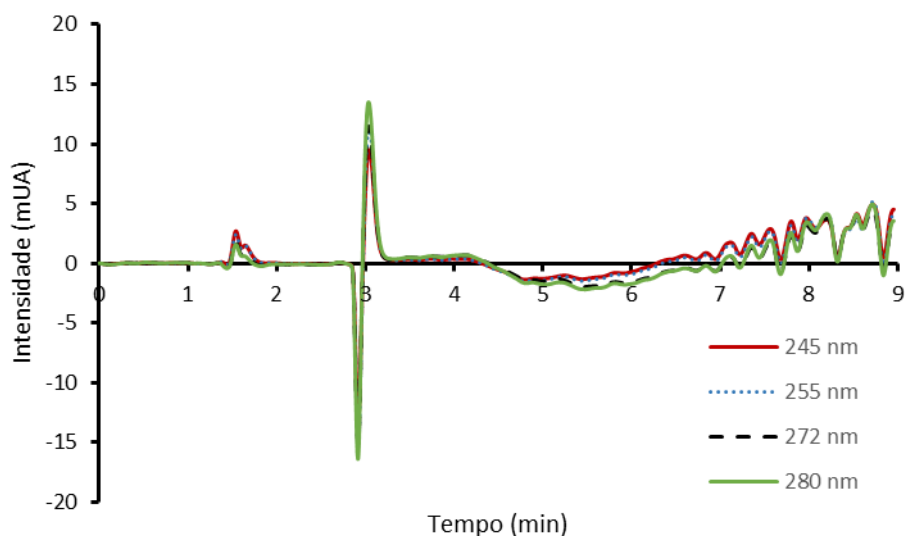


Figura 40. Análise HPLC-DAD da Amostra de água do Rio Sabor nos diferentes comprimentos de onda.

Todas as amostras de água foram analisadas através de SPE seguido de análise cromatográfica no HPLC-DAD e constatou-se que para todas as amostras, à exceção da amostra à saída da ETAR, se obteve um cromatograma bastante semelhante ao da Figura 40.

Na Figura 41 é possível observar o cromatograma obtido para a amostra de água à saída da ETAR nos vários comprimentos de onda. Analisando o cromatograma da Figura 41 é possível visualizar um composto aos 1.560 minutos com uma absorvância máxima no comprimento de onda de aproximadamente 211 nm. Como este composto não estava presente na lista de compostos que se pretendia estudar (sulfametoxazol, paracetamol, cafeína e carbamazepina) não foi possível a sua identificação.

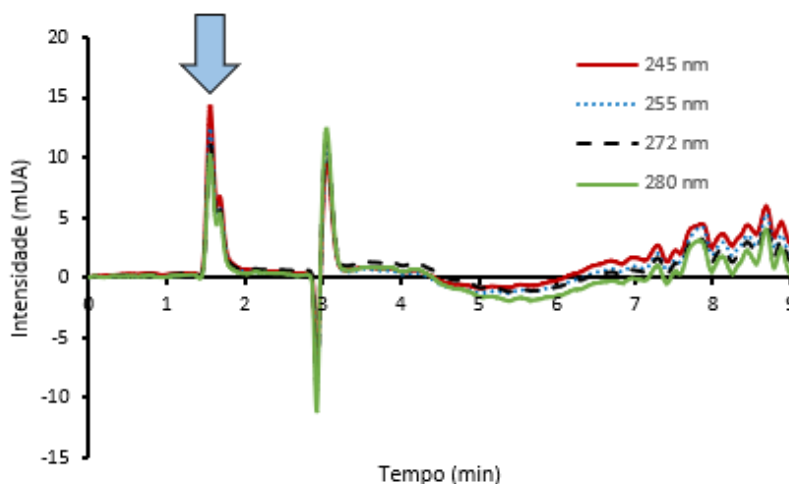


Figura 41. Análise HPLC-DAD da Amostra de água à saída da ETAR nos diferentes comprimentos de onda.

Para se estudar se na extração em fase sólida ocorreria efeito de matriz, ou seja, que os compostos que poderiam estar presentes nas amostras de água não estariam a competir entre si pela adsorção no adsorvente de SPE, foi preparada uma solução padrão com uma concentração individual de 35 ppm dos 4 fármacos (paracetamol, sulfametoxazol, cafeína e carbamazepina) com a amostra de água do Rio Ferverença que tinha sido considerada como isenta destes contaminantes. Esta amostra de água foi sujeita a todo o processo idêntico às demais amostras de água, ou seja, extração em fase sólida e análise no HPLC-DAD.

Na Figura 42 encontra-se a análise por HPLC-DAD das amostras recolhidas nas várias etapas da extração em fase sólida, referentes à solução padrão dos 4 fármacos a 35 ppm, preparada utilizando água do Rio Ferverença isenta inicialmente de contaminações. Analisando os resultados obtidos e apresentados na Figura 42 é possível concluir que não existe qualquer efeito de matriz na extração em fase sólida, uma vez que os valores das eficiências de extração obtidos para todos os fármacos adicionados à água do Rio Ferverença são superiores a 91.6%. Nas Tabelas 25 e 26 encontram-se os resultados obtidos para os 4 fármacos.

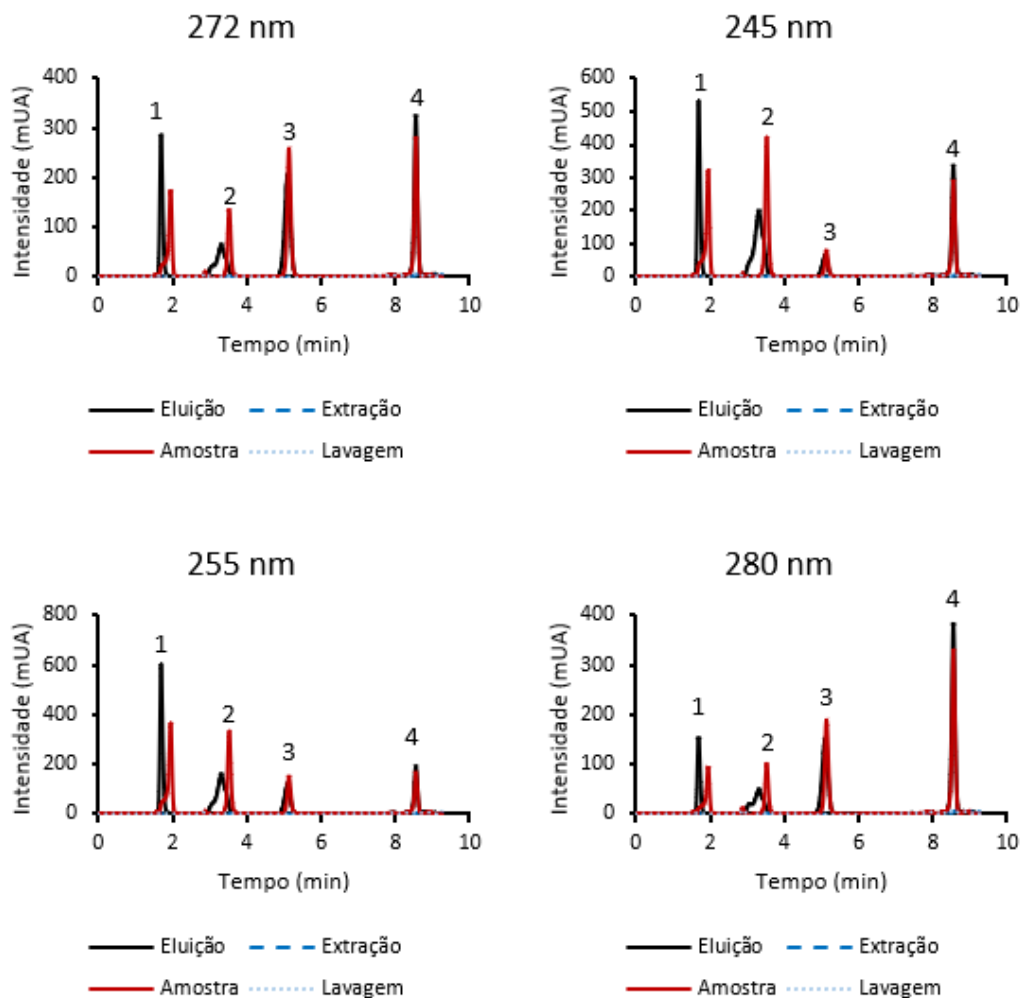


Figura 42. Análise cromatográfica obtida por HPLC-DAD da eluição da amostra do Rio Ferverça contaminada com uma mistura padrão de 35 ppm (1- sulfametoxazol, 2 - paracetamol, 3 - caféina, 4 - carbamazepina).

Analisando os resultados obtidos e apresentados na Figura 46 é possível concluir que não existe qualquer efeito de matriz na extração em fase sólida, uma vez que os valores das eficiências de extração obtidos para todos os fármacos adicionados à água do Rio Ferverça são superiores a 91.6%. Nas Tabelas 35 e 36 encontram-se os resultados obtidos para os 4 fármacos.

Observa-se na Figura 42 uma ligeira diferença entre os tempos de retenção dos 2 compostos menos retidos. Este comportamento poder-se-á dever ao facto de as amostras de eluição da SPE não conterem 0.005% de dietilamina e por isso apresentarem mais dispersão.

Tabela 25. Áreas e tempos de retenção das etapas de eluição da extração em fase sólida e da amostra da mistura com 100W.

Composto	Etapa	Área (μUA)	Tempo de Retenção (min)
Sulfametoxazol	Eluição	3140875	1.690
	Amostra	2742611	1.947
Paracetamol	Eluição	3447610	3.313
	Amostra	2668875	3.520
Cafeína	Eluição	2328991	5.133
	Amostra	1887562	5.097
Carbamazepina	Eluição	2403460	8.547
	Amostra	2039645	8.550

Tabela 26. Eficiências de recuperação (em massa) para os 4 fármacos.

Composto	% Eficiência de Extração
Carbamazepina	94.3
Sulfametoxazol	91.6
Paracetamol	103.3
Cafeína	98.7

6. Conclusão

O principal objetivo deste trabalho consistiu em desenvolver e implementar experimentalmente um método expedito de extração em fase sólida (SPE) para fármacos pertencentes a classes farmacológicas diferentes, desenvolver um método de detecção e quantificação por cromatografia líquida (HPLC-DAD) para fármacos em matrizes aquosas e validar o método analítico de extração e de quantificação através da sua implementação em amostras reais (amostras de piscinas, amostras fluviais, estações de tratamento de águas residuais).

Devido às diferenças de pKa entre os diferentes compostos em estudo (azitromicina, sulfametoxazol, carbamazepina, diclofenaco, naproxeno, ibuprofeno, ácido acetilsalicílico, cafeína, paracetamol e cetoprofeno), estes foram divididos em dois grupos distintos. No primeiro grupo, os compostos com valores de pKa mais baixos e um segundo grupo com valores de pKa mais elevados. Assim, desenvolveu-se e otimizou-se dois métodos de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com um detetor de arranjo de díodos (HPLC-DAD), com uma coluna Nucleosil C18 para compostos com pKa menor e uma coluna SiliaChrom XT C18 para compostos com pKa mais elevado. Os métodos desenvolvidos para ambas as colunas cromatográficas em HPLC-DAD são otimizados através de estudos de composição e pH de fase móvel, gradientes de solvente e comprimentos de onda ótimos para cada composto.

Inicialmente, otimizou-se o processo de extração em fase sólida (SPE) utilizando o adsorvente Chromabond® HLB com diferentes solventes e caudais baixos para cada uma das quatro etapas da SPE. Nas extrações por SPE dos compostos com pKa mais elevado obtiveram-se valores de recuperação bastante elevados.

O método de HPLC-DAD foi desenvolvido com o modo de gradiente de solvente para ambas as colunas utilizadas. Na coluna Nucleosil C18 a fase móvel é composta por acetonitrilo, água e ácido trifluoracético, enquanto com a coluna SiliaChrom XT C18 a fase móvel foi composta por metanol, água e dietilamina.

A utilização do detetor de arranjo de díodos (DAD), permitiu selecionar os comprimentos de onda que otimizassem a intensidade do sinal para cada composto farmacêutico. Os comprimentos de onda escolhidos foram de 219 nm

para ibuprofeno, 224 nm para ácido acetilsalicílico e naproxeno, 254 nm para cetoprofeno, 275 nm para diclofenaco, 272 nm para cafeína, 245 nm para paracetamol, 255 nm para sulfametoxazol e 280 nm para carbamazepina.

As curvas de calibração foram obtidas para cada um dos compostos com pKa mais elevado, tendo a linearidade das curvas de calibração sido confirmada.

Após a otimização de todo o processo de extração, identificação e quantificação em SPE/HPLC-DAD, o método foi validado com a análise de oito amostras reais recolhidas em diferentes matrizes aquosas da região de Bragança: Rio Sabor, Rio Onor, Rio Fervença, Piscina Municipal, Rio Sousa, um Ribeiro, água de torneira da rede de distribuição municipal, e água recolhida à saída da ETAR. Constatou-se que apenas a água à saída da ETAR estava contaminada com uma substância não identificada.

Como sugestões para trabalhos futuros, poderiam ser testados outros procedimentos de extração, alterando o adsorvente SPE, testando diferentes solventes ou até mesmo utilizar outra técnica de extração como por exemplo, a micro extração em fase sólida (SPME). Poderiam ser utilizados métodos analíticos mais sofisticados, como LC-MS (cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa) ou GC-MS (cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa). Seria também interessante abranger outro tipo de micropoluentes emergentes.

7. Referências Bibliográficas

- Altman, R., Bosch, B., Brune, K., Patrignani, P., & Young, C. (2015). Advances in NSAID Development: Evolution of Diclofenac Products Using Pharmaceutical Technology. *Drugs*, 75, 859–877.
- Baranowska, I., & Kowalski, B. (2011). Using HPLC Method with DAD Detection for the Simultaneous Determination of 15 Drugs in Surface Water and Wastewater. *Polish Journal of Environmental Stud*, 20(1), 21–28.
- Becker, R. W. (2012). *Determinação de Anti-inflamatórios em Efluente Urbano na Região do Porto Alegre-RS por SPE, Derivatização e GC-MS*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Dissertação de Mestrado.
- Bottoni, P., Caroli, S., & Caracciolo, A. B. (2010). Pharmaceuticals as Priority Water Contaminants. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 92(3), 549–565.
- Campos-Mañas, M. C., Plaza-Bolaños, P., Sánchez-Pérez, J. A., Malato, S., & Agüera, A. (2017). Fast Determination of Pesticides and other Contaminants of Emerging Concern in Treated Wastewater using Direct Injection Coupled to Highly Sensitive Ultra-High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A*.
- Capote, T. C. (2009). *Efeitos da Carbamazepina, Homocisteína e Homocisteína Tiolactona na Bioenergética e Permeabilidade Transitória Mitocondrial*. Universidade da Beira Interior - Faculdade de Ciências. Dissertação de Mestrado.
- Castro, P. L. P. de. (2014). *Farmacocinética do Paracetamol*. Universidade Fernando Pessoa - Faculdade de Ciências da Saúde. Dissertação de Mestrado.
- Colaço, R. (2013). *Determinação de Diclofenaco e Ibuprofeno em Matrizes Aquosas por EFS-CLAE-UV*. Universidade Federal do Paraná. Dissertação de Mestrado.
- Daughton, C. G., & Ternes, T. A. (1999). Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Agents of Subtle Change? *Environmental Health Perspectives*, 107(6), 907–938.
- Decisão de Execução (UE) 2018/840 da Comissão de 5 de junho de 2018*. (2018) (Vol. 2018, pp. 9–12).
- Dias, J. A. F. (2011). *Tratamento de Efluentes da Indústria Farmacêutica por Processos Avançados de Oxidação Engenharia Química*. Instituto Politécnico de Bragança - Escola Superior de Tecnologia e gestão. Tese de Mestrado.

Directiva 2008/105/CE de 16 de Dezembro do Parlamento Europeu e do Conselho. (2008), 14.

Diretiva 2013/39/UE do Parlamento Europeu e do Conselho de 12 de agosto de 2013. (2013). *Jornal Oficial da União Europeia*, 2013, 1–17.

Drugbank, Sulfamethoxazole, <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01010> (acedido em Dezembro 21, 2018).

Drugbank, Carbamazepine, <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00564> (acedido em Dezembro 8, 2018).

Drugbank, Ketoprofen, <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01009> (acedido em Fevereiro 18, 2019).

Drugbank, Aspirin, <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00945> (acedido em Fevereiro 18, 2019).

Drugbank, Cafeine, <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00201> (acedido em Fevereiro 18, 2019).

Durigan, M. A. B., Vaz, S. R., & Peralta-Zamora, P. (2016). *Degradação de Poluentes Emergentes por Processos Fenton e Foto-Fenton*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Tese de Doutorado.

Edwards, S. H. (2018). Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs. Obtido de <https://www.merckvetmanual.com/pharmacology/anti-inflammatory-agents/nonsteroidal-anti-inflammatory-drugs#v3337669>

Fatta, D., Achilleos, A., Nikolaou, A., & Meriç, S. (2007). Analytical Methods for Tracing Pharmaceutical Residues in Water and Wastewater. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 26(6), 515–533.

Fortunato, A. I. C. (2014). *Ocorrência de Diclofenac, Ibuprofeno e Paracetamol em Águas Residuais em Portugal*. Universidade de Coimbra - Faculdade de Farmácia. Dissertação de Mestrado.

Franco, M. S. (2015). *Utilização de Técnicas Compatíveis com o Conceito de Química Verde na Determinação de Micropoluentes Orgânicos em Matrizes Ambientais*. Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo. Tese de Doutorado.

Garrigós Timoneda, E. (2017). Utilización de Ibuprofeno por los Usuarios de la Farmacia

- Comunitaria. *Farmacéuticos Comunitarios*, 9(1), 34–38.
- Heberer, T. (2002). Occurrence, Fate, and Removal of Pharmaceutical Residues in the Aquatic Environment: A Review of Recent Research Data. *Toxicology Letters*, 131, 5–17.
- Hmr, https://www.hmr.co.com/portugal/SiteCollectionDocuments/Notícias/destaques_2016.pdf (acedido em Fevereiro 7, 2019).
- Huerta, C. L. S. (2016). *Removal and Degradation Pathways of Sulfamethoxazole Present in Synthetic Municipal Wastewater via an Anaerobic Membrane Bioreactor*. King Abdullah University of Science and Technology. Tese de Mestrado.
- Ibáñez, M., Borova, V., Boix, C., Aalizadeh, R., Bade, R., Thomaidis, N. S., & Hernández, F. (2017). UHPLC-QTOF MS screening of pharmaceuticals and their metabolites in treated wastewater samples from Athens. *Journal of Hazardous Materials*. doi:10.1016/j.jhazmat.2016.03.078
- Kabir, L. A. (2009). *Antimicrobial Susceptibility Study of Different Brands of Azitromycin*. East West University - Department of Pharmacy. Dissertação de Bacharelato.
- Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Thurman, E. M., Zaugg, S. D., Barber, L. B., & Buxton, H. T. (2002). Pharmaceuticals, Hormones, and other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: A National Reconnaissance. *Environmental Science and Technology*, 36, 1202–1211.
- Kubota, H., Tsuda, S., Murata, M., Yamamoto, T., Tanaka, Y., & Makita, T. (1980). Specific Volume and Viscosity of Methanol-Water Mixtures Under High Pressure. *The Review of Physical Chemistry of Japan*, 49(2), 59–69.
- Labiotech, <https://labiotech.eu/tops/best-selling-drugs-europe-2017/> (acedido em Fevereiro 7, 2019).
- Larsson, D. G. J., de Pedro, C., & Paxeus, N. (2007). Effluent from Drug Manufactures Contains Extremely High Levels of Pharmaceuticals. *Journal of Hazardous Materials*, 148(3), 751–755.
- Lee, H. B., Peart, T. E., & Svoboda, M. L. (2005). Determination of Endocrine-Disrupting Phenols, Acidic Pharmaceuticals, and Personal-Care Products in Sewage by Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1094, 122–129.

- Leite, É. C. A. (2013). *Dispersões Aquosas de Poliuretano como Material Base para o Desenvolvimento de Sistemas de Liberação Controlada de Cetoprofeno*. Instituto Politécnico de Bragança - Escola Superior de Tecnologia e Gestão. Tese de Mestrado.
- Madikizela, Lawrence M., Muthwa, S. F., & Chimuka, L. (2014). Determination of Triclosan and Ketoprofen in River Water and Wastewater by Solid Phase Extraction and High Performance Liquid Chromatography. *South African Journal of Chemistry*, 67, 143–150.
- Madikizela, Lawrence Mzukisi, & Chimuka, L. (2017). Simultaneous Determination of Naproxen, Ibuprofen and Diclofenac in Wastewater Using Solid-Phase Extraction with High Performance Liquid Chromatography. *Water SA*, 43(2), 264–274.
- Madureira, T. V., Rocha, M. J., Cass, Q. B., & Tiritan, M. E. (2010). Development and Optimization of a HPLC-DAD Method for the Determination of Diverse Pharmaceuticals in Estuarine Surface Waters. *Journal of Chromatographic Science*, 48, 176–182.
- Miller, J. N., Miller, J. C., & Miller, R. D. (2018). *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. Pearson Education Limited (Vol. 7th Editio).
- Miranda, S. I. M. (2014). *Remoção de Fármacos de Águas Contaminadas. Avaliação de Vários Substratos*. Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia. Dissertação de Mestrado.
- Mohamad, N. E., Yeap, S. K., Beh, B. K., Ky, H., Lim, K. L., Ho, W. Y., ... Alitheen, N. B. (2018). Coconut Water Vinegar Ameliorates Recovery of Acetaminophen Induced Liver Damage in Mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18(1), 1–10.
- Nahar, K. (2012). *Pharmaceutical Equivalence Investigations of Different Brands of Naproxen Tablet*. East West University. Tese de Bacharelato.
- Nallani, G. C., Paulos, P. M., Constantine, L. A., Venables, B. J., & Huggett, D. B. (2011). Bioconcentration of Ibuprofen in Fathead Minnow (*Pimephales promelas*) and Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*). *Chemosphere*, 84(10), 1371–1377.
- Nam, S. W., Jo, B. II, Yoon, Y., & Zoh, K. D. (2014). Occurrence and Removal of Selected Micropollutants in a Water Treatment Plant. *Chemosphere*, 95, 156–165.
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=3825, Ketoprofeno, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3825>

(acedido em Dezembro 8, 2018).

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=2519, Caffeine, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2519> (acedido em Janeiro 12, 2019).

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=2244, Aspirin, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2244> (acedido em Janeiro 18, 2019).

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=447043, Azithromycin, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/447043> (acedido em Dezembro 21, 2018).

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=3672, Ibuprofen, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3672> (acedido em Fevereiro 18, 2019).

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=3033, Diclofenac, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3033> (acedido em Fevereiro 18, 2019).

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; Sulfamethoxazole, CID=5329, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5329> (acedido em Fevereiro 18, 2019).

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; Carbamazepine, CID=2554, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2554> (acedido em Fevereiro 18, 2019).

Nemoto, A. C. M. (2019). Monitoring of anti-inflammatory drugs in hydric media from Bragança district. Federal University of Technology of Paraná. Dissertação de Mestrado.

Néri, T. de S. (2018). *Estratégias de Microextração em Fases Sólida e Líquida para Determinação de Cobre e Cromo em Água Empregando Técnicas Eletroanalíticas e Espectrométricas*. Universidade Federal de Uberlândia. Tese de Doutorado.

Oliveira, C. de. (2017). *Fotodegradação do Sulfametoxazol Presente em Ambientes Aquáticos usando Radiação Solar Simulada*. Universidade de Aveiro. Tese de Mestrado.

- Paíga, P., Santos, L. H. M. L. M., Amorim, C. G., Araújo, A. N., Montenegro, M. C. B. S. M., Pena, A., & Delerue-Matos, C. (2013). Pilot Monitoring Study of Ibuprofen in Surface Waters of North of Portugal. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(4), 2410–2420. doi:10.1007/s11356-012-1128-1
- Palma, P., Kuster, M., Alvarenga, P., Palma, V. L., Fernandes, R. M., Soares, A. M. V. M., ... Barbosa, I. R. (2009). Risk Assessment of Representative and Priority Pesticides, in Surface Water of the Alqueva Reservoir (South of Portugal) Using On-line Solid Phase Extraction-Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Environment International*, 35(3), 545–551.
- Pedroso, R. C. R. (2007). *Desenvolvimento de Métodos de Análise por Clae-Uv Sulfametoxazol e Trimetoprima Utilizando Sistemas de Pré-Concentração*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Dissertação de Mestrado.
- Pereira, A. M. P. T., Silva, L. J. G., Meisel, L. M., Lino, C. M., & Pena, A. (2015). Environmental Impact of Pharmaceuticals from Portuguese Wastewaters: Geographical and Seasonal Occurrence, Removal and Risk Assessment. *Environmental Research*, 136, 108–119.
- Pfluger, P., & Dietrich, D. R. (2001). Effects on Pharmaceuticals in the Environment — An Overview and Principle Considerations. *Pharmaceuticals in the Environment*, 11–17.
- PMLiVE, http://www.pmlive.com/top_pharma_list/Top_50_pharmaceutical_products (acedido em Fevereiro 7, 2019).
- Queiroz, F. B. de. (2011). *Desenvolvimento e Validação de Metodologia para Determinação de Fármacos e Perturbadores Endócrinos em Amostras de Esgoto Utilizando Extração em Fase Sólida e Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas*. Universidade Federal de Ouro Preto. Dissertação de Mestrado.
- Raimundo, C. C. M. (2011). *Contaminantes Emergentes em Água Tratada e seus Mananciais: Sazonalidade, Remoção e Atividade Estrogênica*. Universidade Estadual de Campinas Instituto de Química. Tese de Doutorado.
- Rao, A. S., Rao, A. P., Rao, M. K., & Dadhich, A. S. (2016). Development and Validation of RP-HPLC Method for Assay of Acetylsalicylic Acid in Formulations. *European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 3(5), 348–353.
- Reis-Santos, P., Pais, M., Duarte, B., Caçador, I., Freitas, A., Vila Pouca, A. S., ...

- Fonseca, V. F. (2018). Screening of Human and Veterinary Pharmaceuticals in Estuarine Waters: A Baseline Assessment for the Tejo Estuary. *Marine Pollution Bulletin*, 135(March), 1079–1084.
- Rodrigues, V. C. (2011). *Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica para a Determinação de Fármacos em Amostras de Água, Superficial e Tratada, Utilizando a Cromatografia Líquida de Ultra Performance Acoplada a Espectrometria de Massas Tandem (UPLC-MS/MS)*. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Dissertação de Mestrado.
- Salgado, R., Noronha, J. P., Oehmen, A., Carvalho, G., & Reis, M. A. M. (2010). Analysis of 65 Pharmaceuticals and Personal Care Products in 5 Wastewater Treatment Plants in Portugal Using a Simplified Analytical Methodology. *Water Science and Technology*, 62(12), 2862–2871.
- Santana, J. da S. (2013). *Determinação de Contaminantes Emergentes em Mananciais de Água Bruta e na Água para Consumo Humano do Distrito Federal*. Universidade de Brasília - Instituto de Química. Dissertação de Mestrado.
- Santos, N. da S. (2017). *Efeitos Crônicos de Carbamazepina em Danio Rerio: Uma Avaliação Multi-paramétrica*. Universidade de Aveiro. Dissertação de Mestrado.
- Sarzi-Puttini, P., Atzeni, F., Lanata, L., & Baganasco, M. (2013). Efficacy of Ketoprofen vs Ibuprofen and Diclofenac: A Systematic Review of the Literature and Meta-Analysis. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 31, 731–738.
- Shihomatsu, H. M. (2015). *Desenvolvimento e Validação de Metodologia SPE-LC-MS/MS para a Determinação de Fármacos e Droga de Abuso nas Águas da Represa Guarapiranga -São Paulo/SP, Brasil*. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Tese de Doutorado.
- Shraim, A., Diab, A., Alsuhaime, A., Niazy, E., Metwally, M., Amad, M., ... Dawoud, A. (2017). Analysis of Some Pharmaceuticals in Municipal Wastewater of Almadinah Almunawarah. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S719–S729.
- Silva, J. Y. R. (2014). *Quantificação de Cafeína em Água Utilizando a Espectroscopia no Uv-Visível e Regressão em Mínimos Quadrados parciais*. Universidade Estadual da Paraíba - Campus I. Tese de Bacharelato.
- Silva, R. F., Silva, G. L., Silva, P. T. S., & Silva, V. L. (2016). Identificação e Quantificação de Contaminantes Emergentes em Estações de Tratamento de Esgoto. *Revista Virtual de Química*, 8(3), 702–715.

- Sousa, I. E. S. (2015). *Métodos de Eliminação de Fármacos e seus Metabólitos ao Nível das Estações de Tratamento de Águas Residuais*. Universidade Fernando Pessoa. Dissertação de Mestrado.
- Souza, N. C. de. (2011). *Avaliação de Micropoluentes Emergentes em Esgotos e Águas Superficiais*. Universidade Federal do Ceará. Tese de Doutorado.
- Tambosi, J. L. (2008). *Remoção de Fármacos e Avaliação de seus Produtos de Degradação Através de Tecnologias Avançadas de Tratamento*. Universidade Federal de Santa Catarina. Tese de Doutorado.
- Togola, A., & Budzinski, H. (2008). Multi-Residue Analysis of Pharmaceutical Compounds in Aqueous Samples. *Journal of Chromatography A*, 1177, 150–158.
- Vettorello, G., Brandt, V., Dallazen Maria, Kunh, D., Etgeton, H., Spellmeyer, J., ... Hoehne, L. (2017). Emergente Micropoluentes in Water - the New Emerging Challenge. *Revista Caderno Pedagógico, Lajeado*, 14(1), 72–83.
- Vicente, G. H. L. (2001). *Desenvolvimentos e Validação de um Método Analítico para Determinação dos Fármacos Doclofenaco, Nimesulida e Paracetamol em Águas Superficiais da Cidade de São Carlos-SP*. Universidade de São Paulo - Instituto de Química de São Carlos. Dissertação de Mestrado.
- Vijayaraj, S., & Kumari, N. R. (2013). Sample Preparation in Bio Analytical Methods - A Riview. *Asian Journal of Pharmaceutical Science & Technology*, 3(1), 1–7.
- Wilms, E. B. (2005). *Azithromycin in Cystic Fibrosis - Pharmacokinetic and Therapeutic aspects of maintenance therapy*. Universidade de Utrecht. Dissertação de Doutorado.
- Yu, J. T., Bouwer, E. J., & Coelhan, M. (2006). Occurrence and biodegradability studies of selected pharmaceuticals and personal care products in sewage effluent. *Agricultural Water Management*, 86, 72–80.
- Zuccato, E., Calamari, D., Natangelo, M., & Fanelli, R. (2000). Presence of Therapeutic Drugs in the Environment. *The Lancet*, 355, 1789–1790.

8. Anexos

Anexo A – Metodologia estatística utilizada na validação do método analítico

Numa análise instrumental típica, o procedimento normal é analisar uma série de padrões nos quais a concentração do analito é conhecida. A concentração desses padrões de calibração é medida através de análise instrumental nas mesmas condições das amostras a analisar. Os resultados obtidos permitem traçar a curva de calibração, que é usada para determinar as concentrações do analito presente nas amostras por interpolação. (Miller *et al.*, 2018)

A linearidade do método é determinada de acordo com a resposta linear que o equipamento utilizado produz. Assim, é necessário confirmar até que ponto a gama de concentrações do analito coincide com a faixa dinâmica linear. A linearidade do método pode ser traduzida por uma equação matemática usada para o cálculo da concentração do analito de interesse na amostra real. (Vicente, 2001)

Nos gráficos de calibração, normalmente o sinal do instrumento encontra-se no eixo vertical (y) e as concentrações dos padrões no eixo horizontal (x).

Em cromatografia, a equação matemática (Equação 2) relaciona a linearidade entre a resposta medida (área) e a concentração do analito, onde b representa o declive e a a interceção da reta com o eixo dos yy e x é a concentração do analito representada no eixo dos xx .

$$y = a + bx \quad (\text{Equação 2})$$

A construção da curva de calibração no mínimo cinco níveis de concentração e um número de réplicas em cada nível de concentração deve ser obtido com pelo menos 3 valores cujo coeficiente de variação seja inferior a 5%. A linearidade do método é normalmente avaliada através do coeficiente de determinação, obtido pelo quadrado do coeficiente de correlação (r^2) da regressão linear.

Coeficiente de Correlação

Para se obter uma estimativa da qualidade do ajuste linear aos pontos experimentais, determina-se o coeficiente de correlação, r . (Miller *et al.*, 2018)

O valor do coeficiente de correlação, r , é determinado pela Equação 3, $\{\sum_i(x_i - \bar{x})[\sum_i(y_i - \bar{y})]\} > n$ é chamado de covariância entre as duas variáveis x e y e mede a sua variação conjunta. Se x e y não estiverem relacionados, a sua covariância será próxima de zero. O coeficiente de correlação r é igual à covariância de x e y dividido pelo produto dos seus desvios padrão; portanto, se x e y não estiverem relacionados, r também estará próximo de zero.

$$r = \frac{\sum_i\{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\{[\sum_i(x_i - \bar{x})^2][\sum_i(y_i - \bar{y})^2]\}^{1/2}} \quad (\text{Equação 3})$$

Para verificar se o coeficiente de correlação é significativo recorre-se ao cálculo de um teste estatístico, tendo em vista o número de pontos utilizados no cálculo. O método mais simples de fazer isso é calcular um valor t , usando a Equação 4. O valor calculado de t é comparado com o valor tabulado no nível de significância desejado, usando um teste t de duas caudas e $(n-2)$ graus de liberdade. (Miller *et al.*, 2018)

$$t = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \quad (\text{Equação 4})$$

Curva de regressão de y em x

A linha reta dos mínimos quadrados é dada pelas Equações 5 e 6, a linha determinada nas equações 4 e 5 é conhecida como a linha de regressão de y em x , ou seja, é a linha que indica como y varia com x .

$$\text{declive, } b = \frac{\sum_i\{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sum_i(x_i - \bar{x})^2} \quad (\text{Equação 5})$$

$$\text{ordenada na origem, } a = \bar{y} - b\bar{x} \quad (\text{Equação 6})$$

Erros no declive e interceção da curva de regressão

Os erros dos valores do declive e da ordenada na origem são importantes e devem ser calculados. A equação 7 estima a soma dos erros aleatórios na direção y , em que os valores y_i^* são os pontos na linha de regressão calculada para os valores de x correspondentes. A este parâmetro também se chama desvio padrão residual. Com o valor de $S_{y/x}$, calcula-se S_b e S_a , ou seja, o desvio padrão para o declive e o desvio padrão para a ordenada na origem, utilizando as equações 8 e 9, respetivamente.

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - y_i^*)^2}{n - 2}} \quad (\text{Equação 7})$$

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad (\text{Equação 8})$$

$$S_a = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad (\text{Equação 9})$$

Cálculo do desvio padrão do método e do coeficiente de variação do método

O desvio padrão do método, S_m e o coeficiente de variação do método, CV_m , são determinados pelas equações 10 e 11, respetivamente

$$S_m = \frac{S_{y/x}}{b} \quad (\text{Equação 10})$$

$$CV_m = \frac{S_m}{\bar{x}} \times 100 \quad (\text{Equação 11})$$

Limite de Quantificação

O limite de quantificação, LQ, é considerado o limite inferior para medições quantitativas precisas (medições com valores de incerteza baixos e aceitáveis). Neste trabalho, considera-se que o limite de quantificação é no mínimo igual ao último valor de concentração considerado na gama de linearidade obtida.

Limite de Detecção

O limite de detecção (LD) de um analito pode ser definido como a menor concentração do analito que se pode detetar com um nível de confiança pré-definido. Neste trabalho o valor do limite de detecção é estimado através da sua relação com o limite de quantificação.

$$LD = \frac{3.3}{10} LQ \quad (\text{Equação 12})$$

Precisão

A precisão, é o nível de concordância entre as análises sucessivas, sendo normalmente expressa como um desvio padrão ou desvio padrão relativo. É importante assim, distinguir entre repetibilidade, isto é, dentro da precisão da medição e reprodutibilidade, ou seja, precisão entre medições. (Miller *et al.*, 2018)

A precisão tem como objetivo avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos com a mesma amostra, de amostras semelhantes ou padrões, sempre com as mesmas condições laboratoriais. A precisão pode ser avaliada através da repetibilidade e da reprodutibilidade, sendo normalmente expressa pelo desvio padrão. (Becker, 2012)

A repetibilidade pode ser definida como a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo analito, efetuadas sob as mesmas condições (procedimento, analista, equipamento, local, em um curto espaço de tempo). Enquanto a reprodutibilidade é a concordância dos resultados da concentração de um analito sob diferentes condições de análise, podendo assim variar de laboratório, operadores e equipamento. (Pedroso, 2007)

A precisão do método pode ser avaliada através do coeficiente de variação (CV) (Equação 13), também conhecido como desvio padrão relativo (RSD - Relative Standard Deviation). O CV ou RSD, cujas unidades são obviamente percentuais, é um exemplo de erro relativo, ou seja, é uma estimativa de erro dividida por uma estimativa do valor absoluto da quantidade medida. Os erros relativos são frequentemente usados para comparar a precisão dos resultados

que têm unidades ou magnitudes diferentes e são novamente importantes nos cálculos da propagação de erros. (Miller *et al.*, 2018)

$$CV(\%) = \frac{S}{\bar{X}} \times 100 \quad (\text{Equação 13})$$

Onde:

S - Desvio padrão de 6 medidas da solução de calibração para um nível de concentração selecionado (neste trabalho, uma mistura padrão de fármacos com a concentração de 50 ppm para cada fármaco);

\bar{X} - Média aritmética dos valores das 6 medidas da solução de calibração para um nível de concentração selecionado (neste trabalho, uma mistura padrão de fármacos com a concentração individual de 50 ppm).

Anexo B – Tratamento estatístico das curvas de calibração

Sulfametoxazol

Tabela B 1. Dados experimentais utilizados para as curvas de calibração do Sulfametoxazol.

C (ppm)	A1 (μUA)	A2 (μUA)	A3 (μUA)	Área média	CV (%)
100	6751494	7216967	7151982	7040148	2.9
75	5157711	5354836	5288668	5267072	1.6
50	3716864	3371416	3743564	3610615	4.7
25	1944245	1946592	1690464	1860434	6.5
10	865626	870709	808410	848248	3.3
5	417593	445463	428570	430542	2.7
1	96439	109464	97393	101099	5.9
0.75	69685	70652	66225	68854	2.8
0.7	65914	63495	64229	64546	1.6
0.6	64041	61770	61183	62331	2.0
0.5	47066	43016	46346	45476	3.9
0.3	27378	28489	30406	28758	4.3
0.4	37942	36046	37815	37268	2.3
0.25	27028	23243	25868	25380	6.2
0.2	20715	20615	19261	20197	3.3
0.1	13208	12577	11637	12474	5.2
0.05	6181	6589	6213	6328	2.9
0.04	5918	6191	6127	6079	1.9
0.03	4765	5743	4290	4933	12.3
0.02	4596	3093	4477	4055	16.8
0.01	2547	3143	3125	2938	9.4
0.005	2960	2544	1961	2488	16.5

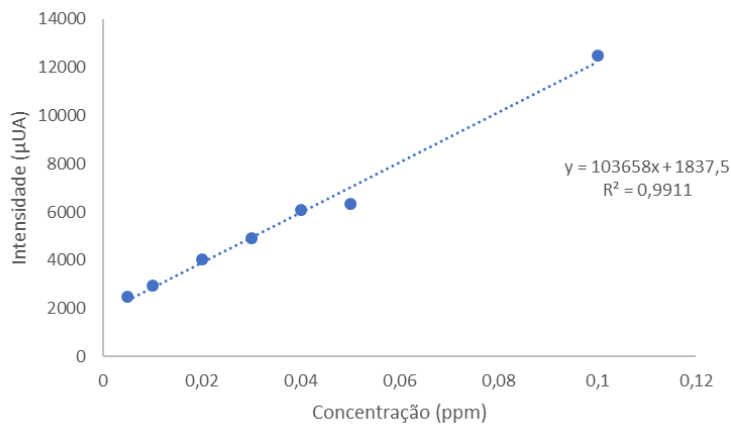
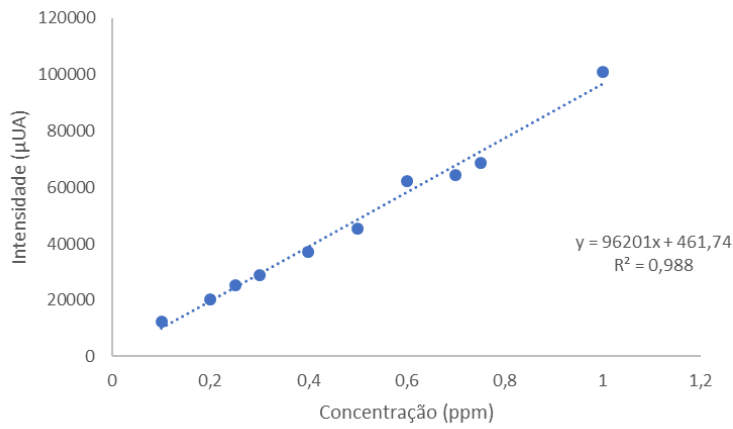
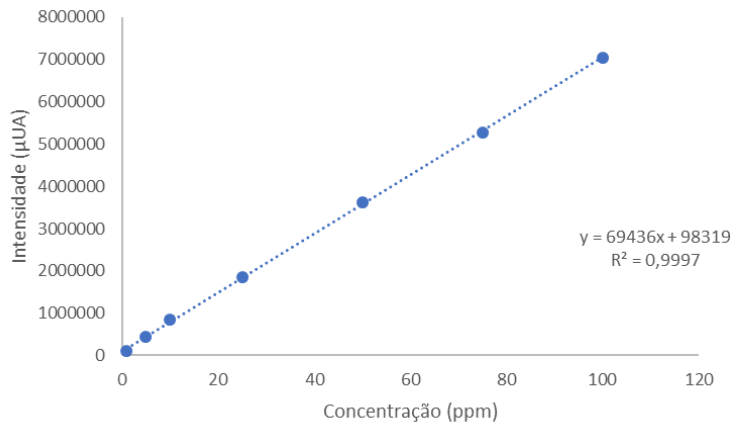
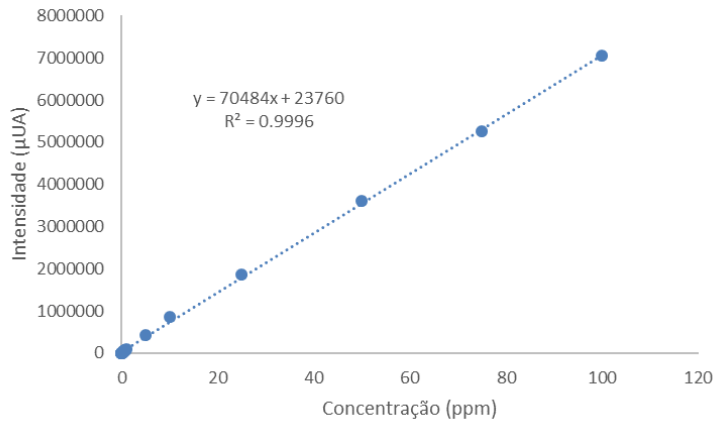


Figura B 1 – Curvas de calibração do sulfametoxazol (4 gamas lineares)

Paracetamol

Tabela B 2. Dados do Paracetamol utilizados para as curvas de calibração.

C (ppm)	A1 (μUA)	A2 (μUA)	A3 (μUA)	A média	CV (%)
100	5927345	6454926	6514809	6299027	4.2
75	4827524	5070864	4602523	4833637	4.0
50	3353921	3143652	3462428	3320000	4.0
25	1914163	1930006	1655441	1833203	6.9
10	830298	839213	772180	813897	3.7
5	375610	397203	385140	385984	2.3
1	48958	63437	50437	54277	12.0
0.75	61599	23242	43620	42820	36.6
0.7	40026	35342	39177	38182	5.3
0.6	26869	30535	18646	25350	19.6
0.5	15357	23707	26224	21763	21.3
0.4	10349	18777	23895	17674	31.6
0.3	10827	4451	3051	6110	55.4
0.25	5520	1647	4783	3983	42.2

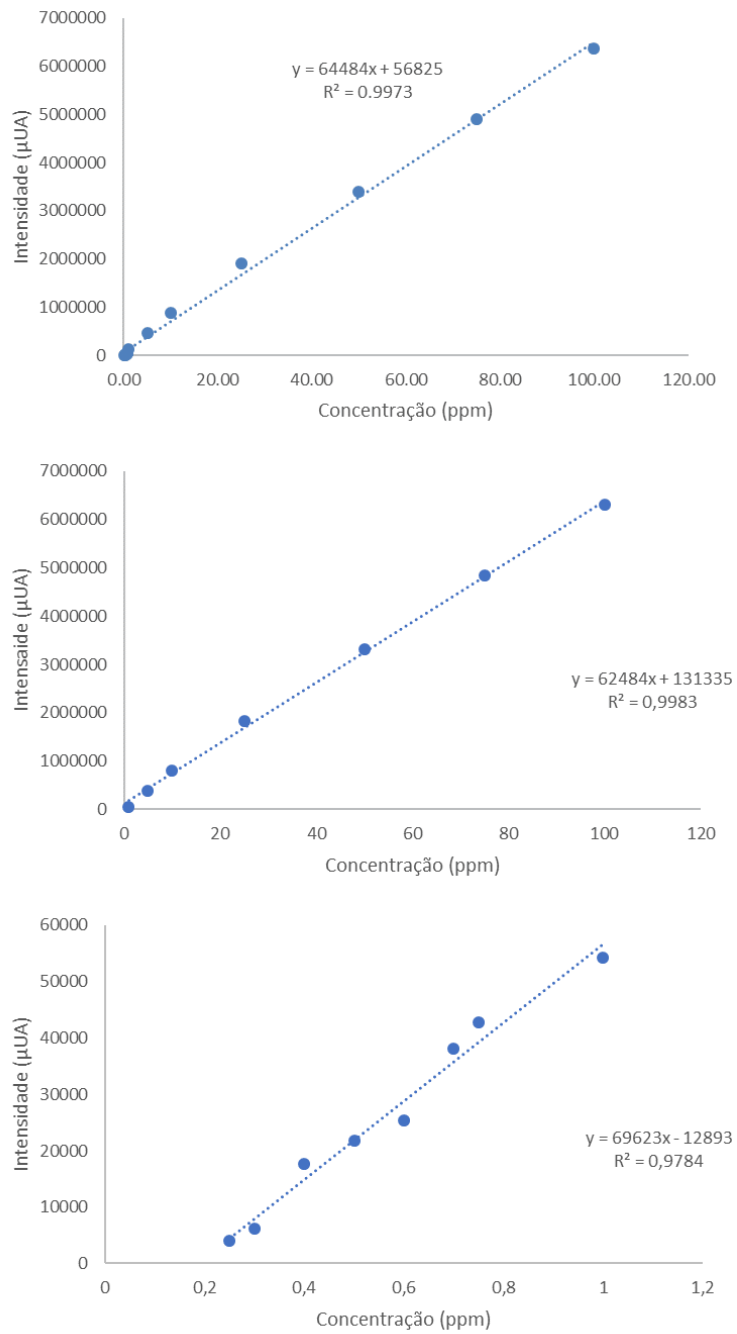


Figura B 2 – Curvas de calibração do paracetamol (3 gamas lineares)

Cafeína

Tabela B 3. Dados da cafeína utilizados para as curvas de calibração.

C (ppm)	A1 (μUA)	A2 (μUA)	A3 (μUA)	A média	CV (%)
100	5070813	5353577	5297812	5240734	2.3
75	3826307	3928816	3902834	3885986	1.1
50	2674825	2438248	2688142	2600405	4.4
25	1314335	1323254	1188897	1275495	4.8
10	541035	545381	521003	535806	2.0
5	254353	253817	256870	255013	0.5
1	53064	55706	53280	54017	2.2
0.75	37038	33556	43505	38033	10.8
0.25	10002	9293	15204	11500	22.9
0.1	5299	5891	5375	5522	4,8
0.05	4763	4853	4622	4746	2.0
0.04	4050	3524	4798	4124	12.7

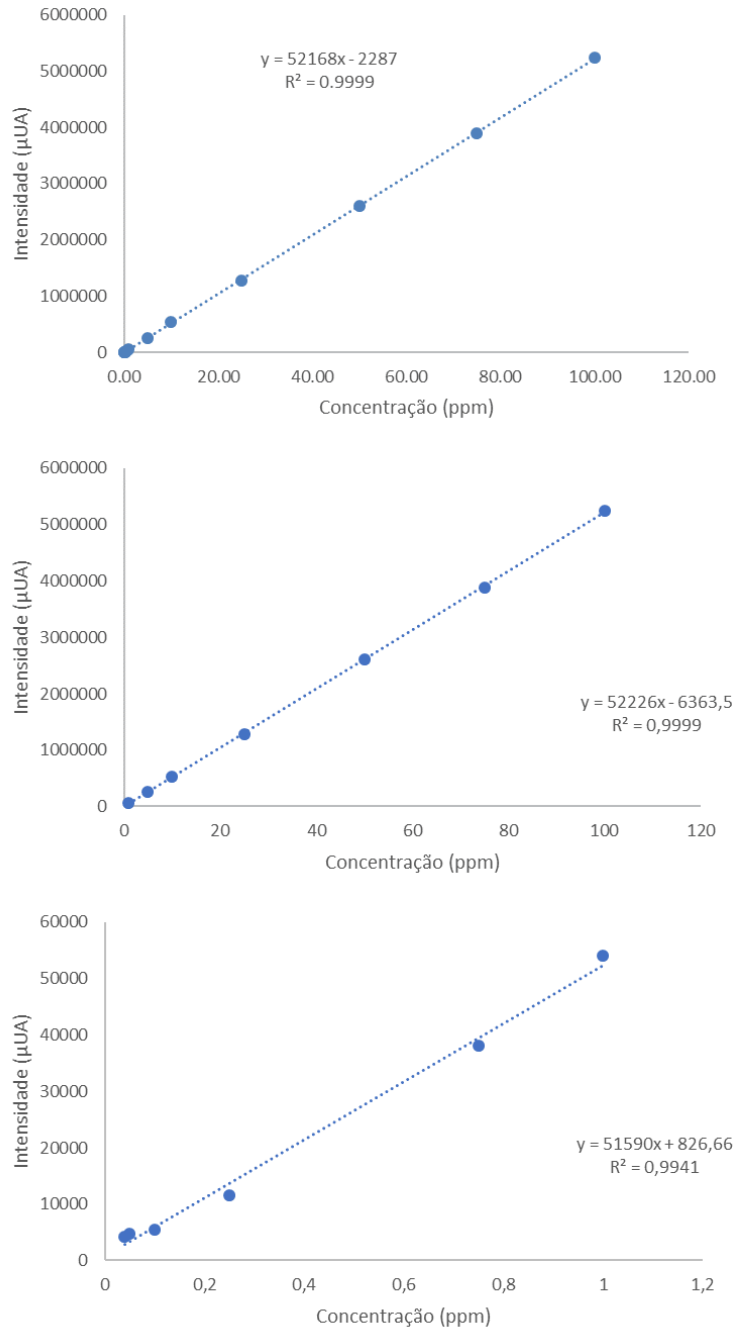


Figura B 3 – Curvas de calibração da cafeína (3 gamas lineares)

Carbamazepina

Tabela B 4. Dados da carbamazepina utilizados para as curvas de calibração.

C (ppm)	A1 (μUA)	A2 (μUA)	A3 (μUA)	A média	CV (%)
100	5200198	5440540	5482945	5374561	50.1
75	3913011	4036937	4038034	3995994	1.5
50	2819761	2558086	2823693	2733847	4.5
25	1448035	1498873	1295157	1414022	6.1
10	670816	618813	588821	626150	5.4
5	296461	295758	363335	318518	9.9
1	177187	104337	134691	138738	21.5
0.75	29262	34516	32612	32130	6.8
0.7	22201	35525	23965	27230	21.7
0.6	20878	34782	21059	25573	25.5
0.5	23520	14069	22700	20096	21.3
0.4	22156	17384	16563	18701	13.2
0.3	15436	8714	18012	14054	27.9

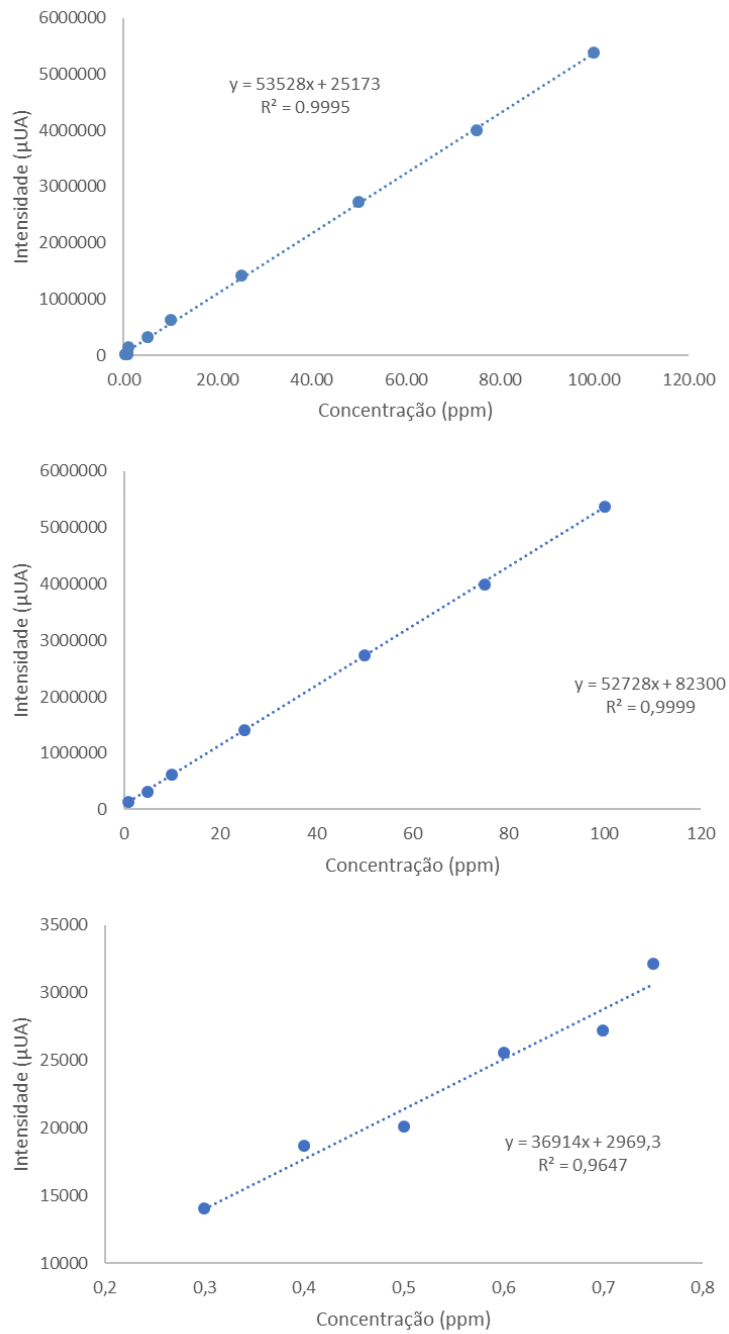


Figura B 3 – Curvas de calibração da carbamazepina (4 gamas lineares)

Anexo C – Determinação das eficiências de extração utilizando na análise por HPLC-DAD uma coluna Nucleosil 100-5 C18)

Cafeína

Tabela C 1. Cálculo para o caudal utilizado em cada etapa de SPE no padrão de cafeína.

Etapa	Volume (ml)	Tempo (min)	Tempo (s)	Tempo total (s)	Tempo total (min)	Q (mL.min ⁻¹)
Condicionamento (MeOH)	5	21	44	1304	21.73	0.23
Condicionamento (W)	5	11	34	694	11.57	0.43
Extração	10	24	29	1469	24.48	0.41
Lavagem	5	8	13	493	8.22	0.61
Eluição	8	39	13	2353	39.22	0.20

Tabela C 2. Cálculo da eficiência de extração de SPE no padrão de cafeína.

Concentração da Amostra (ppm)	35
Área do pico da amostra	1976910
Área do pico da eluição	2487469
Volume do Loop (L)	2.00E-05
Massa da amostra injetada no HPLC (mg)	7.00E-04
Massa da eluição injetada no HPLC (mg)	0.000880783
Massa adicionada ao cartucho (mg)	0.35
Massa recuperada do cartucho (mg)	0.35231
Concentração da Eluição (ppm)	44.04
Recuperação em conc (%)	125.83
Recuperação em massa (%)	100.66

Paracetamol

Tabela C 3. Cálculo para o caudal utilizado em cada etapa de SPE no padrão de paracetamol.

Etapa	Volume (ml)	Tempo (min)	Tempo (s)	Tempo total (s)	Tempo total (min)	Q (mL.min ⁻¹)
Condicionamento (MeOH)	5	17	41	1061	17.68	0.28
Condicionamento (W)	5	12	35	755	12.58	0.40
Extração	10	15	8	908	15.13	0.66
Lavagem	5	7	40	460	7.67	0.65
Eluição	8	35	78	2178	36.30	0.22

Tabela C 4. Cálculo da eficiência de extração de SPE no padrão de paracetamol.

Concentração da Amostra (ppm)	35
Área do pico da amostra	4841274
Área do pico da eluição	5696412
Volume do Loop (L)	2.00E-05
Massa da amostra injetada no HPLC (mg)	7.00E-04
Massa da eluição injetada no HPLC (mg)	0.000823644
Massa adicionada ao cartucho (mg)	0.35
Massa recuperada do cartucho (mg)	0.32946
Concentração da eluição (ppm)	41.18
Recuperação em conc (%)	117.66
Recuperação em massa (%)	94.13

Sulfametoxazol

Tabela C 5. Cálculo para o caudal utilizado em cada etapa de SPE no padrão de sulfametoxazol.

Etapa	Volume (ml)	Tempo (min)	Tempo (s)	Tempo total (s)	Tempo total (min)	Q (mL.min ⁻¹)
Condicionamento (MeOH)	5	16	44	1004	16.73	0.30
Condicionamento (W)	5	7	30	450	7.50	0.67
Extração	10	20	11	1211	20.18	0.50
Lavagem	5	6	11	371	6.18	0.81
Eluição	8	52	11	3131	52.18	0.15

Tabela C 6. Cálculo da eficiência de extração de SPE no padrão de sulfametoxazol.

Concentração da Amostra (ppm)	35
Área do pico da amostra	3277527
Área do pico da eluição	3545177
Volume do Loop (L)	2.00E-05
Massa da amostra injetada no HPLC (mg)	7.00E-04
Massa da eluição injetada no HPLC (mg)	0.000757164
Massa adicionada ao cartucho (mg)	0.35
Massa recuperada do cartucho (mg)	0.30287
Concentração da Eluição (ppm)	37.86
Recuperação em conc (%)	108.17
Recuperação em massa (%)	86.53

Carbamazepina

Tabela C 7. Cálculo para o caudal utilizado em cada etapa de SPE no padrão de carbamazepina.

Etapa	Volume (ml)	Tempo (min)	Tempo (s)	Tempo total (s)	Tempo total (min)	Q (mL.min⁻¹)
Condicionamento (MeOH)	5	31	35	1895	31.58	0.16
Condicionamento (W)	5	10	26	626	10.43	0.48
Extração	10	9	50	590	9.83	1.02
Lavagem	5	5	1	301	5.02	1.00
Eluição	8	33	15	1995	33.25	0.24

Tabela C 8. Cálculo da eficiência de extração de SPE no padrão de carbamazepina.

Concentração da Amostra (ppm)	19
Área do pico da amostra	1339165
Área do pico da eluição	1270668
Volume do Loop (L)	2.00E-05
Massa da amostra injetada no HPLC (mg)	3.80E-04
Massa da eluição injetada no HPLC (mg)	0.000360563
Massa adicionada ao cartucho (mg)	0,9
Massa recuperada do cartucho (mg)	0.14423
Concentração da Eluição (ppm)	18.03
Recuperação em conc (%)	94.89
Recuperação em massa (%)	75.91

Anexo D – Determinação das eficiências de extração utilizando na análise por HPLC-DAD uma coluna SiliaChrom XT C18

Sulfametoxazol

Tabela D 1. Cálculo para o caudal utilizado em cada etapa de SPE no padrão de sulfametoxazol.

Etapa	Volume (ml)	Tempo (min)	Tempo (s)	Tempo total (s)	Tempo total (min)	Q (mL.min ⁻¹)
Condicionamento (MeOH)	5	20	19	1219	20.32	0.25
Condicionamento (W)	5	7	0	420	7.00	0.71
Extração	10	20	8	1208	20.13	0.50
Lavagem	5	11	20	680	11.33	0.44
Eluição	8	22	16	1336	22.27	0.36

Tabela D 2. Cálculo da eficiência de extração de SPE no padrão de sulfametoxazol.

Concentração da Amostra (ppm)	35
Área do pico da amostra	3788039
Área do pico da eluição	4322091
Volume do Loop (L)	2,00E-05
Massa da amostra injetada no HPLC (mg)	7.00E-04
Massa da eluição injetada no HPLC (mg)	0.000798689
Massa adicionada ao cartucho (mg)	0.35
Massa recuperada do cartucho (mg)	0.31948
Concentração da Eluição (ppm)	39.93
Recuperação em conc (%)	114.10
Recuperação em massa (%)	91.28

Cafeína

Tabela D 3. Cálculo para o caudal utilizado em cada etapa de SPE no padrão de cafeína.

Etapa	Volume (ml)	Tempo (min)	Tempo (s)	Tempo total (s)	Tempo total (min)	Q (mL.min ⁻¹)
Condicionamento (MeOH)	5	9	15	555	9.25	0.54
Condicionamento (W)	5	5	0	300	5.00	1.00
Extração	10	18	2	1082	18.03	0.55
Lavagem	5	15	55	955	15.92	0.31
Eluição	8	28	60	1740	29.00	0.28

Tabela D 4. Cálculo da eficiência de extração de SPE no padrão de cafeína.

Concentração da Amostra (ppm)	35
Área do pico da amostra	2917792.33
Área do pico da eluição	3329019.67
Volume do Loop (L)	2.00E-05
Massa da amostra injetada no HPLC (mg)	7.00E-04
Massa da eluição injetada no HPLC (mg)	0.000798656
Massa adicionada ao cartucho (mg)	0.35
Massa recuperada do cartucho (mg)	0.31946
Concentração da Eluição (ppm)	39.93
Recuperação em conc (%)	114.09
Recuperação em massa (%)	91.28

Paracetamol

Tabela D 5. Cálculo para o caudal utilizado em cada etapa de SPE no padrão de paracetamol.

Etapa	Volume (ml)	Tempo (min)	Tempo (s)	Tempo total (s)	Tempo total (min)	Q (mL.min ⁻¹)
Condicionamento (MeOH)	5	12	20	740	12.33	0.41
Condicionamento (W)	5	7	49	469	7.82	0.64
Extração	10	10	20	620	10.33	0.97
Lavagem	5	9	50	590	9.83	0.51
Eluição	8	27	40	1660	27.67	0.29

Tabela D 6. Cálculo da eficiência de extração de SPE no padrão de paracetamol.

Concentração da Amostra (ppm)	35
Área do pico da amostra	3488594.67
Área do pico da eluição	3677706.67
Volume do Loop (L)	2.00E-05
Massa da amostra injetada no HPLC (mg)	7.00E-04
Massa da eluição injetada no HPLC (mg)	0.000737946
Massa adicionada ao cartucho (mg)	0.35
Massa recuperada do cartucho (mg)	0.29518
Concentração da eluição (ppm)	36.90
Recuperação em conc (%)	105.42
Recuperação em massa (%)	84.34

Carbamazepina

Tabela D 7. Cálculo para o caudal utilizado em cada etapa de SPE no padrão de carbamazepina.

Etapa	VOLUME (ml)	Tempo (min)	Tempo (s)	Tempo total (s)	Tempo total (min)	Q (mL.min ⁻¹)
Condicionamento (MeOH)	5	20	44	1244	20.73	0.24
Condicionamento (W)	5	4	27	267	4.45	1.12
Extração	10	20	2	1202	20.03	0.50
Lavagem	5	7	17	437	7.28	0.69
Eluição	8	26	5	1565	26.08	0.31

Tabela D 8. Cálculo da eficiência de extração de SPE no padrão de carbamazepina.

Concentração da Amostra (ppm)	35
Área do pico da amostra	2056665.33
Área do pico da eluição	2163844.33
Volume do Loop (L)	2.00E-05
Massa da amostra injetada no HPLC (mg)	7.00E-04
Massa da eluição injetada no HPLC (mg)	0.000736479
Massa adicionada ao cartucho (mg)	0.35
Massa recuperada do cartucho (mg)	0.29459
Concentração da Eluição (ppm)	36.82
Recuperação em conc (%)	105.21
Recuperação em massa (%)	84.17

Mistura de Fármacos

Tabela D 9. Cálculo da eficiência de extração de SPE para a mistura padrão de fármacos.

	Carbamazepina	Sulfametoxazol	Paracetamol	Cafeína
Concentração da Amostra (ppm)	35	35	35	35
Área do pico da amostra	1879140	2433239	2740485	2193334
Área do pico da eluição	2479531	3324683	3560714	3015790
Volume do Loop (L)	2.00E-05	2.00E-05	2.00E-05	2.00E-05
Massa da amostra injetada no HPLC (mg)	7.00E-04	7.00E-04	7.00E-04	7.00E-04
Massa da eluição injetada no HPLC (mg)	9.24E-04	9.56E-04	9.10E-04	9.62E-04
Massa adicionada ao cartucho (mg)	0.35	0.35	0.35	0.35
Massa recuperada do cartucho (mg)	0.36946	0.38258	0.36380	0.38499
Concentração da Eluição (ppm)	46.18	47.82	45.48	48.12
Recuperação em conc (%)	131.95	136.64	129.93	137.50
Recuperação em massa (%)	105.56	109.31	103.94	11.,00

Anexo E – Folha de especificações da coluna cromatográfica Nucleosil 100-5 C18

MACHEREY-NAGEL



NUCLEOSIL® RP columns

www.mn-net.com

Note: All HPLC columns from MACHEREY-NAGEL are supplied with a certificate, which contains specifications and test results of the column. NUCLEOSIL® RP columns are quality products based on the robust silica NUCLEOSIL®. They are specifically developed for HPLC analysis. If carefully and properly used excellent chromatographic results and long column lifetime can be achieved. HPLC columns are designed for qualitative and quantitative analysis of mixtures of substances and single components. They must exclusively be used in accordance with universally accepted laboratory regulations and HPLC working methods. Before running the column the entire analytical system (column and equipment) has to be carefully checked by the operator. Chromatographic conditions (mobile phase, flow, temperature etc.) must be adapted to the analytical task. MACHEREY-NAGEL does not give any warranty and is not liable for the success of a separation or application. If you have any questions after reading this manual, please call our service / technical support.

Table of contents

- Safety indication
- Description of the column
- Installation
- Pre-column filter and guard columns
- Sample
- Eluent
- Flow rate and pressure
- Temperature
- Detection
- Equilibration
- Column storage
- Troubleshooting
- Column regeneration
- Abstract

Safety indication

Follow the general safety instructions for handling of HPLC solvents used as mobile phases (e.g., acetonitrile, methanol) and take precautions against any kind of injuries or damage to health (e.g., skin and eye protection in case of broken capillaries). Disposal of used HPLC columns must follow international, national and local environmental protection regulations. The use of HPLC columns is only permitted to staff members, who are qualified in their field. Keep HPLC columns away from children. MACHEREY-NAGEL disclaims and excludes all warranties of any kind or nature whatsoever and MN shall not be liable for any damages (whether direct, indirect, foreseeable, incidental, compensatory, consequential or special), whether based upon warranty contract, tort or strict liability, if damages and/or losses occur caused by improper use, maintenance, neglect or improper treatment (especially opening of the column and exposure of the column bed).

Description of the column

As stationary phase NUCLEOSIL® RP columns contain a C₁₈, C₈ or special RP phase based on spherical silica (type A), modified with a special method.

NUCLEOSIL® RP phase	Modification	Property / Stability
C ₁₈ /C ₁₈ ec	octadecyl, endcapping	hydrophobic, weakly polar, pH 2-8
C ₈ ec	octyl, endcapping	weakly hydrophobic, weakly polar, pH 2-8
C ₈	octyl, no endcapping	weakly hydrophobic, polar, pH 2-8
C ₁₈ HD	octadecyl, high density, endcapping	strongly hydrophobic, pH 2-9, LC/MS
C ₈ HD	octyl, high density, endcapping	hydrophobic, weakly polar, pH 2-8, LC/MS
C ₁₈ AB	octadecyl, specially crosslinked, endcapping	strongly hydrophobic, high steric selectivity, pH 1-9, LC/MS
C ₁₈ Nautilus	octadecyl phase with embedded polar group, endcapping	hydrophobic, polar, stable in 100% aqueous eluents, pH 2-8
Protect I	RP phase with embedded polar group, endcapping	hydrophobic, polar, stable in 100% aqueous eluents, pH 2-8

Descriptions of the columns NUCLEOSIL® C₁₈, C₈, C₈H₂ ec, C₁₈ PPN, C₁₈ MPN, C₈ MPN and further RP columns can be found on www.mn-net.com. They can be used and treated in reference to this manual.

Installation

The column should be installed in the flow direction indicated on the column label. It is connected with 1/16" capillaries and fittings, typical for HPLC systems.

Pre-column filter and guard columns

A pre-column filter containing 0.5-2.0 µm porosity stainless steel frits is recommendable between sample injector and column to remove particulates from the eluent stream. For protection and an extension of column lifetime the column should always be used with a guard column. The filter elements and the adsorbent in the guard column retain contaminants from the sample or the eluent. Connection of the guard column with the separation column is made by a suitable guard column holder (see www.mn-net.com or the MN chromatography catalog). Cartridge replacement is required when increased column pressure and/or loss of performance is observed.

Sample

Sample solutions should be passed through a syringe filter (e.g., CHROMAFIL® Xtra PET, 0.45 µm, 25 mm, REF 729220) before entering the column. If injected sample solutions are still turbid even after filtration, the lifetime of the column may be significantly reduced. The sample volume should be as small as possible to achieve an optimal resolution.

Eluent

RP columns are supplied with the eluent acetonitrile – water (depending on the type 80:20, 70:30 or 60:40, v/v; see column certificate for details). As mobile phase typical RP eluents (e.g., acetonitrile or methanol with pure water or buffer) can be used. Eluents should be filtered through a 0.2-0.45 µm membrane filter and degassed. Please consider the pH stability of the used column. Strong acidic or basic conditions can result in dissolution of the organic modification on the column bed. The amount of buffer salts should be kept as low as possible. Note the solubility limit of the buffer in the eluent. The increase of the organic portion can result in precipitation of buffer salts and plugging of the column. Before start of operation with eluent containing a buffer the column should be first preconditioned with a minimum of 10 column volumes acetonitrile – water (25:75, v/v). Always after finishing measurements with buffer-containing eluents the column should be regenerated (see column regeneration). Use of ion pair reagents with phases with embedded polar groups can result in unspecific non-reproducible interactions.

Flow rate and pressure

Flow rate (recommended for analytical columns: 0.2-2.0 mL/min) influences the time required, the resolution and the column lifetime. It is limited by the maximum column back pressure, which should not exceed the limits listed in the table below.

Silica	Inner diameter [mm]	Maximum pressure [bar]												
		2	3	4	4.6	8	10	16	21	32	40	50		
NUCLEOSIL® 50 Å, 120 Å		400	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400
NUCLEOSIL® 300 Å		300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
NUCLEOSIL® 600 Å		250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
NUCLEOSIL® 1000 Å, 4000 Å		200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200

In mixtures of methanol and water viscosity reaches a maximum at about 40% methanol. For this reason a reduced flow rate is recommended, when changing the eluent composition. We recommend controlling back pressure regularly. If a high pressure results from the use of the column at nominal flow rates, this usually indicates that some contaminants have become deposited on the packing material, which must be removed (see troubleshooting).

Temperature

Column temperatures up to 60 °C are possible; for a long lifetime 30-40 °C is recommended. However, they should be at least 30 °C below the boiling temperature of the eluent, in order to ensure proper detection. Variation of the temperature influences retention times and especially the peak shape. Optimum temperatures for successful separations should be determined empirically.

Detection

Spectrophotometers, refractometers and electrochemical detectors can be used with the columns. NUCLEOSIL® C₁₈ AB, C₁₈ HD or C₈ HD are also suitable for LC/MS detection. If a higher sensitivity is required, post-column derivatizations with an appropriate detector for the reaction product can be used.

Equilibration

Prior to measurement of samples the column must be rinsed with the eluent at the same flow rate and temperature as the method to be applied. Column equilibration is finished, when the baseline of the detector no longer shows a drift (generally after 10 column volumes).

Column storage

The original eluent (see eluent) is recommended for storage. For long-term storage mobile phases containing inorganic salts are not recommended (for a removal of buffer see column regeneration). Methanol is also not recommended for a longer storage, because of a possible impurity with metal ions (e.g., iron(II)). For column storage be sure the end fittings are tightly sealed using column end plugs, because storage without these seals can result in drying of the packing material. Under these circumstances rinse the column with approx. 10 column volumes of the eluent of storage at a flow rate of max. 0.2 mL/min.

Troubleshooting

The following outline describes the symptoms of performance loss and their cause. All columns are subject to the strict regulation and control of our quality assurance system. Columns based on silica are robust and hold their separation efficiency for long periods by correct maintenance and treatment. According to experience, column failures are mostly a result of injection of contaminants to the sorbent bed. The usage of a guard column, as well as an appropriate sample pretreatment will help to minimize these risks. Use the routine below to help determine the cause of a possible performance loss:

Symptom / Error / Cause	Prevention / Repair
Baseline drift - insufficient period for equilibration with the eluent - contaminated eluent - temperature	longer or better equilibration use freshly prepared solvents and reagents column temperature control
Broad peaks - mixing and/or diffusion before/behind the column - too large sample volume	keep length and ID of capillaries at a minimum smaller injection volume
Peak interference; too fast elution too fast elution and/or insufficient separation by: - improper column temperature or flow rate - elution power of eluent is too high	optimize concerned parameter optimize eluent system
Increasing back pressure; degradation of the separation performance contamination of sorbent by: - particulate accumulation on frit or sorbent bed from sample, eluent or system - precipitation of buffer salts	prepare fresh eluent; prefilter samples and eluent. use in-line filter / rinse LC system, clean the sorbent check solubility of buffer salts before / remove them by rinsing (see column regeneration)
Insufficient separation; degradation of the separation with regular column pressure contamination with: - fats, oils, lipids from sample (coating of sorbent surface) and other organic substances from improperly prepared eluent or matrices	remove organic substances by sample preparation / clean the sorbent (see column regeneration)
Double peaks (dead volume) - faulty fittings (capillaries, ferrules, nuts) - dissolution of silica by too high pH value of eluent	use "PEEK Fingertight Fittings", REF 718770 or REF 718778 / replace fittings consider pH range of column / replace column

Column regeneration

In some cases the performance of the column can be restored by removing contaminants from the sorbent bed or by regeneration of the phase. It is important, however, to locate the source of contamination before again using the column for the analysis of samples.

- Prepare fresh eluent:** A performance loss is not seldom traced to eluent contamination. Therefore, prepare fresh eluent and flush all liquid lines before using the column again. The eluent should be filtered through a 0.2-0.45 µm membrane and degassed prior to use.
- Cleaning of sorbent:** To remove contamination rinse the column with a minimum of 10 column volumes (see table below) at the original flow rate and temperature as follows:
 - acetonitrile – water or methanol – water (10:90, v/v) for removal of the buffer
 - 100% methanol to remove polar organic compounds
 - 100% acetonitrile to remove medium polar organic compounds (possibly T= 40 °C)
 - 100% tetrahydrofuran to remove nonpolar organic compounds
 - if necessary, 100% tetrahydrofuran with inverse flow direction at 1/5 of original flow rate
 - convert column to storage condition using acetonitrile – water (80:20, 70:30 or 60:40, v/v) at original flow rate

An adequate indicator for a clean column is a constant baseline. At constant temperature you should observe less than 2-3 mAU drift during a running time of 5 minutes with an isocratic run. After the usage of buffer, directly after finishing a measurement and always before storage of the column rinse with a minimum of 10 column volumes at the original flow rate and temperature as follows:

- acetonitrile – water or methanol – water (10:90, v/v) for removal of the buffer
- increase the organic part in steps of 20% to the conditions of a new measurement run
- or gradually increase the part of acetonitrile in steps of 20% to the storage conditions

3. Column replacement: The above procedures will restore performance only in certain cases. Some organic contaminants are particularly refractory and may not respond to treatment. Also dead volume, due to column compression can generally not be repaired. Under these circumstances, column replacement is necessary. It is highly advisable to locate the cause of the problem before installing a new column.

Length [mm]	Inner diameter [mm]	Column volume [mL]			
		2	3	4	4.6
100	0.30	0.70	1.25	1.65	
150	0.45	1.05	1.90	2.50	
250	0.80	1.75	3.15	4.15	

Abstract

- To extend column lifetime, please keep in mind the following:
- As RP eluents organic-aqueous eluent systems (e.g., acetonitrile or methanol – water or buffer) are recommended. Please consider column regeneration after usage of buffers. Eluents should be filtered through a 0.2-0.45 µm membrane and degassed.
 - Filter samples through a 0.2-0.45 µm CHROMAFIL® Xtra PET syringe filter before injection.
 - Use an in-line filter and/or a guard column for protection against impurities.
 - The recommended flow rate is 0.2-2.0 mL/min.
 - Adjust flow rate to keep column pressure below the maximum value of your column.
 - Store the column in acetonitrile – water (80:20, 70:30 or 60:40, v/v) after removal of buffer salts.
 - Use analytical grade reagents and HPLC grade solvents for all work. Discard any solutions that show evidence of bacterial growth.

Please check the full range of MACHEREY-NAGEL chromatography products!



... for applicative support please visit our website with more than 4000 chromatography applications: www.mn-net.com/apps

Germany and international:
MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG
Neumann-Neudorf Str. 6-8 53229 Ulmen - Germany
Tel.: +49 24 21 969-0 Fax: +49 24 21 969-199
info@mn-net.com - www.mn-net.com

Switzerland:
MACHEREY-NAGEL AG
Hörsibergstr. 4 7102 Oensingen - Switzerland
Tel.: 062 388 55 00 Fax: 062 388 55 05
sales-ch@mn-net.com

France:
MACHEREY-NAGEL SARL, à associé unique
1, rue Gutenberg 67222 Hœrsching - France
Tel.: 03 88 88 22 68 Fax: 03 88 51 76 88
sales-fr@mn-net.com

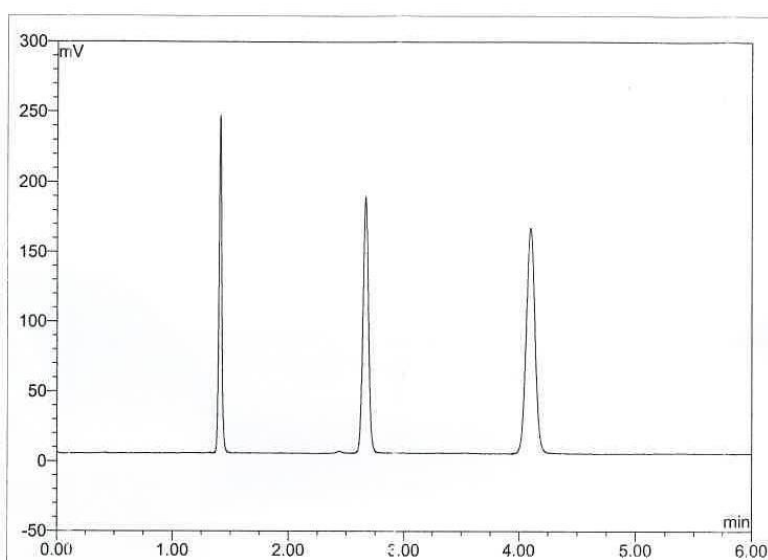
USA:
MACHEREY-NAGEL INC.
2920 Emick Boulevard - Bethlehem, PA 18020 - USA
Tel.: 484 821 0984 Fax: 484 821 1272
sales-us@mn-net.com

CERTIFICATE

HPLC column

EC 150/4.6 NUCLEOSIL 100-5 C18

REF	720120.46	SN	N10090437
Stat. Phase:	NUCLEOSIL 100-5 C18	LOT	21300072
Particle Size [µm]:	5	Internal Diameter [mm]:	4.6
Length [mm]:	150		



Chromatographic Conditions:

Mobile Phase:	Acetonitrile : Water (80:20)	Injection Volume [µl]:	3.0
Flow Rate [ml/min]:	1.30	Pressure [bar]:	65
Temperature [°C]:	RT	Detection:	UV, 254 nm

No.	Compound	Retention Time [min]
1	Phenol	1.41
2	Naphthalene	2.67
3	Anthracene	4.10

Chromatographic Results:

Test Compound:	Anthracene	Specifications:
Theoretical Plates [1/m]:	94787	< 15
HETP [µm]:	10.6	0.8 - 1.4
Asymmetry:	1.09	

QC passed: 

MACHERY-NAGEL



www.mn-net.com

09320UD/A031459

Anexo E – Folha de especificações da coluna cromatográfica SiliaChrom XT C18



HPLC Column Use Instruction

General Information

Superior HPLC columns can be produced only with excellent packing materials and superb packing technique. SiliaChrom® columns are well known for their high efficiency and high resolution separations using extremely pure silica. Based on spherical, totally porous silica, SiliaChrom® columns provide enhanced chemical and mechanical stability as well as very high surface coverage and full end-capping as required. All SiliaChrom® columns are packed using a proprietary slurry packing process to achieve uniform and column-to-column reproducibility. The SiliaChrom® columns have good selectivity, good asymmetry and long lifetime for HPLC separation of acidic, neutral and basic organic compounds, polar or non-polar.

Installation and Operation

When a column is shipped or not in use, it is always capped at both ends. Remove the end caps only when the column is to be installed on a system. Users should always follow the flow direction as labeled on the columns when they connect them with any HPLC systems except for special purposes, such as removal of the inlet pluggage. Column connection should be done properly following the instructions.

If ferrules are over tightened, not set properly, or are not specific for the fitting, leakage can occur. Please read the column connection instruction as follows:

- (a) Place a male nut and a ferrule, in order, onto a 1/16" OD piece of tubing. Be certain that the wider end of the ferrule is against the nut.
- (b) Press the tubing firmly into the column end fitting. Slide the nut and ferrule forward, engage the threads, and finger-tighten the nut.
- (c) While continuing to press the tube firmly into the column end fitting, use a 1/4" wrench to tighten the nut 90 degrees past finger-tightness.
- (d) Repeat this procedure for the other end of the column.

New columns are usually shipped with a mixture of one organic solvent (methanol or acetonitrile) and water. During a period of shipping and storage, the packing in the column could be dried out. It is recommended that 10-20 column volumes of organic solvents, such as methanol or acetonitrile, be purged through the column, followed by flushing the column with your mobile phase at the operational flow rate until the baseline is stable. If the column backpressure and baseline fluctuate, this might be due to the air bubbles trapped inside the column or the flow cell. Flush the column with organic solvent at higher flow rate for 2-5 minutes, for example 2mL/min for 4.6x150mm; or increase the pack pressure at the outlet of the flow cell using a backpressure regulator.

Safety Precaution

SiliaChrom® columns are normally operated under high pressure. Any loose connections will cause leaking of organic solvents and the injected samples, which should be considered as hazards. In the case of leaking, proper gloves should be worn for handling the leaks. Opening columns by users is not recommended. When opening a column, proper protections should be used to avoid inhalation of the small silica particles.

Samples and Mobile Phases

To avoid clogging the column, all samples and mobile phases should be filtered through 0.45µm or 0.20µm filters before use. It is recommended that the mobile phase contains at least 5% organic solvents such as methanol, acetonitrile. The mobile phase should always be degassed before use. A simple way for degassing is to sonicate the solution for 5 minutes under slight vacuum.

Column Care

pH Avoid use of SiliaChrom® XT C18 below pH 1.0 or above 12.0*. Higher pH will dissolve silica, causing separation efficiency loss and retention time change. The optimum performance and operation for longest lifetime are at pH 2.0 - 8.5.

Pressure Although SiliaChrom® columns can tolerate pressure up to 400 bar, the normal operation should be under 250 bar. Continuous use at extreme pressure may eventually damage the column and the pump. It is expected that the column backpressure might slightly increase following a certain period of use. A sudden increase in backpressure suggests that the column inlet frit might be plugged. In this case it is recommended that the column be flushed with reverse flow in an appropriate solvent (high aqueous in many cases).

Temperature The maximum operating temperature is 60°C. Continuous use of the column at an elevated temperature (>45°C) can reduce the lifetime of the column, especially under high pH (>8).

Storage When not in use for extended time, do not allow high aqueous or high salt mobile phase to remain in the column. Remove aqueous buffers remained in the column by washing it with 20-30 column volumes of 50% methanol or acetonitrile aqueous solution, followed by 20-30 column volumes of organic solvent such as methanol or acetonitrile. Each column is shipped with two removable end caps to prevent the drying of the column bed. Cap both ends when the column is not in use.

*When pH<9, it is recommended to avoid use of phosphate salts, such as sodium or potassium phosphate. Use an organic amine or ammonia for pH adjustment to extend the life of the column and to suit the requirement for MS detection.



Certificate of Analysis

Product: SiliCycle[®] SiliaChrom[®] XT C18, 4.6 mm x 250 mm HPLC Column
Box of 1 column

COMPANY IDENTIFICATION

SiliCycle[®] Inc, www.silicycle.com
2500 Parc-Technologique Blvd
Quebec City (QC) G1P 4S6
CANADA

PHONE: (418) 874-0054 FAX: (418) 874-0355
HOURS: Monday-Friday 8:00 a.m.-5:00 p.m. (EST)

PRODUCT CHARACTERISTICS

Product number (#) :	H171805H-N250	Specific surface area (m ² /g):	200
Serial number (#) :	S11071	Average pore size (Å) :	150
Batch number (#) :	H121006	Carbon content (%) :	15
Particle shape and size :	Spherical, 5µm	Ultra pure silica (%) :	99.999

COLUMN QUALITY CONTROL

COLUMN VISUAL TEST	COLUMN PACKING EVALUATION
Visual tests are made on SiliCycle [®] HPLC column to provide customers with default-free products to insure 100% satisfaction.	To insure the packing quality of the column, a standard separation is performed to validate the characteristic chromatographic experimental parameters.

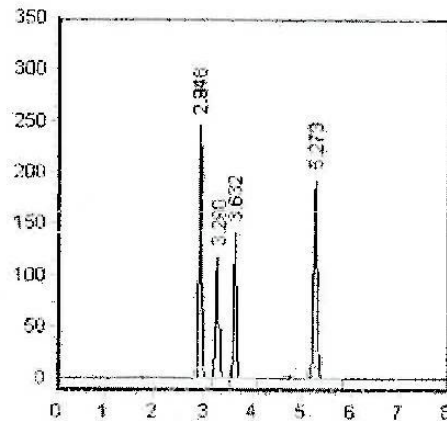
SEPARATION TEST DESCRIPTION

Wavelength	254 nm
Sample mixture in mobile phase	Uracil(1) / Phenol(2) Nitrobenzene(3) / Naphthalene(4)
Injection volume	1 µL
Temperature	30°C
Flow rate	1.0 mL/min
Mobile phase	15% Water 85% Methanol

OBSERVED COLUMN PARAMETERS (NAPHTHALENE)

Item	Specification	Test result
Retention Time (min.)	5.4 ± 0.50	5.273
Theoretical plates number	≥20500	21098
Tailing factor	0.98 ≤TF ≤1.12	1.07

CHROMATOGRAM



THIS CERTIFICATE GUARANTEES THE HIGH QUALITY OF THIS PRODUCT

QC ACCEPTANCE DATE

December 2014

Analytical Services