

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**Ciências**  
**ULisboa**

## **Desenvolvimento de Metodologia para Monitorização de $\beta$ -bloqueantes em Matrizes Biológicas e Ambientais**

Mariana Foles Mendes

**Mestrado em Química**  
Especialização em Química Analítica

Dissertação orientada por:  
Professor Doutor José M. F. Nogueira  
Professor Doutor Nuno R. Neng

2024



## Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço aos meus orientadores, Professor Doutor José Nogueira e Professor Doutor Nuno Neng, fundamentais para a realização desta tese, pela orientação, disponibilidade e todos os conhecimentos que partilharam, que certamente farão toda a diferença no meu futuro. Em particular ao Professor Doutor José Nogueira, por me ter acolhido uma vez mais no seu laboratório de Cromatografia e Eletroforese Capilar.

À colega, que se tornou amiga, Camilla Fonseca, com quem partilhei o dia-a-dia no laboratório durante seis meses e foi um pilar essencial para realização desta tese, muito obrigada. Mas também aos restantes colegas de laboratório, Bruna Rosalis, Bruno Quintelas, Jéssica Cerqueira, Maria Soares, Marisa Maria, Oriana Gonçalves e Renata Miguéis, pela boa disposição e entreaajuda constantes.

Obrigada ao colega e amigo Duarte Clemente, pelo apoio e incentivo, e por todos os almoços para me distrair do trabalho, ao longo desde ano e meio. À amiga Marta Correia, que viveu comigo todo o percurso escolar e académico, e como é óbvio, o *stress* da escrita do relatório da tese não poderia ter sido diferente.

Ao meu namorado, Luís Pedro, obrigada pela paciência e motivação constantes, mas também por ser sempre o responsável pelo equilíbrio entre trabalho e diversão na minha vida há 8 anos.

E, por fim, um enorme obrigada à mãe e ao pai, Madalena e Carlos, pela confiança que sempre depositaram em mim e por me fornecerem o essencial para alcançar os meus sonhos... e por acreditarem que um dia eu seria Mestre em Química.

*Mariana Foles Mendes*

## Comunicações

### Comunicações em painel

Mendes, M.F.\*, Neng, N.R., Nogueira, J.M.F., *Application of bar adsorptive microextraction (BA $\mu$ E) to monitor trace levels of  $\beta$ -blockers in aqueous matrices*. Apresentado no CQE Days (presencial), Lisboa, Portugal. 25 e 26 de maio de 2023.

Mendes, M.F.\*, Neng, N.R., Nogueira, J.M.F., *Tracking trace levels of  $\beta$ -blockers in aqueous matrices by bar adsorptive microextraction (BA $\mu$ E)*. Apresentado no 3<sup>th</sup> Chem&Biochem Students Meeting (presencial), Lisboa, Portugal. 13 de julho de 2023.

Mendes, M.F.\*, Neng, N.R., Nogueira, J.M.F., *Bar adsorptive microextraction (BA $\mu$ E) - An alternative analytical tool to monitor  $\beta$ -blockers in biological and environmental matrices*. Apresentado no 13<sup>o</sup> Encontro Nacional de Cromatografia (presencial; *e-poster*), Lisboa, Portugal. 17 a 19 de dezembro de 2023.

Mendes, M.F.\*, Nogueira, J.M.F., *Monitoring  $\beta$ -blockers in biological and environmental matrices using bar adsorptive microextraction (BA $\mu$ E)*. Apresentado no Analítica 2024 (presencial), Porto, Portugal. 25 e 26 de março de 2024.

### Comunicações *flash presentation*

Mendes, M.F.\*, Nogueira, J.M.F., *Monitoring  $\beta$ -blockers in biological and environmental matrices using bar adsorptive microextraction (BA $\mu$ E)*. Apresentado no Analítica 2024 (presencial), Porto, Portugal. 25 e 26 de março de 2024.

## Resumo

As doenças cardiovasculares são a principal causa de morte global, segundo a Organização Mundial de Saúde. Os  $\beta$ -bloqueantes são fármacos habitualmente prescritos para o seu tratamento, utilizando-se alternativamente noutras situações clínicas. A Agência Mundial Antidopagem banuiu a sua utilização em desportos de precisão, pela capacidade de redução de tremores. Devido ao elevado consumo global, os  $\beta$ -bloqueantes têm sido detetados em águas ambientais e urbanas. Assim, quer em contexto de monitorização terapêutica e controlo de *doping*, quer ambiental, torna-se essencial adotar técnicas de microextração que permitam o enriquecimento vestigial de  $\beta$ -bloqueantes, seguidas de análise instrumental.

O presente trabalho consistiu no desenvolvimento e aplicação a matrizes reais, de um método analítico alternativo para determinação de cinco  $\beta$ -bloqueantes (BIS, CAR, NEB, PIN e PRO) em amostras biológicas e ambientais. Para esse efeito, recorreu-se a microextração adsortiva em barra, seguida de microdessorção líquida e cromatografia líquida de alta eficiência com deteção por rede de díodos (BA $\mu$ E- $\mu$ LD/HPLC-DAD).

Realizaram-se diversos estudos de otimização, tendo o polímero Strata X-AW apresentado melhores resultados face aos restantes sorventes testados. Sob condições experimentais otimizadas (microextração: 4 h (990 rpm), pH 12; retroextração: MeOH:ACN (1:1, v/v), 15 min sob sonificação) alcançaram-se recuperações médias compreendidas entre 71,4 e 84,4%. Após validação, atingiram-se limiares analíticos aceitáveis ( $1,2 \mu\text{g L}^{-1} \leq \text{LOD} \leq 10,0 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g L}^{-1} \leq \text{LOQ} \leq 33,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ), gamas de trabalho compreendidas entre 4,0 e 600,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , e excelentes linearidades ( $r^2 \geq 0,9974$ ). Numa etapa final, aplicou-se a metodologia otimizada e validada de forma muito satisfatória a matrizes biológicas (urina, plasma e saliva) e ambientais (água de ETAR).

A metodologia proposta revelou ser uma alternativa para análise de  $\beta$ -bloqueantes em amostras biológicas e ambientais. Como principais vantagens destacam-se a pequena quantidade de solvente requerido, fácil manipulação e simplicidade, ampla gama linear de trabalho, e aplicação simultânea em diferentes contextos analíticos.

**Palavras-chave:** Beta-bloqueantes ( $\beta$ -bloqueantes), Doenças cardiovasculares, *Doping*, Microextração adsortiva em barra (BA $\mu$ E), Cromatografia líquida de alta eficiência com deteção por rede de díodos (HPLC-DAD).

## Abstract

Cardiovascular diseases are the main cause of death worldwide, according to the World Health Organization.  $\beta$ -blockers are drugs usually prescribed for cardiovascular therapy, but also in other health situations. Their tremor-reducing effect led the World Anti-Doping Agency to ban their use in precision sports. Given their global consumption,  $\beta$ -blockers were already detected in environmental and wastewater samples. Therefore, in the context of therapeutic and doping control, or in environmental monitoring, it is essential to adopt microextraction techniques, promoting the enrichment of traces of  $\beta$ -blockers, followed by instrumental analysis.

The present work consisted in the development and application to real matrices, of an alternative methodology for trace analysis of five  $\beta$ -blockers (BIS, CAR, NEB, PIN and PRO) in biological and environmental samples. In this sense, it was applied bar adsorptive microextraction followed by microliquid desorption and high-performance liquid chromatography with diode array detection (BA $\mu$ E- $\mu$ LD/HPLC-DAD).

Several studies were carried out during the optimization, with the Strata X-AW polymer presenting better results compared to the other sorbents tested. Under optimized experimental conditions (microextraction: 4 h (990 rpm), pH 12; retroextraction: MeOH:ACN (1:1, v/v), 15 min under sonification) were obtained average recovery yields between 71.4 and 84.4%. During the validation, this methodology allowed to achieve acceptable analytical thresholds ( $1.2 \mu\text{g L}^{-1} \leq \text{LOD} \leq 10.0 \mu\text{g L}^{-1}$  and  $4.0 \mu\text{g L}^{-1} \leq \text{LOQ} \leq 33.0 \mu\text{g L}^{-1}$ ), good linear dynamic ranges from 4.0 to 600.0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , and excellent linearities ( $r^2 \geq 0.9974$ ). The optimized and validated methodology was successfully applied to biological (urine, plasma and saliva) and environmental (wastewater) matrices.

The proposed method proved to be an alternative methodology for trace analysis of  $\beta$ -blockers in biological and environmental matrices. The main advantages include the use of small amount of solvent, easy manipulation and simplicity, wide linear dynamic range, and simultaneous application in different analytical contexts.

**Keywords:** Beta-blockers ( $\beta$ -blockers), Cardiovascular diseases, Doping, Bar adsorptive microextraction (BA $\mu$ E), High-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD).

## Abreviaturas, siglas e acrónimos

$a$ : Declive da reta

AC: Carvões ativados (do inglês *activated carbons*)

ACN: Acetonitrilo

$A_i$ : Área do pico obtido num ensaio

$A_p$ : Área do pico obtido para a solução padrão

ATN: Atenolol

$b$ : Interseção da reta com o eixo das ordenadas

BA $\mu$ E: Microextração adsorptiva em barra (do inglês *bar adsorptive microextraction*)

BIS: Bisoprolol

CA 1: Carvão ativado CA 1

CAR: Carvedilol

CFMM: Microextração por membrana de fluxo contínuo (do inglês *continuous flow membrane microextraction*)

Chrom P: Polímero ENVI-Chrom P

$c_M$ : Componente da fase móvel

CM-LPME: Microextração em fase líquida mediada por portador (do inglês *carrier mediated liquid phase microextraction*)

CN 1: Carvão ativado CN 1

CPE: Extração por ponto de turvação (do inglês *cloud-point extraction*)

$c_s$ : Componente da fase estacionária

DAD: Detetor de rede de díodos (do inglês *diode array detector*)

DLLME: Microextração líquido-líquido dispersiva (do inglês *dispersive liquid-liquid microextraction*)

DSPE: Extração em fase sólida dispersiva (do inglês *dispersive solid phase extraction*)

DVB: Divinilbenzeno

Envi-18: Polímero Supelclean ENVI-18

ETAR: Estação de tratamento de águas residuais

FDA: Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos da América (FDA, do inglês *Food and Drug Administration - USA*)

$F_{exp}$ : Valor  $F$  experimental

FLD: Detetor de fluorescência (do inglês *fluorescence detector*)

Florisil: Polímero ENVI-Florisil

$F_{tab}$ : Valor  $F$  tabelado

GAC: Química analítica verde (do inglês *green analytical chemistry*)

GC-MS: Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa (do inglês *gas chromatography-mass spectrometry*)

HLB: Polímero Oasis® HLB

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês *high-performance liquid chromatography*)

ISA: Atividade simpaticomimética intrínseca (do inglês *intrinsic sympathomimetic activity*)

$K$ : Coeficiente de distribuição

$K_{O/W}$ : Coeficiente de partição octanol-água

$K_{PDMS/W}$ : Coeficiente de partição entre a fase de PDMS da barra de agitação e a amostra de água

$k'$ : Fator de capacidade

LC-MS: Cromatografia em fase líquida acoplada a espectrometria de massa (do inglês *liquid chromatography-mass spectrometry*)

LD: Dessorção líquida (do inglês *liquid desorption*)

LLE: Extração líquido-líquido (do inglês *liquid-liquid extraction*)

LOD: Limite de detecção (do inglês *limit of detection*)

LOQ: Limite de quantificação (do inglês *limit of quantification*)

LPME: Microextração em fase líquida (do inglês *liquid phase microextraction*)

$m$ : Massa

MAX: Polímero Oasis® MAX

MCX: Polímero Oasis® MCX

MeOH: Metanol

MEPS: Microextração por sorvente empacotado (do inglês *microextraction by packed sorbent*)

MM: Massa molar

MS: Espectrometria de massa (do inglês *mass spectrometry*)

MSPE: Extração em fase sólida magnética (do inglês *magnetic solid phase extraction*)

MS/MS: Espectrometria de massa em *Tandem* (do inglês *Tandem mass spectrometry*)

$N$ : Número de pratos teóricos

$n$ : Número de concentrações estudadas

NEB: Nebivolol

$p$ : Número de replicados

PDMS: Polidimetilsiloxano

pH: Simétrico do logaritmo decimal da concentração de hidrogênio

pH<sub>PZC</sub>: pH no ponto de carga zero

PIN: Pindolol

p*K*<sub>a</sub>: Simétrico do logaritmo decimal da constante de acidez

PP: Precipitação de proteínas (do inglês *protein precipitation*)

ppb: Partes-por-bilião

ppt: Partes-por-trilião

PRO: Propranolol

R: Carvão ativado R

$r^2$ : Coeficiente de determinação

rpm: Rotações por minuto

$R_s$ : Resolução

$s^2$ : Variância

SBSE: Extração sortiva em barra de agitação (do inglês *stir bar sorptive extraction*)

SHLLE: Extração líquido-líquido homogênea assistida por salting out (do inglês *salting out homogeneous liquid-liquid extraction*)

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

SPME: Microextração em fase sólida (do inglês *solid-phase microextraction*)

Strata CN: Polímero Strata® CN

Strata DVB: Polímero Strata® DVB

Strata SCX: Polímero Strata® SCX

Strata X: Polímero Strata® X

Strata X-AW: Polímero Strata® X-AW

Strata X-CW: Polímero Strata® X-CW

SX 1: Carvão ativado SX 1

SX plus: Carvão ativado SX plus

S/N: Razão sinal/ruído

t<sub>M</sub>: Tempo morto

t<sub>R</sub>: Tempo de retenção

$t'_R$ : Tempo de retenção ajustado

UV: Ultravioleta

UV-vis: Espectrometria ultravioleta-visível

U(H)PLC: Cromatografia líquida de ultra (alta) eficiência (do inglês *ultra(-high) performance liquid chromatography*)

$v$ : Volume

$W$ : Largura da base de um pico num cromatograma

WADA: Agência Mundial Antidopagem (do inglês *World Anti-Doping Agency*)

WCX: Polímero Oasis® WCX

$\alpha$ : Fator de separação

$\lambda$ : Comprimento de onda

# Índice

1. Introdução .....	1
1.1. As doenças cardiovasculares .....	1
1.2. $\beta$ -bloqueantes: medicação cardiovascular .....	1
1.2.1. Atenolol .....	2
1.2.2. Bisoprolol .....	3
1.2.3. Carvedilol .....	4
1.2.4. Nebivolol .....	4
1.2.5. Pindolol .....	5
1.2.6. Propranolol .....	5
1.3. Outras aplicações dos $\beta$ -bloqueantes .....	7
1.4. O papel dos $\beta$ -bloqueantes no desporto .....	8
1.5. $\beta$ -bloqueantes e o ambiente .....	9
1.6. Monitorização de $\beta$ -bloqueantes .....	9
1.7. Técnicas de preparação de amostra .....	10
1.7.1. Extração sortiva em barra de agitação .....	11
1.7.2. Microextração adsortiva em barra .....	11
1.8. Conceitos teóricos de cromatografia .....	13
1.8.1. Cromatografia líquida de alta eficiência .....	15
1.9. Objetivos .....	17
2. Parte experimental .....	18
2.1. Reagentes, materiais sorventes e amostras .....	18
2.2. Material e equipamento .....	19
2.3. Método experimental .....	20
2.3.1. Preparação de soluções padrão .....	20
2.3.2. Condições instrumentais .....	20
2.3.3. Calibração instrumental .....	21
2.3.4. Preparação de dispositivos BA $\mu$ E .....	21
2.3.5. Ensaio de otimização .....	21
2.3.6. Validação do método .....	22
2.3.7. Aplicação a amostras reais .....	23
3. Resultados e discussão .....	24
3.1. Otimização de condições instrumentais .....	24
3.1.1. Calibração instrumental .....	26
3.2. Seleção do material sorvente para BA $\mu$ E .....	26

3.3. Processo de otimização .....	31
3.3.1. Otimização da retroextração.....	31
3.3.2. Otimização da microextração .....	33
3.4. Condições experimentais otimizadas .....	38
3.5. Validação do método .....	40
3.5.1. Limiares analíticos e linearidade.....	40
3.5.2. Exatidão e precisão.....	42
3.6. Aplicação a matrizes reais .....	43
3.7. Comparação com estudos anteriores .....	48
4. Conclusões .....	49
Bibliografia .....	51
Anexos.....	58
Anexo I – Espectros UV-vis dos $\beta$ -bloqueantes em estudo .....	58
Anexo II - Gráficos de especiação dos $\beta$ -bloqueantes em estudo .....	60
Anexo III - Curvas de calibração .....	63
Anexo IV - Dispersão de resíduos.....	65
Anexo V – Estudos comparativos em amostras reais.....	67
Anexo VI – Comparação com outros estudos .....	69

## Índice de tabelas

Tabela 1.1 - Classificação de $\beta$ -bloqueantes, de acordo com o recetor-alvo e órgãos-alvo[10,12]. .....	2
Tabela 1.2 - Propriedades farmacológicas dos seis $\beta$ -bloqueantes[15-26].....	7
Tabela 2.1 - Massa de padrão sólido, dosagem e quantidade de comprimidos, e respetiva concentração da solução padrão mãe dos seis $\beta$ -bloqueantes em estudo. ....	20
Tabela 3.1 - Propriedades físico-químicas dos seis $\beta$ -bloqueantes em estudo[15,19,23,81–83]. 24	
Tabela 3.2 - Condições instrumentais de HPLC-DAD otimizadas para análise dos seis $\beta$ - bloqueantes estudados. ....	25
Tabela 3.3 - Tempos de retenção obtidos por HPLC-DAD para os seis $\beta$ -bloqueantes em estudo, nas condições instrumentais otimizadas.....	26
Tabela 3.4 - Condições experimentais otimizadas para a metodologia desenvolvida. ....	40
Tabela 3.5 - Recuperações médias dos cinco $\beta$ -bloqueantes estudados em condições experimentais otimizadas da metodologia desenvolvida. ....	40
Tabela 3.6 - Valores de LOD e LOQ obtidos aquando da validação da metodologia desenvolvida.....	41

Tabela 3.7 - Parâmetros de regressão relativos às gamas lineares de trabalho obtidas para a metodologia desenvolvida.....	41
Tabela 3.8 - Valores de F experimental e F tabelado para os cinco $\beta$ -bloqueantes em estudo. ....	42
Tabela 3.9 - Valores de exatidão e precisão obtidos para os diferentes níveis de fortificação selecionados (alto: 600,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ ; médio: 300,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ ; baixo: 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ ), tanto para o estudo intra como para o interdia.....	43
Tabela 3.10 - Recuperações médias dos cinco $\beta$ -bloqueantes estudados obtidas aplicando a metodologia desenvolvida a urina, plasma, saliva e água de ETAR. ....	44
Tabela 3.11 - Parâmetros de regressão relativos à aplicação da metodologia desenvolvida a matrizes reais.....	46
Tabela VI.1 - Comparação da metodologia desenvolvida com outros estudos para análise vestigial de $\beta$ -bloqueantes em amostras aquosas. ....	69

## Índice de figuras

Figura 1.1 - Estrutura molecular do ATN.....	3
Figura 1.2 - Estrutura molecular do BIS. ....	3
Figura 1.3 - Estrutura molecular do CAR. ....	4
Figura 1.4 - Estrutura molecular do NEB.....	5
Figura 1.5 - Estrutura molecular do PIN. ....	5
Figura 1.6 - Estrutura molecular do PRO.....	6
Figura 1.7 - Esquema representativo do dispositivo utilizado em SBSE. ....	11
Figura 1.8 - Esquema representativo do dispositivo utilizado em BA $\mu$ E. ....	12
Figura 1.9 - Representação esquemática do processo de extração em BA $\mu$ E.....	12
Figura 1.10 - Ilustração do tempo morto ( $t_M$ ), tempo de retenção ( $t_R$ ), tempo de retenção ajustado ( $t'_R$ ) e largura da base do pico (W) dos picos A e B num processo cromatográfico. ....	14
Figura 1.11 - Representação esquemática dos principais componentes de um sistema convencional de HPLC.....	15
Figura 2.1 - Ilustração esquemática do procedimento experimental para otimização, incluindo as etapas de microextração, retroextração e análise instrumental. ....	22
Figura 3.1 - Cromatograma obtido por HPLC-DAD relativo aos seis $\beta$ -bloqueantes estudados em condições instrumentais otimizadas. ....	25
Figura 3.2 - Seletividade dos AC para a extração dos $\beta$ -bloqueantes em estudo em água ultrapura, obtido por BA $\mu$ E- $\mu$ LD/HPLC-DAD. Ensaios realizados em triplicado. Condições dos ensaios: 5 mL de água ultrapura fortificada com 200 $\mu\text{L}$ da solução mistura de $\beta$ -bloqueantes (10 $\text{mg L}^{-1}$ ); microextração: 16 h (990 rpm); retroextração: 100 $\mu\text{L}$ MeOH, 60 min sob tratamento ultrassónico. ....	27

Figura 3.3 - Seletividade dos polímeros de fase reversa (a) e outros polímeros (b) para a extração dos $\beta$ -bloqueantes em estudo em água ultrapura, obtido por BA $\mu$ E- $\mu$ LD/HPLC-DAD. Ensaio realizado em triplicado. Condições dos ensaios: 5 mL de água ultrapura fortificada com 200 $\mu$ L da solução mistura de $\beta$ -bloqueantes (10 mg L <sup>-1</sup> ); microextração: 16 h (990 rpm); retroextração: 100 $\mu$ L MeOH, 60 min sob tratamento ultrassônico. ....	28
Figura 3.4 - Seletividade das misturas de sorventes para a extração dos $\beta$ -bloqueantes em estudo em água ultrapura, obtido por BA $\mu$ E- $\mu$ LD/HPLC-DAD. Ensaio realizado em triplicado. Condições dos ensaios: 5 mL de água ultrapura fortificada com 200 $\mu$ L da solução mistura de $\beta$ -bloqueantes (10 mg L <sup>-1</sup> ); microextração: 16 h (990 rpm); retroextração: 100 $\mu$ L MeOH, 60 min sob tratamento ultrassônico. ....	29
Figura 3.5 - Seletividade dos AC a pH 11 para a extração dos $\beta$ -bloqueantes em estudo em água ultrapura, obtido por BA $\mu$ E- $\mu$ LD/HPLC-DAD. Ensaio realizado em triplicado. Condições dos ensaios: 5 mL de água ultrapura fortificada com 200 $\mu$ L da solução mistura de $\beta$ -bloqueantes (10 mg L <sup>-1</sup> ); microextração: 16 h (990 rpm), pH 11; retroextração: 100 $\mu$ L MeOH, 60 min sob tratamento ultrassônico. ....	29
Figura 3.6 - Seletividade dos polímeros de fase reversa a pH 11 (a) e outros polímeros a pH 11 (b) para a extração dos $\beta$ -bloqueantes em estudo em água ultrapura, obtido por BA $\mu$ E- $\mu$ LD/HPLC-DAD. Ensaio realizado em triplicado. Condições dos ensaios: 5 mL de água ultrapura fortificada com 200 $\mu$ L da solução mistura de $\beta$ -bloqueantes (10 mg L <sup>-1</sup> ); microextração: 16 h (990 rpm), pH 11; retroextração: 100 $\mu$ L MeOH, 60 min sob tratamento ultrassônico. ....	30
Figura 3.7 - Estrutura do polímero Strata X-AW.....	31
Figura 3.8 - Efeito do solvente para $\mu$ LD na extração dos $\beta$ -bloqueantes em estudo em água ultrapura, obtido por BA $\mu$ E(Strata X-AW)- $\mu$ LD/HPLC-DAD. Ensaio realizado em triplicado. Condições dos ensaios: 5 mL de água ultrapura fortificada com 200 $\mu$ L da solução mistura de $\beta$ -bloqueantes (10 mg L <sup>-1</sup> ); microextração: 16 h (990 rpm), pH 11; retroextração: 100 $\mu$ L solvente, 60 min sob tratamento ultrassônico. ....	32
Figura 3.9 - Efeito do tempo de retroextração na extração dos $\beta$ -bloqueantes em estudo em água ultrapura, obtido por BA $\mu$ E(Strata X-AW)- $\mu$ LD/HPLC-DAD. Ensaio realizado em triplicado. Condições dos ensaios: 5 mL de água ultrapura fortificada com 200 $\mu$ L da solução mistura de $\beta$ -bloqueantes (10 mg L <sup>-1</sup> ); microextração: 16 h (990 rpm), pH 11; retroextração: 100 $\mu$ L MeOH:ACN (1:1, v/v), sob tratamento ultrassônico. ....	33
Figura 3.10 - Efeito do tempo de equilíbrio na extração dos $\beta$ -bloqueantes em estudo em água ultrapura, obtido por BA $\mu$ E(Strata X-AW)- $\mu$ LD/HPLC-DAD. Ensaio realizado em triplicado. Condições dos ensaios: 5 mL de água ultrapura fortificada com 200 $\mu$ L da solução mistura de $\beta$ -bloqueantes (10 mg L <sup>-1</sup> ); microextração: 990 rpm, pH 11; retroextração: 100 $\mu$ L MeOH:ACN (1:1, v/v), 15 min sob tratamento ultrassônico.....	34
Figura 3.11 - Efeito da velocidade de agitação na extração dos $\beta$ -bloqueantes em estudo em água ultrapura, obtido por BA $\mu$ E(Strata X-AW)- $\mu$ LD/HPLC-DAD. Ensaio realizado em triplicado. Condições dos ensaios: 5 mL de água ultrapura fortificada com 200 $\mu$ L da solução mistura de $\beta$ -bloqueantes (10 mg L <sup>-1</sup> ); microextração: 4 h, pH 11; retroextração: 100 $\mu$ L MeOH:ACN (1:1, v/v), 15 min sob tratamento ultrassônico. ....	35
Figura 3.12 - Efeito do pH da matriz na extração dos $\beta$ -bloqueantes em estudo em água ultrapura, obtido por BA $\mu$ E(Strata X-AW)- $\mu$ LD/HPLC-DAD. Ensaio realizado em triplicado.	

Condições dos ensaios: 5 mL de água ultrapura fortificada com 200 µL da solução mistura de β-bloqueantes (10 mg L <sup>-1</sup> ); microextração: 4 h (990 rpm); retroextração: 100 µL MeOH:ACN (1:1, v/v), 15 min sob tratamento ultrassônico. ....	36
Figura 3.13 - Efeito do modificador orgânico na extração dos β-bloqueantes em estudo em água ultrapura, obtido por BAµE(Strata X-AW)-µLD/HPLC-DAD. Ensaio realizado em triplicado. Condições dos ensaios: 5 mL de água ultrapura fortificada com 200 µL da solução mistura de β-bloqueantes (10 mg L <sup>-1</sup> ); microextração: 4 h (990 rpm), pH 12; retroextração: 100 µL MeOH:ACN (1:1, v/v), 15 min sob tratamento ultrassônico. ....	37
Figura 3.14 - Efeito da força iônica na extração dos β-bloqueantes em estudo em água ultrapura, obtido por BAµE(Strata X-AW)-µLD/HPLC-DAD. Ensaio realizado em triplicado. Condições dos ensaios: 5 mL de água ultrapura fortificada com 200 µL da solução mistura de β-bloqueantes (10 mg L <sup>-1</sup> ); microextração: 4 h (990 rpm), pH 12; retroextração: 100 µL MeOH:ACN (1:1, v/v), 15 min sob tratamento ultrassônico. ....	38
Figura 3.15 - Cromatograma obtido por HPLC-DAD relativo aos cinco β-bloqueantes estudados em condições experimentais otimizadas. ....	39
Figura 3.16 - Eficiência de extração dos β-bloqueantes em estudo em água ultrapura sob novas condições experimentais otimizadas, obtido por BAµE(Strata X-AW)-µLD/HPLC-DAD. Condições dos ensaios: 5 mL de água ultrapura fortificada com 200 µL da solução mistura de β-bloqueantes (10 mg L <sup>-1</sup> ); microextração: 4 h (990 rpm), pH 12; retroextração: 100 µL MeOH:ACN (1:1, v/v), 15 min sob tratamento ultrassônico. ....	39
Figura 3.17 - Cromatogramas obtidos quando da aplicação da metodologia desenvolvida a amostras fotificadas com mistura dos β-bloqueantes estudados de (a) urina, (b) plasma, (c) saliva e (d) água de ETAR.....	45
Figura 3.18 - Cromatogramas obtidos quando da aplicação da metodologia desenvolvida a amostras de (a) urina e (b) saliva doadas por voluntário medicado com cloridrato de PRO. ....	47
Figura I.1 - Espectro UV-vis ATN. ....	58
Figura I.2 - Espectro UV-vis BIS. ....	58
Figura I.3 - Espectro UV-vis CAR. ....	58
Figura I.4 - Espectro UV-vis NEB. ....	59
Figura I.5 - Espectro UV-vis PIN.....	59
Figura I.6 - Espectro UV-vis PRO. ....	59
Figura II.1 - Gráfico de especiação e estrutura molecular das espécies de ATN. Adaptado do <i>software</i> MarvinSketch.....	60
Figura II.2 - Gráfico de especiação e estrutura molecular das espécies de BIS. Adaptado do <i>software</i> MarvinSketch.....	60
Figura II.3 - Gráfico de especiação e estrutura molecular das espécies de CAR. Adaptado do <i>software</i> MarvinSketch.....	61
Figura II.4 - Gráfico de especiação e estrutura molecular das espécies de NEB. Adaptado do <i>software</i> MarvinSketch.....	61
Figura II.5 - Gráfico de especiação e estrutura molecular das espécies de PIN. Adaptado do <i>software</i> MarvinSketch.....	62

Figura II.6 - Gráfico de especificação e estrutura molecular das espécies de PRO. Adaptado do <i>software</i> MarvinSketch.....	62
Figura III.1 - Curva de calibração obtida para BIS. ....	63
Figura III.2 - Curva de calibração obtida para CAR. ....	63
Figura III.3 - Curva de calibração obtida para NEB. ....	63
Figura III.4 - Curva de calibração obtida para PIN.....	64
Figura III.5 - Curva de calibração obtida para PRO.....	64
Figura IV.1 - Dispersão de resíduos obtida para BIS.....	65
Figura IV.2 - Dispersão de resíduos obtida para CAR. ....	65
Figura IV.3 - Dispersão de resíduos obtida para NEB.....	65
Figura IV.4 - Dispersão de resíduos obtida para PIN. ....	66
Figura IV.5 - Dispersão de resíduos obtida para PRO.....	66
Figura V.1 - Estudo comparativo da eficiência de extração da metodologia quando aplicada a amostra de urina, variando a taxa de diluição em água ultrapura e de agente hidrolisante (NaOH, MeOH e ACN). ....	67
Figura V.2 - Estudo comparativo da eficiência de extração da metodologia quando aplicada a amostra de plasma, variando a taxa de diluição em água ultrapura e de agente hidrolisante ((a) NaOH, (b) MeOH e (c) ACN). ....	68
Figura V.3 - Estudo comparativo da eficiência de extração da metodologia quando aplicada a amostra de saliva, variando a taxa de diluição em água ultrapura. ....	68
Figura V.4 - Estudo comparativo da eficiência de extração da metodologia quando aplicada a amostra de água de ETAR, variando a taxa de diluição em água ultrapura. ....	68

# 1. Introdução

## 1.1. As doenças cardiovasculares

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, as doenças cardiovasculares são a principal causa de morte em todo o mundo, estimando-se que a cada ano ceifem 17,9 milhões de vidas[1]. Em 2020, estas doenças foram a principal causa de morte na União Europeia (32,7%), enquanto a segunda maior, o cancro, foi significativamente inferior, representando 22,5% do total[2].

As doenças cardiovasculares abrangem um amplo grupo de problemas de saúde, que afetam o sistema circulatório – coração e vasos sanguíneos –, onde se incluem a doença cardíaca coronária, a doença vascular cerebral, a doença arterial periférica, a doença cardíaca reumática, doenças cardíacas congénitas, a trombose venosa profunda e a embolia cerebral[2]. Situações de ataques cardíacos e derrames são eventos agudos, que provocam o bloqueio do fluxo de sangue para o coração e cérebro, respetivamente[3].

Além de fatores de risco de doenças cardiovasculares não modificáveis, como o histórico familiar, existem diversos outros fatores de origem socioeconómica, metabólica e ambiental, como obesidade, elevado consumo de sal, alcoolismo, tabagismo, sedentarismo, hipertensão arterial ou poluição atmosférica, que podem ser prevenidos através da modificação de hábitos do quotidiano ou por tratamentos médicos[4]. Entre os fármacos regularmente usados para suprimir problemas cardíacos, encontram-se os anticoagulantes, vasodilatadores, medicação para redução de colesterol, agentes antiplaquetários, diuréticos,  $\beta$ -bloqueantes, e inibidores do enzima conversor de angiotensina[5].

## 1.2. $\beta$ -bloqueantes: medicação cardiovascular

Os bloqueadores beta adrenérgicos, vulgarmente designados por  $\beta$ -bloqueantes, constituem um grupo heterogéneo de agentes farmacológicos que estão entre os medicamentos mais prescritos para o tratamento de doenças cardiovasculares, como angina de peito, insuficiência cardíaca, hipertensão, enfarte do miocárdio e arritmia[6,7].

O desenvolvimento de  $\beta$ -bloqueantes para aplicação no tratamento de doenças cardiovasculares representou um enorme avanço na medicina, dado nenhuma outra classe de medicamentos ter demonstrado tamanha eficácia terapêutica no tratamento e prevenção destas doenças. A relevância destes fármacos ficou bem assinalada em 1988, quando *Sir James Black* foi galardoado com o prémio Nobel da Medicina, pelos trabalhos que incluíram o desenvolvimento do primeiro  $\beta$ -bloqueante aprovado para tratamento humano[8,9].

Os diversos  $\beta$ -bloqueantes atualmente no mercado apresentam efeitos diferenciados, uma vez que variam nos seus mecanismos de ação, que ainda não são totalmente compreendidos[8]. Contudo, por definição, estes bloqueiam os recetores beta adrenérgicos, o que promove a redução da atividade do sistema nervoso simpático[10]. Estes medicamentos inibem competitivamente a ligação de epinefrina e norepinefrina aos recetores  $\beta$ , dependendo da proporção entre estas catecolaminas e os  $\beta$ -bloqueantes[11], o que gera um enfraquecimento dos efeitos das mesmas e

desencadeia reações fisiológicas, como o relaxamento da musculatura brônquica, e a alteração da frequência cardíaca e da contratilidade cardíaca[8].

No corpo humano encontram-se presentes dois tipos principais de recetores adrenérgicos, os  $\alpha$  e os  $\beta$ , podendo estes últimos ser subdivididos em três categorias, cujas funções que apresentam são bem distintas, dependendo da sua localização no organismo[10,12]:

- Recetores  $\beta$ -1 – encontram-se no coração (predominam no músculo cardíaco saudável numa proporção de 70:30 em relação aos recetores  $\beta$ -2), nos olhos e nos rins; o seu bloqueio apresenta efeitos benéficos em situações de insuficiência cardíaca e isquemia do miocárdio;
- Recetores  $\beta$ -2 – localizados nos pulmões, trato gastrointestinal, fígado, útero, vasos sanguíneos (músculo liso vascular) e músculo esquelético; a sua estimulação gera dilatação brônquica e vascular, pelo que o seu bloqueio poderá gerar vasoconstrição;
- Recetores  $\beta$ -3 – presentes nas células adiposas (e em parte no coração); o seu bloqueio pode contribuir para o surgimento de efeitos metabólicos e aumento de peso.

Por sua vez, os  $\beta$ -bloqueantes dividem-se em 3 gerações, com base na afinidade aos recetores adrenérgicos, essencialmente  $\beta$ -1 e  $\beta$ -2, conforme apresentado na Tabela 1.1.

Tabela 1.1 - Classificação de  $\beta$ -bloqueantes, de acordo com o recetor-alvo e órgãos-alvo[10,12].

Classificação	Recetor-alvo	Órgãos-alvo	Exemplos
1ª geração (não seletivos)	$\beta$ -1 e $\beta$ -2 igualmente	Coração, vasos sanguíneos e vias aéreas	Nadolol, pindolol e propranolol
2ª geração (cardiosseletivos)	$\beta$ -1 maioritariamente	Coração	Atenolol, bisoprolol e metoprolol
3ª geração	$\beta$ e $\alpha$	Vasos sanguíneos (dilatação)	Carvedilol, labetalol e nebivolol (seletivo a $\beta$ -1)

Esta família de fármacos apresenta na sua estrutura pelo menos um anel aromático ou heteroaromático, um grupo amina e um grupo hidroxilo, sendo moléculas com um ou mais centros estereogénicos. Estas características estruturais ímpares influenciam a forma de ligação dos fármacos aos recetores adrenérgicos[13,14]. Nos subcapítulos seguintes são descritos de forma detalhada alguns exemplos de  $\beta$ -bloqueantes, frequentemente utilizados em medicina.

### 1.2.1. Atenolol

A 2-{4-[2-hidroxi-3-(isopropilamino)propoxi]fenil}etanamida, também denominada como atenolol (ATN;  $C_{14}H_{22}N_2O_3$ ; MM = 266,34 g mol<sup>-1</sup>), é um  $\beta$ -bloqueante cardiosseletivo. Em setembro de 1981 foi aprovado pela Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos da América (FDA, do inglês *Food and Drug Administration - USA*), e indicado para tratamento de hipertensão, angina de peito e enfarte agudo do miocárdio. Trata-se de um medicamento de prescrição essencialmente oral, mas também administrado por via intravenosa, que apresenta reduzida difusão intestinal e hematoencefálica, devido à sua baixa lipofilicidade. A

sua semivida de eliminação é de cerca de 6 a 7 horas, sendo excretado principalmente por via renal[15,16]. Na Figura 1.1, pode observar-se a respetiva estrutura molecular.

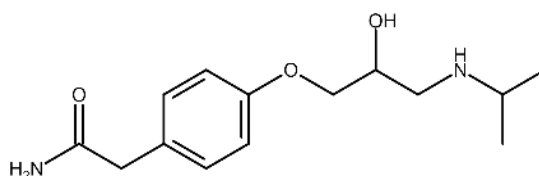


Figura 1.1 - Estrutura molecular do ATN.

Este  $\beta$ -bloqueante é contraindicado para pacientes que apresentem condições como insuficiência cardíaca, doença arterial periférica, acidose metabólica ou bradicardia sinusal. É recomendado que seja igualmente evitado em casos de asma ou outras doenças obstrutivas das vias aéreas. A avaliação da função renal, antes e durante o tratamento, é considerada essencial. Apresenta efeitos secundários como parestesia, diarreia, dispneia, disfunção erétil, fadiga ou tonturas, e em caso de intoxicação podem incluir-se sintomas como bradicardia, letargia, hipotermia, hipoglicémia ou hipotensão[16].

### 1.2.2. Bisoprolol

O 1-[4-(2-isopropoxietoximetil)fenoxi]-3-(isopropilamino)-2-propanol, identificado também como bisoprolol (BIS;  $C_{18}H_{31}NO_4$ ;  $MM = 325,4 \text{ g mol}^{-1}$ ), é, tal como o ATN, um  $\beta$ -bloqueante cardioseletivo. Geralmente é utilizado para o tratamento da hipertensão, tendo sido aprovado em julho de 1992 pela FDA. Administrado exclusivamente por via oral, é considerado um medicamento potente e com semivida longa, de 10 a 12 horas, o que reduz a necessidade de administração de doses múltiplas. Apresenta uma capacidade de penetração da barreira hematoencefálica mínima, devido à sua reduzida lipofilicidade, sendo eliminado do organismo 50% por metabolismo hepático e 50% por via renal[17,18]. A sua estrutura molecular encontra-se na Figura 1.2.

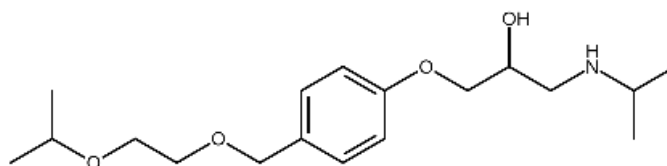


Figura 1.2 - Estrutura molecular do BIS.

Este agente anti-hipertensivo pode apresentar como efeito secundário casos de bradicardia, podendo também afetar a capacidade de prática de exercício físico, dado reduzir o débito cardíaco, e pacientes com historial de retenção de líquidos devem conjugar a sua toma com diuréticos. É essencial que a pressão arterial e a frequência cardíaca dos pacientes sejam monitorizadas, de forma a prevenir situações de bradicardia e hipotensão, sendo fundamental a

avaliação do nível de açúcar no sangue em diabéticos, dada a possibilidade de esta medicação poder mascarar sintomas de hipoglicemia[18].

### 1.2.3. Carvedilol

O 1-(9H-carbazol-4-iloxi)-3-[2-(2-metoxifenoxi)etilamino]-2-propanol, geralmente referido como carvedilol (CAR;  $C_{24}H_{26}N_2O_4$ ;  $MM = 406,5 \text{ g mol}^{-1}$ ), é um  $\beta$ -bloqueante não seletivo de 3ª geração, que apresenta atividade bloqueadora para recetores  $\beta$  e  $\alpha$  adrenérgicos. É um medicamento de toma por via oral, aprovado pela FDA desde setembro de 1995, e que, pelas suas propriedades bloqueadoras características, apresenta efeitos antioxidantes e vasodilatadores. Atualmente, é usado para o tratamento de insuficiência cardíaca, hipertensão e disfunção ventricular esquerda. Considerado altamente lipossolúvel, encontra-se amplamente distribuído pelos tecidos. A sua semivida situa-se num intervalo de 7 a 10 horas, contudo a sua excreção urinária é inferior a 20%, com uma eliminação maioritariamente por via fecal[19,20]. A Figura 1.3 apresenta a sua estrutura molecular.

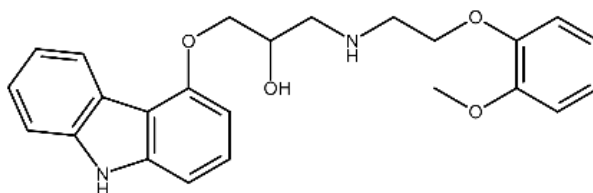


Figura 1.3 - Estrutura molecular do CAR.

O carvedilol é um fármaco relativamente bem tolerado, apresentando menos eventos de efeitos secundários que os restantes  $\beta$ -bloqueantes, contudo o efeito secundário mais recorrente é o surgimento de situações de hipotensão excessiva, devido às suas propriedades vasodilatadoras, o que causa tonturas, fadiga, dores de cabeça e vertigens. É expressamente contra-indicado para casos de hipotensão grave, insuficiência cardíaca, insuficiência hepática, ou bradicardia grave, devendo, também, haver especial cautela com pacientes asmáticos ou com outras disfunções das vias aéreas[20].

### 1.2.4. Nebivolol

O 1-(6-fluorocroman-2-il)-{[2-(6-fluorocroman-2-il)-2-hidroxi-etil]amino}etanol, que comumente é designado como nebivolol (NEB;  $C_{22}H_{25}F_2NO_4$ ;  $MM = 405,4 \text{ g mol}^{-1}$ ), inclui-se na classe de  $\beta$ -bloqueantes de 3ª geração, tal como o CAR, sendo, contudo, altamente seletivo para recetores  $\beta$ -1 adrenérgicos. Prescrito, principalmente, para tratamento de hipertensão, foi aprovado pela FDA em dezembro de 2007. Trata-se de uma medicação administrada exclusivamente por via oral, e que após ser metabolizada pelo organismo apresenta semivida de 12 horas, sendo perto de 40% excretado por via urinária[21,22]. Na Figura 1.4 apresenta-se a estrutura molecular do NEB.

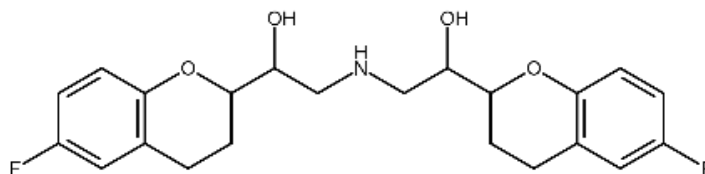


Figura 1.4 - Estrutura molecular do NEB.

Este medicamento induz a produção de óxido nítrico, o que lhe confere propriedades vasodilatadoras adicionais, e, devido à sua afinidade a recetores  $\beta$ -1 superior à das restantes moléculas desta classe, apresenta uma elevada tolerabilidade em pacientes com doenças pulmonares. É recomendada cautela na sua aplicação em caso de histórico de anafilaxia grave a diversos alérgenos. Dor de cabeça é o efeito secundário mais frequentemente relatado[22].

### 1.2.5. Pindolol

O 1-(1H-indol-4-iloxi)-3-(isopropilamino)-2-propanol, habitualmente denominado por pindolol (PIN;  $C_{14}H_{20}N_2O_2$ ;  $MM = 248,32 \text{ g mol}^{-1}$ ), é um  $\beta$ -bloqueante não seletivo de 1ª geração. Esta medicação recebeu aprovação da FDA em setembro de 1982, e é amplamente utilizado no tratamento de hipertensão e angina de peito. Encontra-se disponível para tratamento por via oral, sendo que no organismo é maioritariamente metabolizado pelo fígado. A sua excreção ocorre essencialmente através da urina, e apresenta semivida entre 3 e 4 horas[23,24]. A sua estrutura molecular encontra-se reproduzida na Figura 1.5.

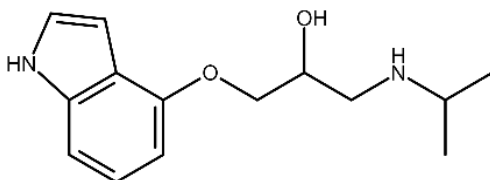


Figura 1.5 - Estrutura molecular do PIN.

Os principais efeitos secundários apresentados após ingestão de PIN incluem fadiga, depressão, perda de memória, bradicardia, hipotensão, disfunção erétil, membros frios e tonturas[24].

### 1.2.6. Propranolol

O 1-(isopropilamino)-3-(1-naftiloxi)-2-propanol, geralmente identificado como propranolol (PRO;  $C_{16}H_{21}NO_2$ ;  $MM = 259,34 \text{ g mol}^{-1}$ ), também se inclui na 1ª geração de  $\beta$ -bloqueantes. Este foi o primeiro  $\beta$ -bloqueante desenvolvido com sucesso, em 1964, e representou um grande marco para o tratamento de doenças cardiovasculares, com Sir James Black a ser galardoado com um prémio Nobel pelo trabalho que permitiu a sua descoberta. Logo

em novembro de 1967 foi aprovado pela FDA. Apesar de se recorrer a esta medicação, que pode ser administrada por via oral ou intravenosa, para o tratamento de diversas doenças, esta é maioritariamente utilizada como agente anti-hipertensivo. É uma molécula fortemente lipossolúvel, o que lhe confere elevada capacidade de penetração hematoencefálica, e que também pode motivar os seus efeitos cardioprotectores. A sua semivida varia de 3 a 6 horas, e é excretado através da urina quase na sua totalidade[9,11,25,26]. A Figura 1.6 apresenta a respetiva estrutura molecular.

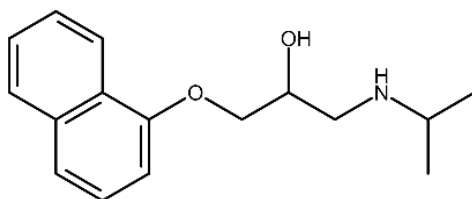


Figura 1.6 - Estrutura molecular do PRO.

Nos principais efeitos secundários do PRO incluem-se bradicardia, dor abdominal, disfunção erétil, problemas gastrointestinais e náuseas. Em pacientes em tratamento com PRO, é considerada conveniente a monitorização regular da pressão arterial, frequência cardíaca e respiratória, sendo contraindicada a sua utilização em pacientes com bradicardia ou outras patologias pulmonares, como a asma. Em eventos de toxicidade, poderá ser letal, causando bradiarritmia, bradicardia profunda, broncoespasmos ou hipotensão[25,26].

Torna-se, assim, notório que os  $\beta$ -bloqueantes são moléculas distintas entre si, o que resulta em diferenças nas suas propriedades farmacológicas, como a atividade simpaticomimética intrínseca (ISA, do inglês *intrinsic sympathomimetic activity*), a distribuição corporal, o grau de lipofilicidade, o metabolismo hepático, a via de excreção, a permeabilidade da barreira hematoencefálica, a seletividade aos recetores  $\beta$  adrenérgicos ou até a concentração no sangue. No caso das moléculas com propriedades de ISA, como o PIN, são registados menores efeitos na frequência cardíaca, comparativamente às que não a exibem. Já o metabolismo hepático deste grupo farmacológico apresenta valores mínimos de 50%. Por outro lado, com base nas suas propriedades farmacocinéticas, os  $\beta$ -bloqueantes podem considerar-se lipossolúveis ou hidrossolúveis. O grupo lipossolúvel sofre absorção completa pelo intestino delgado e atinge elevadas concentrações no cérebro, pelo que bloqueia melhor a descarga simpática no hipotálamo. São compostos metabolizados pelo fígado, o que origina variações plasmáticas mais amplas e interações medicamentosas mais significativas, sendo a sua semivida de eliminação considerada curta. O CAR, NEB e PRO são exemplos de  $\beta$ -bloqueantes lipossolúveis. O grupo hidrossolúvel é parcialmente absorvido no intestino, penetrando mais dificilmente a barreira hematoencefálica, o que origina menos efeitos secundários. Acabam por ser excretados inalterados pelos rins, ou seja, não são metabolizados hepaticamente, e apresentam semividas de eliminação mais longas, exigindo, contudo, dosagem ajustada à função renal. O ATN, em particular, apresenta características hidrofílicas. Já moléculas como o BIS e o PIN encontram-se num patamar intermédio e acabam por ser parcialmente eliminadas pelo fígado e pelos rins[8,10,11,27]. Na Tabela 1.2, resumem-se algumas das propriedades distintas dos seis  $\beta$ -bloqueantes apresentados [15-26].

Tabela 1.2 - Propriedades farmacológicas dos seis  $\beta$ -bloqueantes[15-26].

$\beta$ -bloqueante	Lipofilicidade	Excreção urinária (%)	Semivida (h)	ISA
ATN	Baixa	85	6-7	Nula
BIS	Moderada	50	10-12	Nula
CAR	Moderada	16	7-10	Nula
NEB	Moderada	38	12	Nula
PIN	Elevada	80	3-4	Moderada
PRO	Elevada	91	3-6	Nula

Embora seja possível encontrar referências de concentração de  $\beta$ -bloqueantes em plasma, com variações de 10 a 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ [28] (ATN: 100 – 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; BIS: 10 – 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; CAR: 20 – 300  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; NEB: 20 – 200  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; PIN: 20 – 150  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; PRO: 20 – 300  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) a realidade é que não existem valores estabelecidos para concentrações destes fármacos noutras amostras biomédicas, como urina e saliva. Tal deve-se ao facto de a sua concentração ser fortemente influenciada pela dosagem administrada, geralmente de 100 a 1200 mg diários, pela interação com outra medicação prescrita, e pelo metabolismo do próprio paciente. A variação de propriedades farmacológicas já descritas também afeta a sua tolerância e aceitação pelo organismo. Sabe-se, ainda assim, que as concentrações terapêuticas dos  $\beta$ -bloqueantes em amostras biológicas se encontram na gama das partes-por-bilião (ppb;  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), e, dada a possibilidade de reação variável em cada organismo, torna-se crucial o desenvolvimento de metodologias de rápida e fácil aplicação para a monitorização terapêutica[10,28,29].

### 1.3. Outras aplicações dos $\beta$ -bloqueantes

Mais recentemente, a aplicação terapêutica de  $\beta$ -bloqueantes em diversas condições não cardiovasculares tem sido igualmente explorada em outros domínios da medicina[30–33]. Uma vez que a estimulação dos recetores  $\beta$  adrenérgicos tem a capacidade de induzir ansiedade no organismo humano, é expectável que a administração de  $\beta$ -bloqueantes apresente, então, efeitos ansiolíticos. É inclusivamente observado, em doentes cardíacos, que a ingestão desta medicação, além de controlar os principais sintomas das doenças, resulta paralelamente numa diminuição da usual ansiedade que os acompanha.

Os pacientes diagnosticados com ansiedade clínica partilham sintomas de carácter psicossomático com doentes que apresentam distúrbios cardiovasculares, como são as palpitações, nervosismo, cansaço, falta de ar, dor de cabeça, tremores ou insónias. Isto implica que os  $\beta$ -bloqueantes representam uma alternativa no tratamento desta condição, ainda que pacientes com ansiedade predominantemente somática reajam melhor a este tratamento, comparando com aqueles em que prevalecem sintomas psíquicos. Estes fármacos são vantajosos relativamente a terapias mais comuns nestas situações, uma vez que não produzem nem sedação, nem dependência[34].

Além da ansiedade clínica convencional, também se torna clara a utilidade dos  $\beta$ -bloqueantes para a terapêutica de situações de *stress* quotidianas antecipadas, como é o caso de situações de exposição social, exames ou procedimentos ortodônticos. Estudos que compararam indivíduos medicados com  $\beta$ -bloqueantes e com placebo, em situações de *stress* quotidiano antecipado, demonstraram tais benefícios, sendo a redução de tremores a principal melhoria registada[34,35].

Em estudos realizados [32,33,36,37] em situações de tremores induzidos por terapia de lítio e abstinência alcoólica também se registam resultados favoráveis significativos. No primeiro caso, é presumível que a inibição de tremores se deva ao efeito simpático sobre os recetores  $\beta$  adrenérgicos, reduzindo a ação do sistema nervoso central. Na segunda condição, são registados sintomas de ansiedade tensorial, tremor, inquietação motora, irritabilidade e sudorese profusa, que, dada a sua presumível origem adrenérgica, apresentam resposta positiva à atividade dos  $\beta$ -bloqueantes. Por sua vez, em casos de abstinência de opiáceos ou de controlo de agressividade e raiva, os resultados obtidos até agora não são conclusivos, pelo que os especialistas consideram necessária a realização de mais estudos para confirmar os seus benefícios[34].

Em suma, os  $\beta$ -bloqueantes demonstram resultados terapêuticos favoráveis significativos em sintomas somáticos presentes em distúrbios não cardiovasculares, principalmente ansiedade, *stress* quotidiano antecipado, tremores induzidos por lítio e abstinência alcoólica. Configuram, assim, uma alternativa às terapias comuns, e apresentam propensão a abuso e dependência significativamente reduzida.

#### **1.4. O papel dos $\beta$ -bloqueantes no desporto**

Paralelamente ao seu uso terapêutico, os  $\beta$ -bloqueantes começaram a ser utilizados por praticantes de desportos em que a precisão é fundamental, devido à sua tendência para reduzir tremores e frequência cardíaca. Uma vez que tais propriedades resultam numa melhoria do desempenho e conseqüente vantagem sobre os restantes atletas, esta medicação foi proibida pela Agência Mundial Antidopagem (WADA, do inglês *World Anti-Doping Agency*). De acordo com a “Lista de Substâncias e Métodos Proibidos” da WADA e a legislação portuguesa, os  $\beta$ -bloqueantes estão proibidos em competição nas modalidades de automobilismo, bilhar, esqui, golfe, minigolfe, setas, desportos subaquáticos, tiro e tiro com arco, sendo que nestes últimos três casos, a restrição também se aplica fora de competição[38,39].

Para garantir consistência de medições entre os laboratórios antidopagem a nível mundial, a WADA definiu um limite mínimo de desempenho exigido para a deteção de cada substância proibida em situações de rotina. No caso dos  $\beta$ -bloqueantes, o valor requerido é de 50 ng mL<sup>-1</sup>. É também a partir deste limite que estes agentes dopantes devem ser reportados em casos em que o seu consumo apenas é proibido em competição, enquanto nas restantes modalidades qualquer concentração detetada deve ser reportada[40].

Existem, contudo, exceções definidas pelas diretrizes para isenção de uso terapêutico. Tal ocorre em casos clínicos singulares, de atletas com problemas cardiovasculares que pratiquem as modalidades acima enumeradas, para quem os tratamentos alternativos não se revelem apropriados, ou o uso desta medicação a longo prazo apresente eficácia terapêutica estável[41].

## 1.5. $\beta$ -bloqueantes e o ambiente

Nas últimas décadas, a detecção de vestígios de compostos farmacêuticos em matrizes ambientais tem captado a atenção da comunidade científica. Entre estes contaminantes emergentes, encontram-se frequentemente  $\beta$ -bloqueantes, presumivelmente devido à natureza crónica dos sintomas que tratam, e consequente necessidade de administração a longo prazo[42,43].

Conforme foi descrito anteriormente, os  $\beta$ -bloqueantes são excretados, metabolizados ou não, através de fluidos biológicos, o que resulta na sua descarga nos sistemas de esgotos urbanos. Embora estas águas sejam processadas em estações de tratamento de águas residuais (ETAR), a realidade é que alguns dos seus integrantes, como são os  $\beta$ -bloqueantes, apresentam baixas taxas de remoção e acabam por atingir as águas superficiais, subterrâneas e potáveis. Note-se que em casos como o do PRO, a taxa de excreção por via urinária atinge quase os 100%, porém a sua taxa de remoção em ETAR é de apenas cerca de 50%[44]. Ainda assim, existem outras fontes de contaminação, nomeadamente de águas residuais hospitalares – matriz complexa, composta por excreções contagiosas, desinfetantes, compostos farmacêuticos, fluidos biológicos, etc. –, da indústria farmacêutica, e até mesmo da eliminação inadequada de medicamentos não usados ou fora do prazo de validade[42,43,45,46].

Diversos estudos têm relatado concentrações de  $\beta$ -bloqueantes em águas ambientais e de ETAR a variar entre as ppb e as partes-por-trilião (ppt; ng L<sup>-1</sup>)[42,44,46]. Isto torna-se alarmante, considerando que os seus efeitos podem ser nefastos em organismos não-alvo da fauna e flora aquática, como peixes, algas e moluscos, mesmo ao nível vestigial, afetando o crescimento, a reprodução, a frequência cardíaca ou até causando respostas de *stress*. Para além do mais, diversos investigadores também têm apontado para a sua classificação como potenciais químicos desreguladores endócrinos, dada a elevada capacidade para afetar as funções reprodutoras[42,45].

## 1.6. Monitorização de $\beta$ -bloqueantes

Considerando a informação apresentada nos subcapítulos anteriores, a quantificação de  $\beta$ -bloqueantes em diferentes matrizes é crucial em contexto de monitorização terapêutica, toxicologia e controlo de *doping*, ao nível das ppb, e em análises ambientais, onde é requerida uma sensibilidade até ao nível das ppt. Para este efeito, têm sido propostas e desenvolvidas diversas metodologias analíticas nos últimos anos.

De acordo com a literatura, os  $\beta$ -bloqueantes são geralmente analisados com recurso a distintas técnicas de preparação de amostra e métodos instrumentais de análise, que permitem a sua determinação em diversos tipos de matriz. No sentido de alcançar os níveis vestigiais exigidos pelos contextos em que surgem estes fármacos, nos últimos anos têm sido propostas diversas técnicas de preparação de amostra, destacando-se a extração líquido-líquido (LLE) [47,48], extração em fase sólida (SPE) [49–51], extração sortiva em barra de agitação (SBSE) [52,53], microextração em fase líquida (LPME) [54] e microextração em fase sólida (SPME) [55].

No âmbito da análise instrumental, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) destaca-se para identificação e quantificação destas moléculas em amostras farmacêuticas, biológicas e ambientais, dada a sua seletividade, fiabilidade e sensibilidade, além de não requerer

procedimentos de derivatização. Geralmente, surge associada a detetores de ultravioleta (UV) [56–59], rede de díodos (DAD) [50,51,54,60] e fluorescência (FLD) [29,53], bem como acoplada a espectrometria de massa (MS) e sistemas *Tandem* (MS/MS) [61–63]. A separação por HPLC é predominantemente efetuada com recurso a colunas de fase reversa. Alternativamente, também se encontram estudos que recorrem a técnicas como cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) [64,65] e cromatografia em fase líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS) [49,55,66,67].

## 1.7. Técnicas de preparação de amostra

A preparação de amostra é um passo considerado necessário em diversos métodos analíticos, principalmente para análise de amostras complexas, como são, por exemplo, as matrizes biomédicas, alimentares ou ambientais. O processo de preparação de amostra permite a concentração e extração de analitos, obtendo-se uma solução apropriada para análise instrumental quando presentes na matriz original em níveis vestigiais, mas também a remoção de potenciais interferentes. Assim, a aplicação de técnicas de preparação de amostra origina maior seletividade e sensibilidade analítica.

As abordagens de preparação de amostra têm evoluído ao longo do tempo, por forma a simplificar e miniaturizar o processo, particularmente em análise vestigial. Neste sentido, tem se recorrido a dispositivos analíticos de fácil manipulação, reduzindo ou excluindo o recurso a solventes orgânicos tóxicos e utilizando um menor volume de amostra, cumprindo assim os princípios da química analítica verde (GAC, do inglês *green analytical chemistry*)[68].

Deste modo, surgiram técnicas de preparação de amostra que recorrem a microextração estática, minimizando o consumo de solvente, como a SPME e SBSE. Entre as vantagens destas técnicas *solvent-free*, destaca-se a possibilidade de agregar num só passo a extração e concentração das moléculas-alvo. Isto permite uma manipulação fácil e rápida, requerendo pouco volume de amostra, e permite a reutilização dos dispositivos de extração, o que as torna pouco dispendiosas. Podem, também, ser facilmente combinadas com instrumentação analítica moderna, o que possibilita a sua aplicação em diversas áreas.

Ambas as técnicas, SPME e SBSE, recorrem preferencialmente a polidimetilsiloxano (PDMS) como fase sortiva, sendo baseadas nos mesmos princípios de atuação, porém, a segunda exhibe maior sensibilidade devido à maior quantidade de sorvente utilizada. A SBSE revela-se mais bem-sucedida para a monitorização de compostos orgânicos ao nível vestigial em matrizes aquosas. Por seu turno, a utilização de fibras mais dispendiosas e frágeis por SPME revela-se uma limitação analítica[68].

Quando aplicadas à análise de  $\beta$ -bloqueantes, de acordo com a literatura, tanto a SPME como a SBSE permitem a análise de amostras biológicas aquosas (por exemplo, urina e plasma), alcançando-se limiares analíticos ao nível das ppb[52,53,55,69].

### 1.7.1. Extração sortiva em barra de agitação

A técnica de SBSE recorre a dispositivos analíticos constituídos por barras de agitação magnéticas incorporadas em tubos de vidro, revestidos por PDMS, conforme ilustrado na Figura 1.7. Esta é uma fase polimérica apolar que promove interações hidrofóbicas com os analitos, essencialmente através de forças de van-der-Waals, ainda que também se possam estabelecer ligações de hidrogénio, dependendo da estrutura molecular das moléculas-alvo[68].

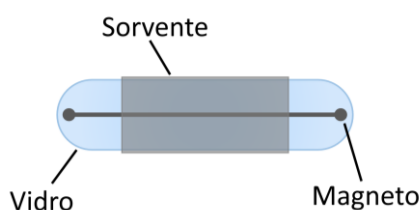


Figura 1.7 - Esquema representativo do dispositivo utilizado em SBSE.

Qualquer esquema analítico que implique a utilização de SBSE, abrange dois passos fundamentais: a extração, por meio da migração dos analitos da amostra para a fase sorvente, e a retroextração, aquando da dessorção dos mesmos do PDMS para o sistema cromatográfico. Por este motivo, a eficiência do processo depende da partição dos analitos entre o PDMS do dispositivo de extração, e a matriz aquosa ( $K_{\text{PDMS/W}}$ ). Este é um comportamento considerado semelhante à distribuição que ocorre no coeficiente de partição octanol/água ( $K_{\text{PDMS/W}} \approx K_{\text{O/W}}$ ). Determina-se, assim, que o  $K_{\text{PDMS/W}}$  é dado pela razão entre as concentrações do analito na fase sorvente e na fase aquosa, após ser alcançado o equilíbrio da extração.

A SBSE apresenta a vantagem de poder ser utilizada centenas de vezes sem que ocorra degradação física do revestimento do dispositivo, recorrendo apenas a limpeza com solventes adequados (por exemplo, acetonitrilo) ou tratamento por dessorção térmica. Por outro lado, a técnica encontra-se limitada pela utilização de PDMS que, sendo um polímero apolar, torna-se ideal para compostos com polaridade semelhante ( $\log K_{\text{O/W}} \geq 3$ ), não permitindo que compostos polares ( $\log K_{\text{O/W}} < 3$ ) sejam extraídos de forma eficiente[68].

### 1.7.2. Microextração adsortiva em barra

A microextração adsortiva em barra (BA $\mu$ E) surgiu em 2010 como alternativa às técnicas de microextração estática, SPME e SBSE[70]. A BA $\mu$ E responde às baixas eficiências obtidas pelas técnicas já estabelecidas no que diz respeito ao enriquecimento de compostos mais polares em meio aquoso. Desde o seu desenvolvimento, tem demonstrado elevada eficácia para análise vestigial de compostos tanto polares como apolares, numa vasta gama de matrizes, permitindo seleccionar o sorvente mais conveniente para a aplicação em causa.

Os dispositivos de BA $\mu$ E caracterizam-se pela fácil preparação em qualquer laboratório, consistindo em tubos ocos em polipropileno (15 mm de comprimento e 2 mm de diâmetro interno) revestidos com um filme adesivo, que permite fixar o material sorvente finamente dividido mais adequado[70,71]. A constituição destes dispositivos é ilustrada na Figura 1.8.

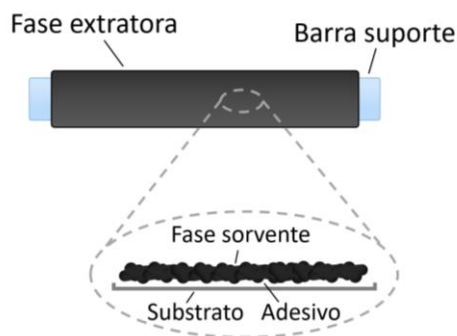


Figura 1.8 - Esquema representativo do dispositivo utilizado em BAμE.

As fases sorventes utilizadas nesta técnica incluem carvões ativados (AC, do inglês *activated carbons*) e fases poliméricas, podendo ainda optar-se por materiais comerciais, geralmente utilizados por SPE, mas também recorrer a materiais preparados no próprio laboratório. Dependendo do tipo de fases envolvidas, os AC apresentam essencialmente mecanismos eletrostáticos e/ou dispersivos, enquanto os polímeros possuem na sua maioria propriedades de tipo fase reversa.

Esta é uma técnica que também se enquadra nos princípios da GAC, requerendo volumes negligenciáveis de solventes orgânicos, pequenas quantidades de material sorvente, e reduzindo, ou mesmo eliminando, a necessidade de derivatização dos analitos. Destaca-se, também, a redução de etapas analíticas, sem comprometer a eficiência do processo, e o recurso a dispositivos pouco dispendiosos, fáceis de preparar e manipular.

Enquanto técnicas como a SPME e SBSE operam através de enriquecimento por *headspace* ou imersão direta, a BAμE opera por meio de “amostragem de flutuação”. Desta forma, os dispositivos de microextração, por serem menos densos que a água, posicionam-se imediatamente sob o *vórtex* criado pela barra de agitação magnética, conforme se pode observar na Figura 1.9. Este tipo de abordagem permite alcançar resultados reprodutíveis e robustos, sem degradação física da superfície sorvente por contacto direto com as paredes do frasco de amostragem durante o processo de extração[70,71].

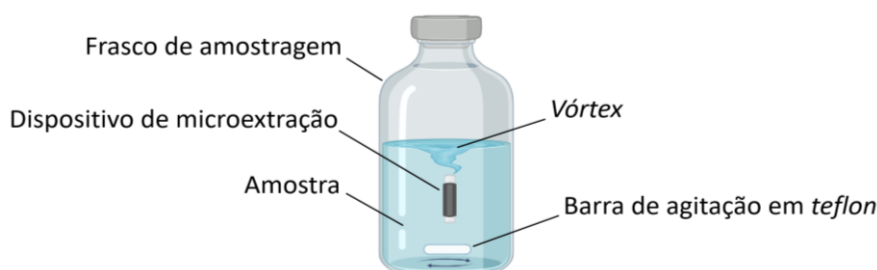


Figura 1.9 - Representação esquemática do processo de microextração em BAμE.

Qualquer procedimento experimental da BAμE engloba duas fases essenciais, a microextração e a dessorção ou retroextração, que requerem a otimização de parâmetros experimentais de modo a maximizar a sua eficiência. A etapa de microextração, previamente ilustrada na Figura 1.9, permite a transferência das moléculas-alvo da amostra para o material

sorvente, exigindo a otimização de parâmetros como o tempo de equilíbrio, a velocidade de agitação, e características da matriz, como pH, força iônica e polaridade. Na etapa de retroextração os dispositivos são submetidos a dessorção líquida (LD, do inglês *liquid desorption*) por meio de sonificação, o que implica a otimização do tipo de solvente e tempo de dessorção. Após otimização e validação qualquer amostra se encontra apta para análise instrumental, nomeadamente por técnicas cromatográficas.

Salienta-se a boa eficiência desta técnica na análise de diversos compostos, nomeadamente ácido salicílico, estrogénios, carbamazepina e canabinóides sintéticos[72]. Assim, a versatilidade de aplicações que se verifica, adequando o sorvente ao tipo de análise pretendida, para diversos fármacos em matrizes aquosas desde biológicas a ambientais, permite intuir a sua aplicabilidade na determinação vestigial de  $\beta$ -bloqueantes em diversos tipos de matrizes reais[70,71].

## 1.8. Conceitos teóricos de cromatografia

A cromatografia é uma técnica extensamente utilizada para a separação, identificação e quantificação dos constituintes de misturas. A sua ampla aplicação em diversas áreas, como química, farmacêutica ou ambiental, desde a investigação à indústria, demonstra a sua elevada abrangência.

De forma a compreender melhor os métodos cromatográficos, é essencial ter em conta diversos conceitos básicos. Note-se que estas técnicas têm por base as diferentes taxas de afinidade entre os componentes da mistura e duas fases. Uma fase estacionária, sólida ou líquida (suportada numa coluna ou superfície plana), através da qual se desloca a outra fase, a móvel, que pode consistir num gás, líquido ou fluido supercrítico. A separação ocorre devido à diferença de velocidade dos componentes quando arrastados pela fase móvel, gerada pelas interações distintas com a fase estacionária, e sendo promovidas distribuições diferentes no equilíbrio gerado entre ambas.

As concentrações relativas de um componente na fase estacionária ( $c_S$ ) e na fase móvel ( $c_M$ ) relacionam-se por meio do coeficiente de distribuição ( $K$ ), dado pela Equação 1.1:

$$K = \frac{c_S}{c_M} \quad [1.1]$$

Um maior valor de  $c_S$  implica um maior valor de  $K$ , indicando uma maior interação com a fase estacionária. Componentes com valores de  $K$  elevados deslocar-se-ão mais lentamente através da coluna, o que permite a sua separação dos componentes com valores de  $K$  menores. Assim, a migração diferencial depende de variáveis experimentais que afetam a distribuição, como são as características das fases móvel e estacionária envolvidas[73].

Considerando uma mistura de dois componentes, a sua separação apenas se verifica caso sejam retidos de forma distinta pela fase estacionária, o que implicará volumes distintos de fase móvel para a sua eluição. Um componente não retido eluirá no designado tempo morto ( $t_M$ ) enquanto o composto retido eluirá posteriormente, percorrendo a coluna num tempo de retenção ( $t_R$ ) superior. O tempo que o composto despende na fase estacionária corresponde ao tempo de retenção ajustado ( $t'_R$ )[74]. Na Figura 1.10 ilustram-se os conceitos aqui descritos.

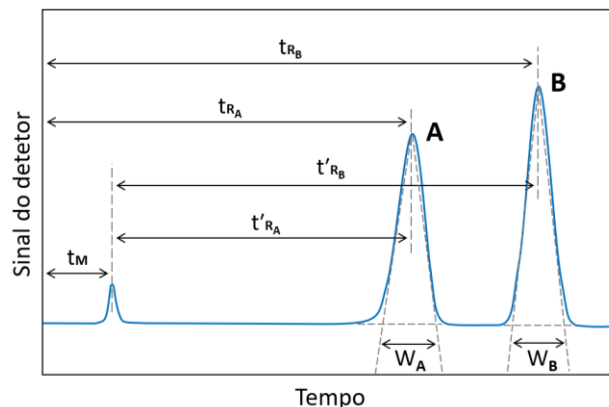


Figura 1.10 - Ilustração do tempo morto ( $t_M$ ), tempo de retenção ( $t_R$ ), tempo de retenção ajustado ( $t'_R$ ) e largura da base do pico ( $W$ ) dos picos A e B num processo cromatográfico.

O fator de capacidade ( $k'$ ) é uma medida do grau de retenção e pode ser calculada através da Equação 1.2, desde que o fluxo se mantenha constante[73]:

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad [1.2]$$

A separação de dois compostos adjacentes pode ser expressa pelo fator de separação ou seletividade ( $\alpha$ ). Este encontra-se relacionado com a fase estacionária e as condições de operação, tratando-se da razão entre os fatores de capacidade dos dois componentes, como se verifica na Equação 1.3[74]:

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} \quad [1.3]$$

Consistindo a cromatografia num fenómeno de transferência de massa, a eficiência de uma coluna cromatográfica pode ser expressa através do número de pratos teóricos ( $N$ ), uma grandeza que exprime o número de equilíbrios ocorridos durante a separação. Quanto maior o valor de  $N$ , maior será o número de equilíbrios. Na Equação 1.4,  $W$  corresponde à largura da base de um pico simétrico, conforme ilustrado na Figura 1.10[74]:

$$N = 16 \times \left(\frac{t_R}{W}\right)^2 \quad [1.4]$$

Dado que as técnicas cromatográficas têm como objetivo a separação de todos os componentes de uma mistura, é possível medir a separação completa, ou resolução ( $R_S$ ), entre dois picos adjacentes por meio da Equação 1.5:

$$R_S = \frac{\sqrt{N}}{4} \times \frac{\alpha - 1}{\alpha} \times \frac{k'_B}{k'_B + 1} \quad [1.5]$$

Para qualquer pico com formato gaussiano, verifica-se resolução de eventuais picos adjacentes sempre que  $R_S \geq 1,5$ [73].

De uma forma geral, os métodos cromatográficos podem ser classificados com base no suporte da fase estacionária, como cromatografia em coluna ou planar. A cromatografia em coluna caracteriza-se por ter a fase estacionária contida num tubo estreito, através do qual a fase móvel é forçada, quer por gravidade, quer por pressão. No que diz respeito à cromatografia planar, a fase

estacionária encontra-se suportada numa superfície plana, movendo-se a fase móvel por ação da capilaridade. Alternativamente, estes métodos podem ser classificados com base na natureza física da fase móvel, surgindo assim, a cromatografia em fase gasosa, fase líquida e fluido supercrítico. Tanto a cromatografia em fase gasosa como a de fluido supercrítico carecem da utilização obrigatória de uma coluna, enquanto a cromatografia em fase líquida permite recorrer a colunas ou a superfícies planas, para suporte da fase estacionária. A cromatografia, pode ainda ser classificada de acordo com os mecanismos de separação, nomeadamente, partição, adsorção, troca iónica, afinidade, e exclusão molecular[73,74].

### 1.8.1. Cromatografia líquida de alta eficiência

Na cromatografia líquida em coluna clássica, a deslocação da fase móvel ocorre por ação da gravidade, o que resulta numa separação lenta. Porém, recorrendo a instrumentação cromatográfica moderna, como HPLC, é possível alcançar melhor eficiência e aumentar a velocidade do processo. Esta tecnologia pode ser empregue para identificação e separação em amostras constituídas por componentes orgânicos, inorgânicos ou mesmo biológicos, semi-voláteis a não voláteis e/ou termolábeis.

Os principais dispositivos de um sistema de HPLC são os reservatórios de solvente, a bomba, o injetor, a coluna, o detetor, e o *software* para controlo, tratamento e aquisição de dados[73,74]. O esquema da Figura 1.11 descreve um sistema convencional de HPLC.

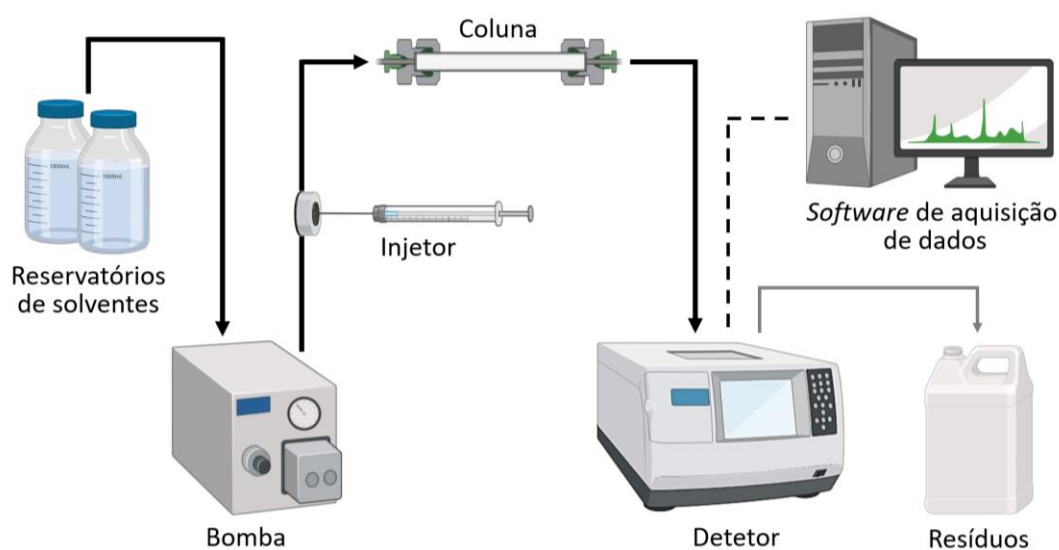


Figura 1.11 - Representação esquemática dos principais componentes de um sistema convencional de HPLC.

Nos sistemas de HPLC, os solventes que constituem a fase móvel, geralmente orgânicos e aquosos, encontram-se armazenados em reservatórios de vidro, que devem estar equipados com desgaseificador, de forma a remover sobretudo o ar nos solventes usados.

A bomba do sistema é responsável por forçar a fase móvel a atravessar a coluna, sendo as recíprocas as mais comuns, cujo funcionamento pode ser isocrático, binário ou quaternário. As análises podem ser realizadas recorrendo a eluição isocrática, em que a composição do solvente

se mantém inalterada, ou a eluição por gradiente, que implica uma composição da fase móvel variável ao longo do tempo[73].

A introdução das amostras na instrumentação pode ser executada manualmente, com recurso a seringas convencionais, ou de forma automatizada, quando o sistema possui um amostrador automático. O sistema de *loop* de injeção é amplamente utilizado, exibindo grande reprodutibilidade, pois permite definir o volume da amostra, geralmente compreendido entre 10 e 100  $\mu\text{L}$ [74].

É na coluna cromatográfica que ocorre a separação dos analitos-alvo. Estas são constituídas por tubos em aço inoxidável, ainda que também possam ser de vidro ou plástico. Geralmente apresentam comprimento de 5 a 25 cm e diâmetro interno de 3 a 5 mm, contendo enchimento com partículas com diâmetro de 3 a 5  $\mu\text{m}$ . Opcionalmente, podem ser agregadas pré-colunas, cujo objetivo é aumentar o tempo de vida da coluna analítica, retendo potenciais contaminantes ou interferentes presentes na amostra. De acordo com a polaridade do enchimento, as colunas podem ser classificadas de fase normal, quando usadas fases estacionárias polares (por exemplo, sílica), ou de fase reversa, quando são utilizadas partículas apolares (por exemplo, octadecilsílica), sendo estas últimas as mais usadas[73].

Posteriormente, os compostos separados são detetados por meio de um dispositivo adequado. Para esse efeito pode recorrer-se a múltiplos detetores que se adequam ao sistema de HPLC. Estes baseiam-se em diferentes propriedades físicas e químicas dos solutos ou em variações de propriedades da fase móvel. O detetor ultravioleta-visível (UV-vis) é dos mais comuns e pode operar em comprimento de onda variável ou múltiplo. Por seu turno, o DAD, apresenta a vantagem de permitir o varrimento espectral em simultâneo, conseguindo uma melhor identificação dos analitos. Outros meios de deteção comuns são o FLD e o acoplamento a MS[74].

Por fim, as variações provocadas no detetor são registadas pelo *software* associado ao sistema, sendo possível obter os cromatogramas e os dados analíticos de acordo com o objetivo qualitativo ou quantitativo do trabalho.

## 1.9. Objetivos

Embora existam diversas abordagens propostas para análise de  $\beta$ -bloqueantes em matrizes biológicas ou ambientais, considerou-se que seria importante desenvolver uma nova metodologia que pudesse ser mais bem-sucedida, com gama linear mais ampla e que permitisse a análise simultânea de amostras aquosas com origem biológica e ambiental.

Assim, no presente trabalho propõe-se o desenvolvimento de uma metodologia inovadora e alternativa para a monitorização de seis  $\beta$ -bloqueantes amplamente prescritos a doentes cardíacos a nível mundial, nomeadamente, ATN, BIS, CAR, NEB, PIN e PRO. Neste sentido procedeu-se aos seguintes desenvolvimentos:

- Otimizar a metodologia BA $\mu$ E- $\mu$ LD/HPLC-DAD para identificação dos referidos  $\beta$ -bloqueantes em matrizes aquosas;
- Validar a metodologia otimizada, nomeadamente gama linear, precisão, exatidão e limiares analíticos associados;
- Aplicar a metodologia otimizada e validada na monitorização dos seis  $\beta$ -bloqueantes em amostras reais de urina, plasma, saliva e água de efluente de ETAR, por forma a averiguar a influência da matriz no seu desempenho;
- Comparar a metodologia proposta com outras bem estabelecidas internacionalmente.

## 2. Parte experimental

### 2.1. Reagentes, materiais sorventes e amostras

O metanol (MeOH, 99,9%) e o acetonitrilo (ACN, 99,9%) de qualidade para HPLC, o ácido fórmico (CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 99%) e o ácido acético (CH<sub>3</sub>COOH, 99,5%) foram obtidos da Carlo Erba (Espanha). O hidróxido de sódio (NaOH, 98%) foi obtido da BDH Chemicals (Inglaterra). O ácido clorídrico (HCl, 37%) foi obtido da Sigma-Aldrich (Áustria). O cloreto de sódio (NaCl, ≥ 99,5%) foi obtido da Honeywell Fluka (Alemanha). A água ultrapura foi obtida do sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore, EUA).

Os padrões analíticos preparados com recurso a comprimidos obtiveram-se por meio de extração dos β-bloqueantes com MeOH[72]. O fumarato de BIS, de nome comercial Bisoprolol Ratiopharm (5 mg), foi obtido da Ratiopharm (Portugal). O CAR, de nome comercial Carvedilol Mylan (25 mg), foi obtido da Mylan (Irlanda). O cloridrato de NEB, nome comercial Nebivolol Teva (5 mg), foi obtido da Teva (Grécia). O ATN (99%) foi obtido da Dr. Ehrenstorfer (Alemanha). O PIN (> 98%) foi obtido da Sigma-Aldrich (Japão). O cloridrato de PRO (99%) foi obtido da Aldrich (China).

Os AC comerciais usados nos diversos ensaios foram SX plus (pH<sub>PZC</sub>: 8,4; área superficial: 833 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>; V<sub>meso</sub>: 0,44 cm<sup>3</sup> g<sup>-1</sup>; V<sub>micro</sub>: 0,23 cm<sup>3</sup> g<sup>-1</sup>), SX 1 (pH<sub>PZC</sub>: 8,4; área superficial: 900 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>), CN 1 (pH<sub>PZC</sub>: 5,1; área superficial: 1179 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>; V<sub>meso</sub>: 0,68 cm<sup>3</sup> g<sup>-1</sup>; V<sub>micro</sub>: 0,30 cm<sup>3</sup> g<sup>-1</sup>) e CA 1 (pH<sub>PZC</sub>: 2,2; área superficial: 1043 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>; V<sub>meso</sub>: 0,66 cm<sup>3</sup> g<sup>-1</sup>; V<sub>micro</sub>: 0,26 cm<sup>3</sup> g<sup>-1</sup>) obtidos da Salmon & Cia (Portugal), e R (pH<sub>PZC</sub>: 6,5; área superficial: 964 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>; V<sub>meso</sub>: 0,40 cm<sup>3</sup> g<sup>-1</sup>; V<sub>micro</sub>: 0,25 cm<sup>3</sup> g<sup>-1</sup>) obtido da Riedel-de-Häen (Alemanha).

O co-polímero de fase reversa N-divinilpirrolidona-divinilbenzeno Oasis® HLB (HLB; tamanho da partícula: 30 μm; tamanho do poro: 80 Å; área superficial: 830 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>), o polímero de fase reversa de troca catiónica fraca Oasis® WCX (WCX; tamanho da partícula: 60 μm; tamanho do poro: 80 Å), o co-polímero N-divinilpirrolidona-divinilbenzeno de troca catiónica Oasis® MCX (MCX; tamanho da partícula: 30 μm; tamanho do poro: 80 Å; área superficial: 830 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>) e o co-polímero N-divinilpirrolidona-divinilbenzeno de troca aniónica Oasis® MAX (MAX; tamanho da partícula: 30 μm; tamanho do poro: 80 Å; área superficial: 830 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>) foram obtidos da Waters (EUA). O polímero de fase reversa octadecil Supelclean ENVI-18 (Envi-18; tamanho da partícula: 45 μm; tamanho do poro: 60 Å; área superficial: 475 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>), o polímero de fase reversa estireno-divinilbenzeno ENVI-Chrom P (Envi-Chrom P; tamanho da partícula: 80-160 μm; tamanho do poro: 20-300 Å; área superficial: 900 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>) e o polímero de fase normal silicato de magnésio ENVI-Florisil (Envi-Florisil; tamanho da partícula: 149-250 μm; área superficial: 289 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>) foram obtidos da Supelco (EUA). A sílica e o co-polímero etilvinilbenzeno-divinilbenzeno LiChrolut EN (DVB, tamanho da partícula: 40-120 μm; área superficial: 1200 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>) foram obtidos da Merck (Alemanha). O polímero de fase reversa estireno-divinilbenzeno Strata® SDBL (Strata DVB; tamanho da partícula: 100 μm; tamanho do poro: 260 Å; área superficial: 500 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>), o co-polímero de fase reversa estireno-divinilbenzeno-N-vinilpirrolidona Strata® X (Strata X; tamanho da partícula: 33 μm; tamanho do poro: 85 Å; área superficial: 800 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>), o polímero de fase reversa estireno-divinilbenzeno de troca aniónica fraca Strata® X-AW (Strata X-AW; tamanho da partícula: 33 μm; tamanho do poro: 85 Å; área superficial: 800 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>), o polímero de fase reversa estireno-divinilbenzeno de troca catiónica fraca Strata® X-CW (Strata X-CW; tamanho da partícula: 33 μm; tamanho do poro: 85 Å; área superficial: 800 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>), o polímero de fase normal ciano Strata® CN (Strata CN; tamanho da partícula: 55 μm; tamanho do poro: 70 Å; área

superficial:  $500 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ) e o polímero de sílica de troca catiónica forte Strata® SCX (Strata SCX; tamanho da partícula:  $55 \text{ }\mu\text{m}$ ; tamanho do poro:  $70 \text{ \AA}$ ; área superficial:  $500 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ) foram obtidos da Phenomenex (EUA). As informações sobre os materiais sorventes comerciais utilizados nos ensaios foram disponibilizadas pelos fornecedores.

As amostras de urina de controlo foram obtidas de um voluntário do sexo masculino (20-25 anos) que garantiu não ter consumido os  $\beta$ -bloqueantes em estudo. As amostras de plasma foram gentilmente cedidas pela Clínica Joaquim Chaves Saúde (Lisboa), encontrando-se já armazenadas no laboratório a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ . As amostras de saliva de controlo foram obtidas de um voluntário do sexo feminino (20-25 anos) que garantiu não ter consumido os  $\beta$ -bloqueantes em estudo. A amostra de urina com medicação foi obtida de um voluntário do sexo feminino (20-25 anos) medicado com cloridrato de PRO. A amostra de saliva com medicação foi obtida de um voluntário do sexo feminino (20-25 anos) medicado com cloridrato de PRO. A amostra de água de ETAR foi recolhida de um efluente de ETAR (Alcântara, Lisboa), encontrando-se já armazenada no laboratório a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

## 2.2. Material e equipamento

Além de material corrente de laboratório, utilizou-se uma micropipeta de  $20 - 200 \text{ }\mu\text{L}$  (Labbox, Espanha), uma micropipeta  $100 - 1000 \text{ }\mu\text{L}$  (VWR International, EUA), uma micropipeta  $1000 - 5000 \text{ }\mu\text{L}$  (VWR International, EUA), frascos de vidro de  $5 \text{ mL}$  (Macherey-Nagel, Alemanha) e respetivas tampas de plástico (diâmetro =  $18 \text{ mm}$ ), barras de agitação de *teflon*  $14 \times 6 \text{ mm}$ ,  $15 \times 4 \text{ mm}$ ,  $12 \times 4 \text{ mm}$  (VWR International, EUA), *vials* transparentes de  $2 \text{ mL}$  (ALWSCI Technologies, China) e respetivas tampas (diâmetro =  $11 \text{ mm}$ ), *inserts* de  $300 \text{ }\mu\text{L}$   $31,5 \times 5,8 \text{ mm}$  (ALWSCI Technologies, China), um encapsulador manual (Agilent Technologies, EUA), seringas de uso único Injekt de  $2 \text{ mL}$  (Braun, Alemanha) e filtros de seringa de *nylon*  $25 \text{ mm} - 0,45 \text{ }\mu\text{m}$  (Labor Spirit, Portugal).

Para efetuar pesagens recorreu-se a uma balança analítica (Mettler Toledo AG135, Suíça). Utilizaram-se duas placas de agitação múltipla de quinze posições (H+P Labortechnik AG Variomag, Alemanha; Cimarec i Poly, Alemanha), um *vortex* (Velp, Itália), um banho de ultrassons equipado com termóstato modelo 3510 E-DTH (Branson, Suíça) e uma centrífuga Z 300 (Hermle Labortechnik, Alemanha). O pH das soluções foi controlado recorrendo a um medidor de pH modelo 744 pH Meter contendo elétrodo combinado de vidro (Metrohm, Suíça).

As análises por HPLC-DAD foram efetuadas num sistema cromatográfico Agilent 1100 series LC (Agilent Technologies, Alemanha) equipado com desgaseificador a vácuo (G1322A), injetor automático (G1313A), compartimento de coluna termostaticado (G1316A) e bomba quaternária (G1311A), acoplado a um detetor de rede de díodos (DAD, G1315B). O registo de dados e o controlo instrumental realizaram-se a partir do software LC3D ChemStation (versão Rev.A.10.02[1757], Agilent Technologies, Alemanha). Utilizou-se uma coluna capilar Inertsil ODS-3 (C18,  $5 \text{ }\mu\text{m}$ ,  $4,6 \times 150 \text{ mm}$ ; GL Sciences, Japão) para as análises.

## 2.3. Método experimental

### 2.3.1. Preparação de soluções padrão

As soluções padrão prepararam-se em MeOH, sendo armazenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante todo o trabalho e renovadas quando necessário. Devido aos elevados custos para obter padrões analíticos dos compostos em estudo, houve a necessidade de preparar parte das soluções padrão a partir dos respetivos comprimidos[72]. As soluções *stock* de cada  $\beta$ -bloqueante, cujas concentrações constam na Tabela 2.1, foram preparadas individualmente. Estas soluções foram obtidas moendo os comprimidos num frasco de vidro, seguindo-se a adição de 10 mL de MeOH, agitação por 10 s no *vórtex*, 15 minutos de tratamento ultrassónico, e, por fim, filtração com filtro de *nylon* 0,45  $\mu\text{m}$  após nova agitação por 10 s no *vórtex*. Aquando da utilização de padrão sólido, apenas se mediram 10 mg do  $\beta$ -bloqueante com recurso a balança analítica, aos quais se adicionaram 10 mL de MeOH, seguido de agitação por 10 s no *vórtex* e 15 minutos de tratamento ultrassónico.

Tabela 2.1 - Massa de padrão sólido, dosagem e quantidade de comprimidos, e respetiva concentração da solução padrão mãe dos seis  $\beta$ -bloqueantes em estudo.

$\beta$ -bloqueante	Massa de padrão sólido (mg)	Dosagem do comprimido (mg)	Quantidade de comprimidos	Concentração da solução mãe ( $\text{mg L}^{-1}$ )
ATN	10	-	-	1000
BIS	-	5	2	1000
CAR	-	25	1	2500
NEB	-	5	2	1000
PIN	10	-	-	1000
PRO	10	-	-	1000

Uma solução mistura com concentração de  $100\text{ mg L}^{-1}$  de cada  $\beta$ -bloqueante foi preparada quinzenalmente a partir das soluções iniciais diluídas em ACN, armazenando-se a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . As soluções de trabalho e de calibração obtiveram-se por diluição adequada da de  $100\text{ mg L}^{-1}$  em água ultrapura. As soluções de trabalho foram preparadas diariamente.

### 2.3.2. Condições instrumentais

De forma a alcançar condições experimentais favoráveis para a análise dos  $\beta$ -bloqueantes em estudo, procedeu-se à injeção de padrões individuais de  $10\text{ mg L}^{-1}$ , preparados a partir de sucessivas diluições das soluções mãe. Testaram-se variações das condições cromatográficas, incluindo eluições isocráticas e por gradiente, com diferentes proporções de água ultrapura, MeOH e ACN, com e sem acidificação, temperatura do sistema, taxa de fluxo e volume de injeção de amostra. Este processo permitiu, também, identificar cada um dos compostos de acordo com o seu  $t_R$  caraterístico.

Recorrendo à injeção de uma solução mistura das moléculas em estudo, determinou-se que o ideal seria configurar o sistema para volume de injeção de  $20\text{ }\mu\text{L}$ , temperatura da coluna de  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  e taxa de fluxo de  $0,6\text{ mL min}^{-1}$ . Programou-se ainda eluição por gradiente, em que o

solvente A é água acidificada com ácido fórmico (0,1%, v:v) e o solvente B é MeOH, de 0 a 0,5 min 95% A, de 0,5 a 8 min 95-20% A, de 8 a 12 min 20% A, e de 12 a 13 min 20-95% A.

Com base nos espectros de absorvância (Anexo I) dos  $\beta$ -bloqueantes em estudo na gama do UV-vis, determinaram-se comprimentos de onda de trabalho de 230 nm para ATN, BIS e PRO, 265 nm para PIN, e 285 nm para CAR e NEB.

### 2.3.3. Calibração instrumental

Uma solução de 10 mg L<sup>-1</sup> foi preparada a partir da mistura de  $\beta$ -bloqueantes de 100 mg L<sup>-1</sup>. Sucessivas diluições desta solução com água ultrapura permitiram obter padrões que foram injetados no sistema cromatográfico. A partir da injeção destes padrões de calibração diluídos determinaram-se os limites de detecção (LOD, do inglês *limit of detection*) e de quantificação (LOQ, do inglês *limit of quantification*) instrumentais, com recurso a razões sinal/ruído (S/N) de 3:1 e 10:1, respetivamente.

Prepararam-se oito soluções com diferentes níveis de concentração (0,07; 0,27; 0,70; 2,50; 5,00; 7,50; 10,0 e 15,00 mg L<sup>-1</sup>) a partir da mistura de 100 mg L<sup>-1</sup>. Realizaram-se análises dos mesmos em triplicado, de forma a estudar a linearidade instrumental e a construir as respetivas curvas de calibração com seis pontos.

### 2.3.4. Preparação de dispositivos BA $\mu$ E

A aplicação da técnica de BA $\mu$ E requer preparação prévia dos dispositivos de microextração em laboratório. Para tal efeito, são utilizados cilindros ocios de polipropileno, com cerca de 15 mm de comprimento e 2 mm de diâmetro, envoltos em fita adesiva e revestidos com a fase sorvente adequada. Diversos materiais sorventes foram testados, desde AC a polímeros. Note-se que estes dispositivos foram lavados sob agitação em água ultrapura, durante 10 minutos, e secos em papel com o auxílio de uma pinça, antes de qualquer utilização[70,71].

### 2.3.5. Ensaios de otimização

O procedimento de extração foi realizado em 5 mL de água ultrapura num frasco de vidro, fortificados com 200  $\mu$ L da mistura de  $\beta$ -bloqueantes de 10 mg L<sup>-1</sup>, obtendo-se uma concentração de 400  $\mu$ g L<sup>-1</sup> no volume total. No frasco foi introduzida uma barra de agitação e um dispositivo de microextração revestido com o sorvente selecionado. A microextração foi promovida por meio de agitação com a barra magnética, durante um determinado período e velocidade, à temperatura ambiente. Procedeu-se à remoção do dispositivo de BA $\mu$ E do frasco, após terminar o período de extração, e à secagem dos mesmos em papel. Num *vial* com *insert* de vidro inseriu-se o dispositivo de microextração e adicionaram-se-lhe 100  $\mu$ L de solvente orgânico, de forma a proceder à retroextração dos analitos. O procedimento de retroextração foi efetuado por via de tratamento ultrassónico por tempo determinado. Adicionaram-se 100  $\mu$ L de água ultrapura de forma a obter uma concentração final teórica de 10 mg L<sup>-1</sup>. Posteriormente removeu-se o dispositivo de BA $\mu$ E e selou-se o *vial* com recurso ao encapsulador. Seguiu-se, por fim, o posicionamento dos *vials* no

amostrador automático para realizar a análise por HPLC-DAD. No esquema da Figura 2.1, encontra-se resumido este procedimento[70–72].



Figura 2.1 - Ilustração esquemática do procedimento experimental para otimização, incluindo as etapas de microextração, retroextração e análise instrumental.

Aquando da otimização do método estudaram-se diversos parâmetros como tempo de equilíbrio, velocidade de agitação, pH, força iônica e polaridade da matriz, solvente e tempo de dessorção. A otimização de eficiência foi realizada por método univariante, ou seja, todas as variáveis foram fixadas exceto uma, tendo sido estudado o comportamento do sistema relativamente a essa variável. Todos os ensaios de otimização foram realizados em triplicado. O cálculo das recuperações foi obtido por comparação das áreas de picos obtidos nos ensaios ( $A_i$ ), com as dos picos dos padrões de controlo ( $A_p$ ), conforme descrito na Equação 2.1.

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{A_i}{A_p} \times 100 \quad [2.1]$$

### 2.3.6. Validação do método

Para os estudos de validação do método realizaram-se ensaios em diferentes níveis de fortificação, recorrendo às condições experimentais otimizadas. A análise cromatográfica destes ensaios permitiu determinar os LOD e LOQ da metodologia, com recurso à razão S/N 3:1 e 10:1, respetivamente[75,76].

Prepararam-se oito soluções a partir de sucessivas diluições do padrão de 100 mg L<sup>-1</sup> (0,1; 0,4; 0,8; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 e 15,0 mg L<sup>-1</sup>), de forma a obter ensaios com a fortificação adequada nos 5 mL de água ultrapura (4,0; 17,2; 33,0; 100,0; 200,0; 300,0; 400,0 e 600 µg L<sup>-1</sup>). Salvo exceções devidamente indicadas, os ensaios foram realizados em triplicado. A construção de curvas de calibração de seis pontos, para cada um dos β-bloqueantes em estudo, permitiu o estudo

da linearidade do método, seguida de realização de teste  $F$  e dispersão de resíduos de forma complementar[75–77].

A determinação da exatidão e precisão, intra (repetibilidade) e interdia (intermédia), foi realizada selecionando três níveis distintos de fortificação, baixo ( $100,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ), médio ( $300,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e alto ( $600,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Para a precisão intradia realizaram-se ensaios em quintuplicado destas três concentrações no mesmo dia. No caso da precisão interdia, os ensaios foram realizados em quintuplicado em três dias consecutivos[75,77].

### 2.3.7. Aplicação a amostras reais

De forma a aplicar a metodologia otimizada e validada a amostras reais de urina, plasma, saliva e água de efluente de ETAR testaram-se diversas taxas de diluição destas. Para as amostras de urina e plasma, analisou-se, ainda, a reação do sistema a diferentes agentes (NaOH, MeOH e ACN) e variação de proporção dos mesmos[78–80].

A urina fortificada foi hidrolisada com recurso a NaOH (5:1, v/v), levada 30 s ao *vórtex* e seguidamente centrifugada a 4000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante obtido foi diluído em água ultrapura (1:1, v/v). O estudo do efeito de matriz foi realizado fortificando as amostras de urina de forma a obter concentrações de 20,0, 36,0, 60,0, 100,0, 200,0, 300,0 e 400,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , e traçando curvas de calibração de cinco pontos para cada  $\beta$ -bloqueante, após análise cromatográfica.

Por sua vez, o plasma fortificado foi hidrolisado com recurso a NaOH (4:1, v/v), agitado 30 s no *vórtex* e centrifugado a 4000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante obtido foi diluído em água ultrapura (1:4, v/v). Para estudar o efeito de matriz foram fortificadas as amostras de plasma de forma a obter concentrações de 60,0, 100,0, 140,0, 200,0, 300,0 e 400,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , e após a análise cromatográfica dos ensaios, traçaram-se curvas de calibração de cinco pontos para as moléculas em estudo.

Tanto as amostras de saliva como de água de ETAR fortificadas sofreram tratamento por centrifugação a 4000 rpm durante 10 minutos, seguindo-se a diluição do respetivo sobrenadante com água ultrapura (1:1, v/v). O estudo do efeito de matriz nestas amostras foi conseguido fortificando-as a 20,0, 36,0, 100,0, 200,0, 300,0 e 400,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , e obtendo curvas de calibração de cinco pontos para cada analito.

Note-se que se realizaram ensaios de controlo, sem fortificação, de forma a confirmar a ausência de sinal nos tempos de retenção associados a cada um dos  $\beta$ -bloqueantes estudados.

### 3. Resultados e discussão

No presente trabalho estudaram-se seis  $\beta$ -bloqueantes, nomeadamente, o ATN, fumarato de BIS, CAR, cloridrato de NEB, PIN e cloridrato de PRO, Figuras de 1.1 a 1.6, cujas propriedades físico-químicas se encontram descritas na Tabela 3.1[15,19,23,81–83]. As moléculas selecionadas para o trabalho são representativas desta classe de fármacos comercializada em Portugal.

Tabela 3.1 - Propriedades físico-químicas dos seis  $\beta$ -bloqueantes em estudo[15,19,23,81–83].

$\beta$ -bloqueante	Fórmula química	Massa molar (g mol <sup>-1</sup> )	pKa	log K <sub>o/w</sub>
ATN	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	266,3	9,54	0,16
Fumarato de BIS	(C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	767,0	9,67	2,20
CAR	C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	406,5	7,97	3,80
Cloridrato de NEB	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> F <sub>2</sub> NO <sub>4</sub> ·HCl	441,9	8,90	3,21
PIN	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	248,3	9,54	1,75
Cloridrato de PRO	C <sub>16</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>2</sub> ·HCl	295,8	9,67	2,58

De acordo com a informação exibida na Tabela 3.1, verifica-se que o fumarato de BIS apresenta uma massa molar superior aos restantes analitos, o que se deve à presença de duas moléculas de BIS no complexo, enquanto o ATN é o de menor massa molar. Este é um grupo de fármacos tendencialmente alcalino, com  $7,87 \leq pKa \leq 9,67$ , e com características polares, com os valores de log K<sub>o/w</sub> a variar entre 0,16 e 3,80 para o  $\beta$ -bloqueante mais polar (ATN) e o menos polar (CAR), respetivamente.

#### 3.1. Otimização de condições instrumentais

Começou por se estabelecer as condições instrumentais mais adequadas para análise dos seis compostos em estudo. Em contexto de aplicação de HPLC-DAD, a identificação de compostos é fundamentalmente realizada com base em parâmetros como o t<sub>R</sub> e os espectros de absorvância UV-vis. Com o intuito de obter esses dados de forma efetiva, analisaram-se padrões individuais dos seis  $\beta$ -bloqueantes. Nesta fase, testaram-se diversas variações de eluente, conjugando água acidificada com ácido acético ou fórmico, ACN e MeOH, tanto em modo isocrático como recorrendo a gradiente, até não se registar a eluição de picos distorcidos. Posteriormente, analisou-se o padrão com a mistura das seis moléculas de forma a corrigir todos os parâmetros instrumentais, para ajustar os t<sub>R</sub> e evitar tanto a coeluição de picos como tempos de análise prolongados. As condições experimentais utilizadas encontram-se na Tabela 3.2, tendo o comprimento de onda ( $\lambda$ ) para cada molécula sido selecionado com base nos espectros de absorvância na gama do UV-vis (Anexo I).

Tabela 3.2 - Condições instrumentais de HPLC-DAD otimizadas para análise dos seis  $\beta$ -bloqueantes estudados.

Condições instrumentais otimizadas	
Volume de injeção ( $\mu\text{L}$ )	20
Fluxo ( $\text{mL min}^{-1}$ )	0,6
Temperatura da coluna ( $^{\circ}\text{C}$ )	20
Composição da fase móvel	Eluente A: Água com 0,1% de ácido fórmico Eluente B: MeOH 0-0,5 min – 95% A 0,5-8 min – 95-20% A 8-12 min – 20% A 12-13 min – 20-95% A
$\lambda$ (nm)	230 (ATN, BIS e PRO)
	265 (PIN)
	285 (CAR e NEB)

Seguidamente pode observar-se na Figura 3.1, a título ilustrativo, um cromatograma da mistura dos seis  $\beta$ -bloqueantes obtido por HPLC-DAD.

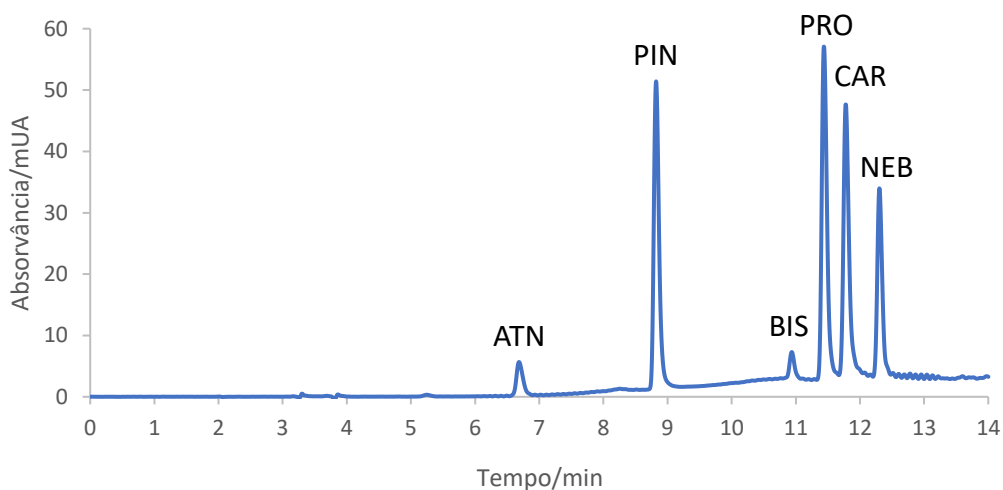


Figura 3.1 - Cromatograma obtido por HPLC-DAD relativo aos seis  $\beta$ -bloqueantes estudados em condições instrumentais otimizadas.

Obtiveram-se  $t_R$  compreendidos entre 6,7 e 12,3 minutos, que se encontram especificados para cada analito na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 - Tempos de retenção obtidos por HPLC-DAD para os seis  $\beta$ -bloqueantes em estudo, nas condições instrumentais otimizadas.

$\beta$ -bloqueante	$t_R$ (min)
ATN	6,7
PIN	8,8
BIS	10,9
PRO	11,4
CAR	11,8
NEB	12,3

### 3.1.1. Calibração instrumental

Os LOD e LOQ instrumentais foram determinados por injeção sucessiva de padrões de calibração diluídos, e calculados com base na razão S/N 3:1 e 10:1, respetivamente. Obtiveram-se valores de  $0,02 \text{ mg L}^{-1} \leq \text{LOD} \leq 0,20 \text{ mg L}^{-1}$  e de  $0,07 \text{ mg L}^{-1} \leq \text{LOQ} \leq 0,70 \text{ mg L}^{-1}$ .

A linearidade da gama dinâmica de trabalho a nível instrumental foi igualmente estudada, com base no método dos mínimos quadrados. As regressões lineares foram aplicadas num intervalo de concentrações compreendido entre  $0,07$  e  $15,00 \text{ mg L}^{-1}$ , incluindo seis níveis de concentração para cada molécula em estudo, tendo os ensaios sido realizados em triplicado. Verificou-se boa linearidade, considerando os valores de coeficiente de determinação ( $r^2$ )  $\geq 0,9961$ .

### 3.2. Seleção do material sorvente para BA $\mu$ E

Estabelecidas as condições instrumentais, seguiu-se para a seleção do material sorvente mais adequado à microextração dos compostos em estudo. Os ensaios desta etapa de otimização foram realizados em condições experimentais convencionais, ou seja,  $5 \text{ mL}$  de água ultrapura (pH entre 5 e 6) fortificada com  $200 \mu\text{L}$  da solução mistura de  $\beta$ -bloqueantes ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ), tempo de equilíbrio de  $16 \text{ h}$  ( $990 \text{ rpm}$ ) e retroextração com  $100 \mu\text{L}$  de MeOH,  $60 \text{ min}$  sob tratamento ultrassónico.

Inicialmente estudaram-se cinco AC comerciais, sendo estes materiais sólidos porosos, que retêm os solutos por meio de interações eletrostáticas e/ou dispersivas, e dependem do valor de pH no ponto de carga zero ( $\text{pH}_{\text{PZC}}$ ), das propriedades adsorptivas texturais, da área superficial e das dimensões dos poros. A carga predominante à superfície do AC depende do pH da solução em que este se insere, sendo positiva, se o pH for inferior ao  $\text{pH}_{\text{PZC}}$ , ou negativa, se o pH for superior ao  $\text{pH}_{\text{PZC}}$ [84]. Os resultados obtidos apresentam-se no gráfico da Figura 3.2.

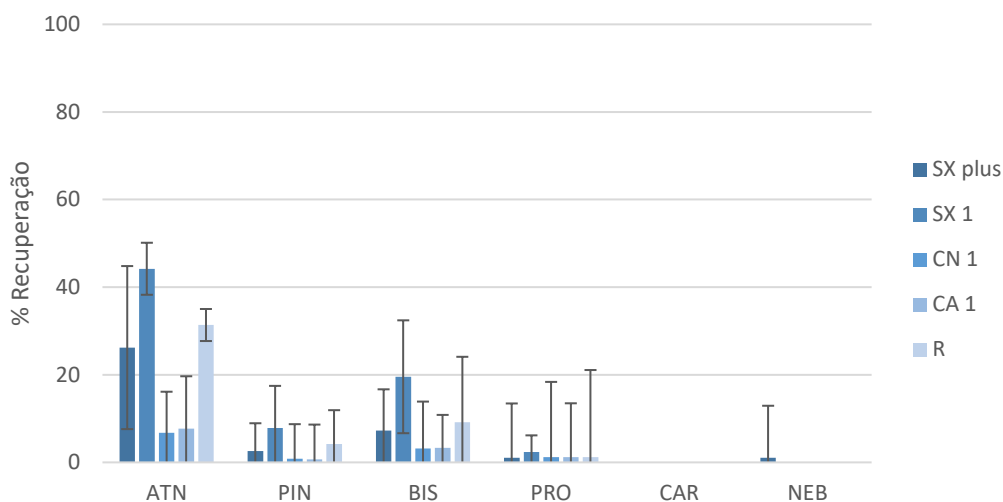


Figura 3.2 - Seletividade dos AC para a extração dos  $\beta$ -bloqueantes em estudo em água ultrapura, obtido por BA $\mu$ E- $\mu$ LD/HPLC-DAD. Ensaio realizado em triplicado. Condições dos ensaios: 5 mL de água ultrapura fortificada com 200  $\mu$ L da solução mistura de  $\beta$ -bloqueantes (10 mg L<sup>-1</sup>); microextração: 16 h (990 rpm); retroextração: 100  $\mu$ L MeOH, 60 min sob tratamento ultrassônico.

Observando o gráfico da Figura 3.2, verificam-se recuperações até 44,2%, sendo de uma forma geral inferiores a 20%. Esta tendência apenas não se verifica quando do uso de SX plus, SX 1 e R, a ATN. No caso de CAR e NEB, inclusive chega a não se verificar qualquer efeito extrativo. Esta ineficiência poderá prender-se com o facto de o pH da água ultrapura se situar entre 5 e 6, o que resultará, de forma geral, em AC carregados positivamente. Por sua vez, nessa gama de pH, os analitos também se encontram na sua forma catiónica, conforme se pode verificar nos gráficos de especiação em anexo (Anexo II). Assim, os resultados sugerem que as elevadas áreas superficiais poderão não ser suficientes para a obtenção de boas recuperações, dado que haverá um condicionamento causado pela predominância de repulsões eletrostáticas, ainda que se possa admitir a possibilidade de também ocorrer uma retroextração incompleta.

Em seguida, testou-se a aplicação de polímeros como fases sorventes. Este tipo de material pode reter compostos com base em interações do tipo fase reversa, como interações  $\pi$ - $\pi$  e hidrofóbicas, podendo também ocorrer interações dipolo-dipolo e iónicas, ou ligações de hidrogénio, de acordo com a dimensão da partícula e da área superficial. Sorventes do tipo silicone caracterizam-se por apresentar interações hidrofóbicas, em que predominam interações de van-der-Waals[84,85].

Para este efeito, selecionaram-se quinze polímeros, oito dos quais com propriedades de tipo fase reversa, e cujos resultados se podem observar nos gráficos da Figura 3.3.

Por análise dos gráficos da Figura 3.3, verificou-se a ocorrência de desempenhos superiores aos dos AC, com recuperações até 48,1% no conjunto de polímeros de fase reversa (a), e até 52,5% no conjunto dos restantes polímeros (b). Salienta-se, porém, o decréscimo considerável na recuperação de ATN em relação aos primeiros materiais sorventes. Assim como nos AC, não se registou uniformidade na capacidade de extração dos diferentes analitos, o que se poderá dever à heterogeneidade estrutural desta classe de fármacos. Acresce que nas situações em que se registaram melhores recuperações, como Strata X e Envi-Florisil, estas foram inferiores a 50%.

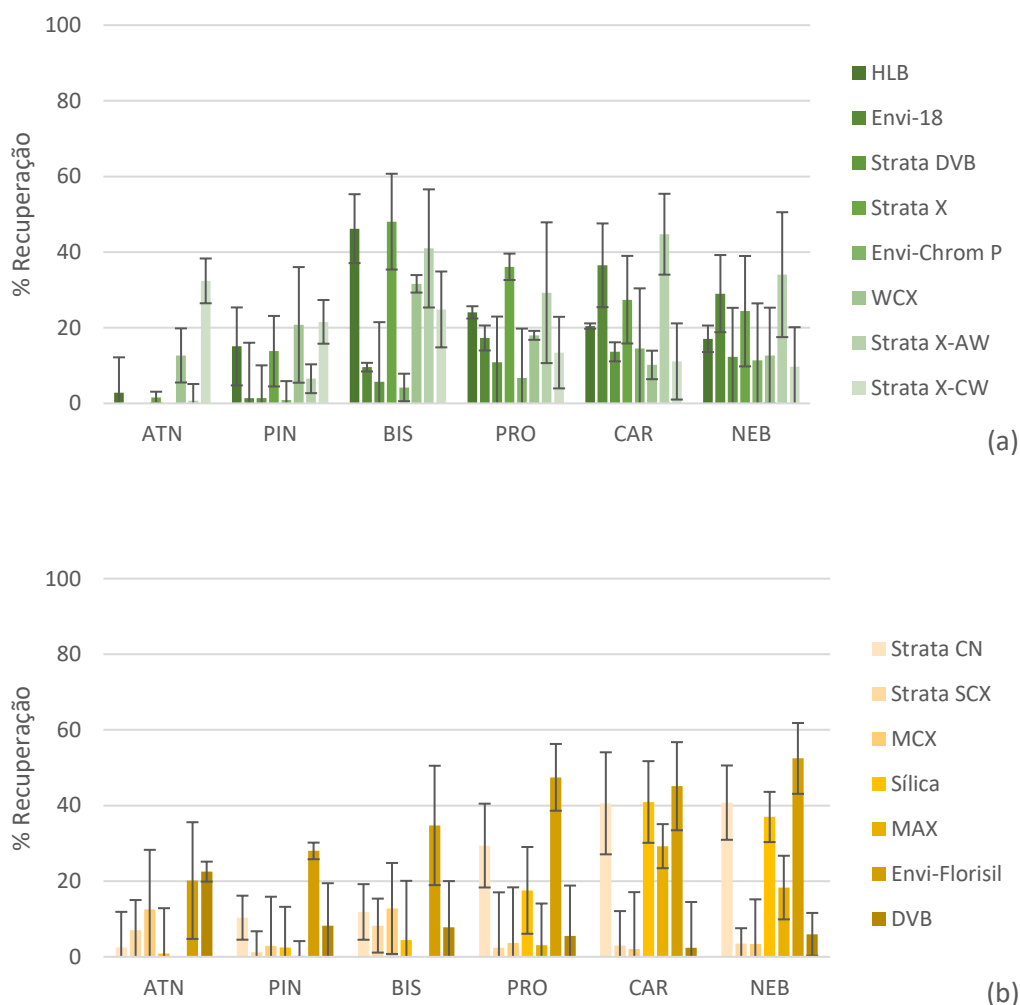


Figura 3.3 - Seletividade dos polímeros de fase reversa (a) e outros polímeros (b) para a extração dos  $\beta$ -bloqueantes em estudo em água ultrapura, obtido por BA $\mu$ E- $\mu$ LD/HPLC-DAD. Ensaio realizado em triplicado. Condições dos ensaios: 5 mL de água ultrapura fortificada com 200  $\mu$ L da solução mistura de  $\beta$ -bloqueantes (10 mg L<sup>-1</sup>); microextração: 16 h (990 rpm); retroextração: 100  $\mu$ L MeOH, 60 min sob tratamento ultrassônico.

Excluídas as opções até aqui testadas, considerou-se, então, a hipótese de preparar misturas de sorventes. Estes foram conjugados com base na complementaridade das suas recuperações, numa proporção de 1:1 (m/m), com a intenção de obter uma mistura que permitisse extrair de forma similar todos os seis  $\beta$ -bloqueantes. Os resultados registados encontram-se no gráfico da Figura 3.4.

Por leitura do gráfico da Figura 3.4, é observada uma melhoria da extração de ATN, PIN e BIS, porém os resultados não excedem os 34,8%. Contudo, a extração revelou-se particularmente ineficiente para PRO, CAR e NEB, em que a melhor recuperação, usando Envi-Florisil + WCX, não ultrapassou os 20%. Assim sendo, os resultados obtidos não foram os esperados, o que poderá dever-se à metodologia utilizada para preparar as misturas, que não tem em consideração uma proporção molecular, mas unicamente a proporção mássica.

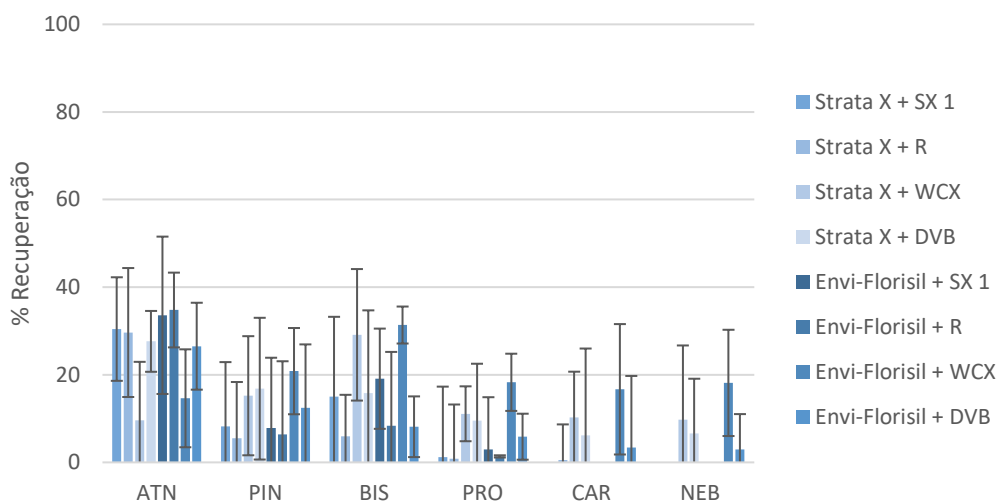


Figura 3.4 - Seletividade das misturas de sorventes para a extração dos  $\beta$ -bloqueantes em estudo em água ultrapura, obtido por BA $\mu$ E- $\mu$ LD/HPLC-DAD. Ensaio realizado em triplicado. Condições dos ensaios: 5 mL de água ultrapura fortificada com 200  $\mu$ L da solução mistura de  $\beta$ -bloqueantes ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ); microextração: 16 h (990 rpm); retroextração: 100  $\mu$ L MeOH, 60 min sob tratamento ultrassônico.

Posteriormente, optou-se por testar uma outra abordagem. Por análise dos gráficos de especiação (Anexo II), em que se simulou a variação de forma iônica das moléculas em função do pH da solução, determinou-se que a pH 11 todos os analitos estariam na forma neutra. Assim, mantiveram-se as condições experimentais convencionais previamente indicadas, ajustando apenas o pH da amostra para 11, com recurso a soluções de HCl e NaOH, 0,1 ou 1,0 M. Aplicou-se esta variação aos mesmos AC, resultando nas recuperações da Figura 3.5.

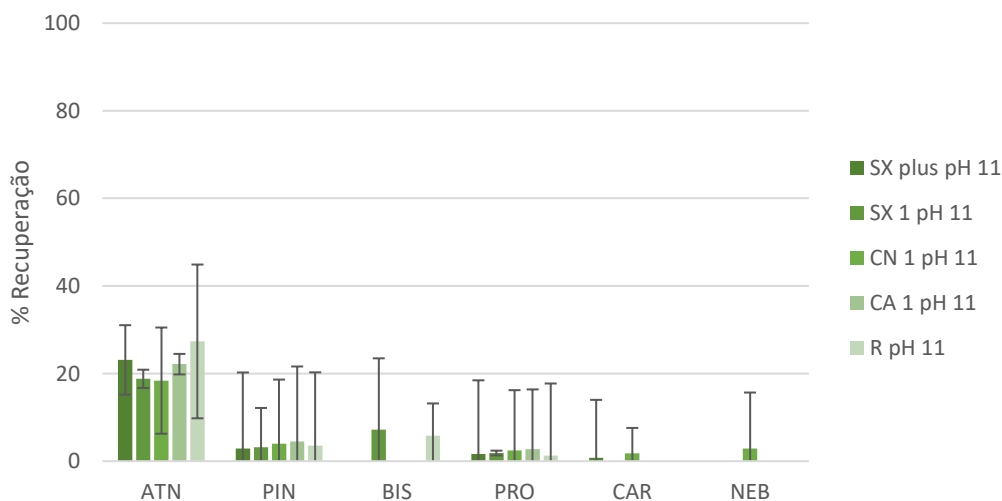


Figura 3.5 - Seletividade dos AC a pH 11 para a extração dos  $\beta$ -bloqueantes em estudo em água ultrapura, obtido por BA $\mu$ E- $\mu$ LD/HPLC-DAD. Ensaio realizado em triplicado. Condições dos ensaios: 5 mL de água ultrapura fortificada com 200  $\mu$ L da solução mistura de  $\beta$ -bloqueantes ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ); microextração: 16 h (990 rpm), pH 11; retroextração: 100  $\mu$ L MeOH, 60 min sob tratamento ultrassônico.

Os resultados de extração obtidos na Figura 3.5 revelaram-se insuficientes, decrescendo em relação aos resultados prévios dos AC. Não se registaram recuperações superiores a 10%, excetuando para o ATN que, ainda assim, não ultrapassou os 30% - máximo de 27,3% com R a

pH 11. Isto poderá dever-se uma vez mais à incompatibilidade das cargas moleculares ou retroextração incompleta. Recorde-se que os AC a  $\text{pH} > \text{pH}_{\text{PZC}}$  apresentam uma carga superficial maioritariamente negativa. Todavia, as moléculas também sofrem influência do meio alcalino, perdendo a disponibilidade de receber prótons, e passam da sua forma catiónica à forma neutra.

Continuou-se o estudo com os sorventes poliméricos em amostra a pH 11, cujos dados constam nos gráficos da Figura 3.6.

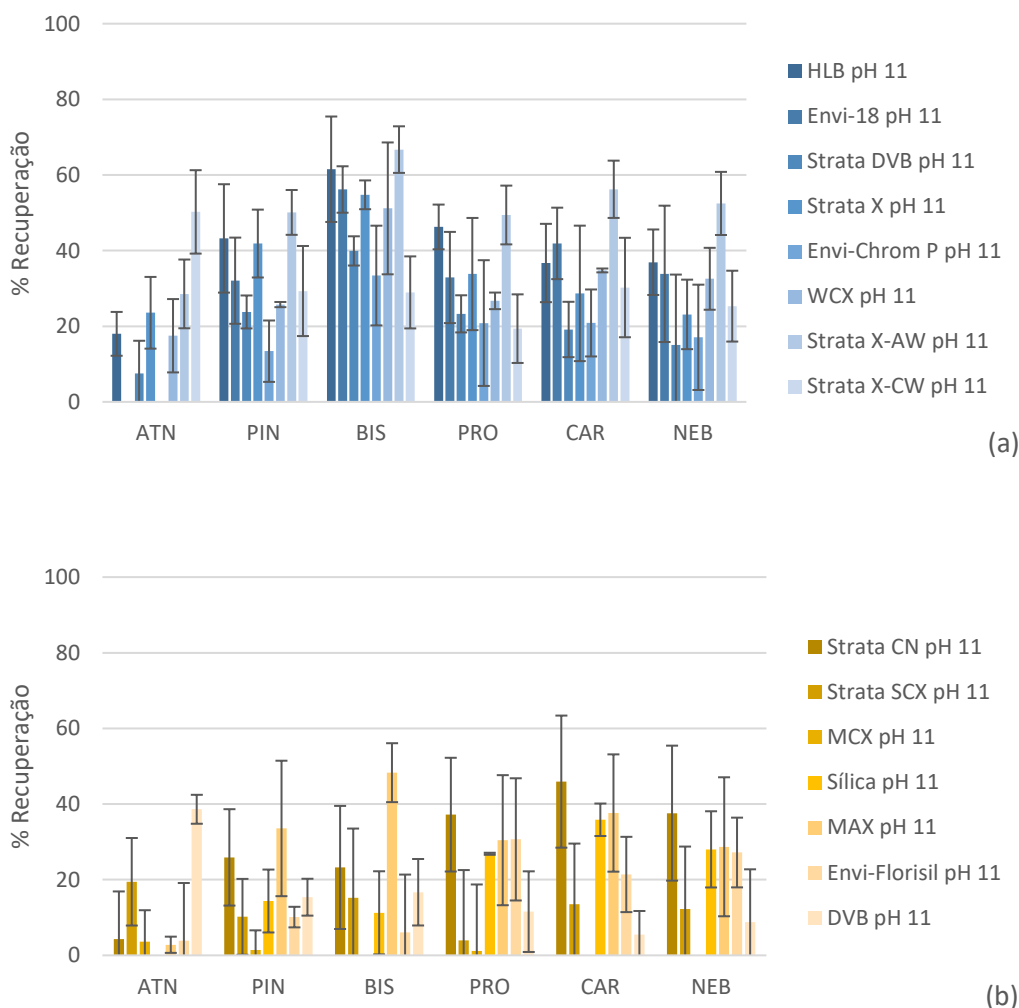


Figura 3.6 - Seletividade dos polímeros de fase reversa a pH 11 (a) e outros polímeros a pH 11 (b) para a extração dos  $\beta$ -bloqueantes em estudo em água ultrapura, obtido por BA $\mu$ E- $\mu$ LD/HPLC-DAD. Ensaio realizado em triplicado. Condições dos ensaios: 5 mL de água ultrapura fortificada com 200  $\mu$ L da solução mistura de  $\beta$ -bloqueantes ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ); microextração: 16 h (990 rpm), pH 11; retroextração: 100  $\mu$ L MeOH, 60 min sob tratamento ultrassónico.

Neste caso observou-se uma grande variação das capacidades de extração dos analitos, chegando até 66,7%, e um incremento significativo das recuperações, com ênfase no gráfico de sorventes de fase reversa, Figura 3.6 (a). Registaram-se, por fim, recuperações próximas aos 40% para o ATN a pH 11, com DVB (38,6%) e Strata X-CW (50,2%), porém estes materiais implicaram uma diminuição de resultados para os restantes  $\beta$ -bloqueantes, e não se consideraram adequados para a aplicação requerida. Por sua vez, o polímero Strata X-AW a pH 11 alcançou

recuperações consideradas adequadas para as seis moléculas em estudo, de 28,6 a 66,7%. Este resultado não seria o mais expectável, dado tratar-se de um sorvente indicado para aplicação em compostos mais de tipo ácido, cuja estrutura química se apresenta na Figura 3.7, e sendo os analitos deste trabalho classificados como bases fracas[42,86].

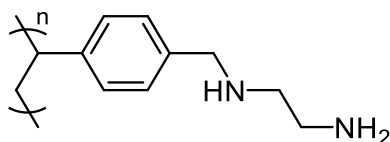


Figura 3.7 - Estrutura do polímero Strata X-AW.

Contudo, além de propriedades de permuta aniónica fraca, atribuídas à amina terminal, este polímero também permitirá a ocorrência de interações de fase reversa, na região do anel aromático, por intermédio de interações  $\pi$ - $\pi$ . Pode, então, inferir-se que, uma vez que a pH alcalino o polímero tende a encontrar-se neutro, tal como os  $\beta$ -bloqueantes em estudo a pH 11, é perdida a repulsão entre cargas verificada no gráfico sem ajuste de pH. Assim, as interações de fase reversa tornam-se predominantes, ocorrendo atração entre os anéis do sorvente e do analito.

Face aos dados obtidos, descartaram-se as restantes opções testadas, e prosseguiu-se para a otimização do processo de retroextração utilizando exclusivamente Strata X-AW como sorvente, a pH 11.

### 3.3. Processo de otimização

A otimização da metodologia engloba a avaliação da influência de diversos parâmetros experimentais nos processos de microextração e retroextração. Tal como já foi mencionado na parte experimental, os parâmetros em estudo incluem o tempo de equilíbrio e a velocidade de agitação, o pH, a polaridade e a força iónica da matriz, assim como o solvente e tempo de retroextração. Este estudo foi realizado seguindo uma estratégia de otimização univariável[71].

#### 3.3.1. Otimização da retroextração

A fase de retroextração teve por base o método de LD, recorrendo a tratamento por ultrassons, dado permitir acelerar a dessorção das moléculas. A seleção do solvente utilizado neste processo é essencial, tendo sido a primeira variável a otimizar. Além disso, também se avaliou o tempo de tratamento ultrassónico, pois, dependendo este parâmetro da cinética do sistema, pode influenciar a recuperação dos analitos.

##### 3.3.1.1. Efeito do solvente

Aquando do processo de retroextração, o dispositivo de BA $\mu$ E é imerso num solvente ou mistura de solventes, com o intuito de dessorver os analitos previamente extraídos da amostra. A

imersão completa do dispositivo é essencial, assim como a compatibilidade entre o solvente de retroextração e o sorvente que reveste o dispositivo. O solvente utilizado deve ter capacidade de remover todas as moléculas-alvo da fase sorvente. Comumente, a retroextração é realizada com recurso a MeOH, ACN e misturas de ambos, ainda que possam ser utilizados outros solventes, tais como misturas aquosas e soluções tampão[71].

Assim, estudou-se o efeito da utilização de MeOH, ACN e MeOH:ACN (1:1, v/v) como solvente de retroextração na metodologia em desenvolvimento. No gráfico da Figura 3.8 observam-se as recuperações obtidas.

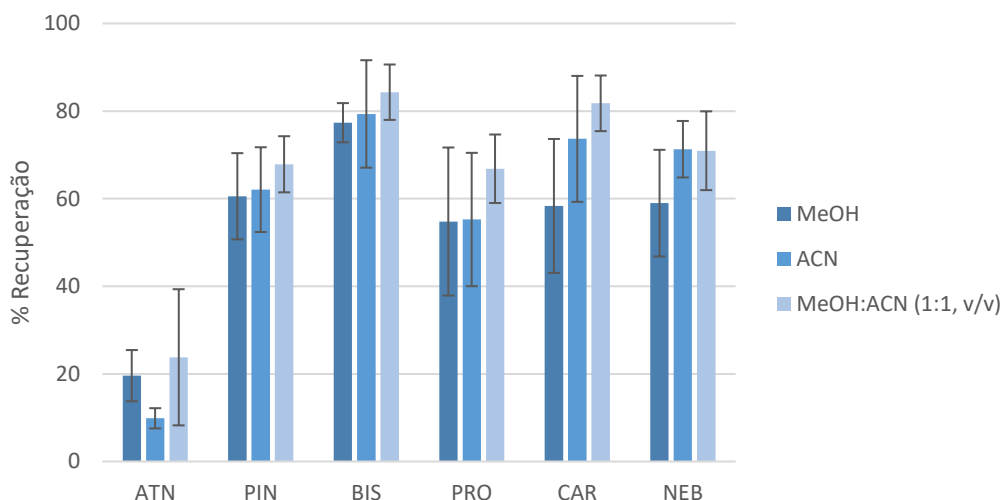


Figura 3.8 - Efeito do solvente para  $\mu$ LD na extração dos  $\beta$ -bloqueantes em estudo em água ultrapura, obtido por BA $\mu$ E(Strata X-AW)- $\mu$ LD/HPLC-DAD. Ensaios realizados em triplicado. Condições dos ensaios: 5 mL de água ultrapura fortificada com 200  $\mu$ L da solução mistura de  $\beta$ -bloqueantes (10 mg L<sup>-1</sup>); microextração: 16 h (990 rpm), pH 11; retroextração: 100  $\mu$ L solvente, 60 min sob tratamento ultrassônico.

Com base nos resultados de ATN, no gráfico da Figura 3.8, em que se obteve uma recuperação de apenas 9,9%, excluiu-se a opção de utilizar ACN. Por sua vez, MeOH e MeOH:ACN apresentam resultados similares para as três primeiras moléculas, porém, para as restantes o valor absoluto de recuperação com a mistura é superior, ainda que se verifique uma coincidência das barras de erro, em PRO e NEB.

Embora a utilização da mistura MeOH:ACN possa acrescentar um erro associado à sua preparação, comparativamente com a utilização de um solvente puro, tal não se verificou nos resultados, pelo que se optou por selecionar esta opção para a realização dos ensaios seguintes. As recuperações obtidas para as moléculas em estudo ficam compreendidas entre 23,8 e 84,3%.

### 3.3.1.2. Efeito do tempo de retroextração

O tratamento por ultrassons permite facilitar o processo de LD, pelo que é necessário otimizar o seu tempo de duração, por forma a maximizar as recuperações e tornar o processo o mais célere possível.

Para este efeito, foram estudados 15, 30, 45 e 60 minutos de tratamento ultrassônico. Os resultados obtidos constam no gráfico da Figura 3.9.

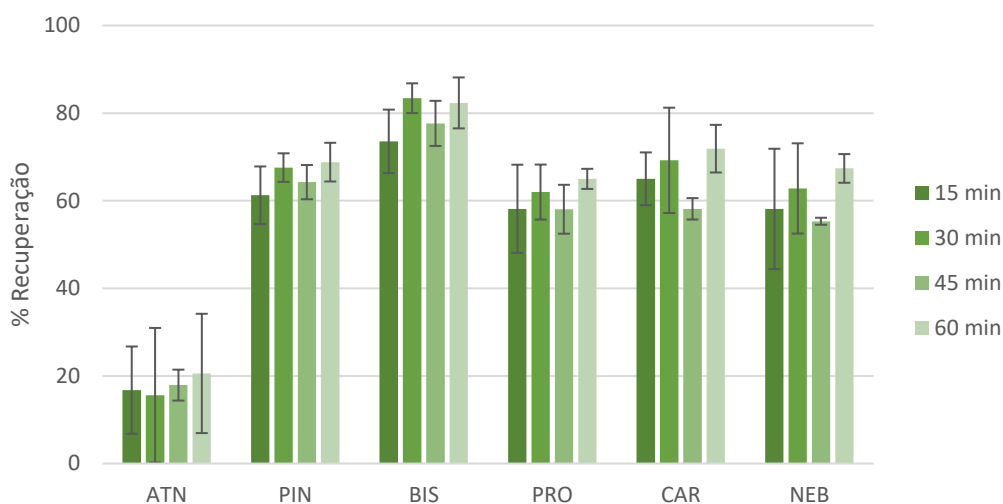


Figura 3.9 - Efeito do tempo de retroextração na extração dos  $\beta$ -bloqueantes em estudo em água ultrapura, obtido por BA $\mu$ E(Strata X-AW)- $\mu$ LD/HPLC-DAD. Ensaio realizado em triplicado. Condições dos ensaios: 5 mL de água ultrapura fortificada com 200  $\mu$ L da solução mistura de  $\beta$ -bloqueantes (10 mg L<sup>-1</sup>); microextração: 16 h (990 rpm), pH 11; retroextração: 100  $\mu$ L MeOH:ACN (1:1, v/v), sob tratamento ultrassônico.

Para todas as seis moléculas em estudo, no gráfico da Figura 3.9, registou-se uma proximidade entre as recuperações das quatro variações de tempo de retroextração, e as barras de erro a coincidir entre si. Verificou-se que, dada a variação de recuperação desprezável, os 15 minutos de tratamento ultrassônico seriam o tempo necessário para quebrar as interações ocorridas entre os analitos e o sorvente do dispositivo de microextração. Tais resultados indicam que este processo apresenta uma cinética rápida.

Assim, optou-se por prosseguir o trabalho com 15 minutos de tempo de retroextração, com recuperações acima dos 20%.

### 3.3.2. Otimização da microextração

O processo de microextração consiste na introdução do dispositivo de BA $\mu$ E numa matriz aquosa de forma a colocá-lo em contacto com os analitos. Assim, existem diversos parâmetros que podem influenciar a eficiência do procedimento, como a velocidade de agitação e o tempo de equilíbrio, que afetam a cinética do processo, mas também o pH, a polaridade e a força iónica, que afetam as propriedades quer dos analitos quer da matriz da amostra.

#### 3.3.2.1. Efeito do tempo de equilíbrio

O tempo de equilíbrio do processo extrativo é uma das variáveis mais importantes. Note-se que trabalhar em condições de equilíbrio permite alcançar a sensibilidade máxima e melhorar a precisão. No entanto, havendo a necessidade de tornar a análise o mais célere possível, estudar variações deste parâmetro permite encontrar um meio termo entre sensibilidade/precisão e tempo de análise.

No presente trabalho optou-se por estudar 1, 2, 3, 4 e 16 horas de extração. Os resultados encontram-se descritos no gráfico da Figura 3.10.

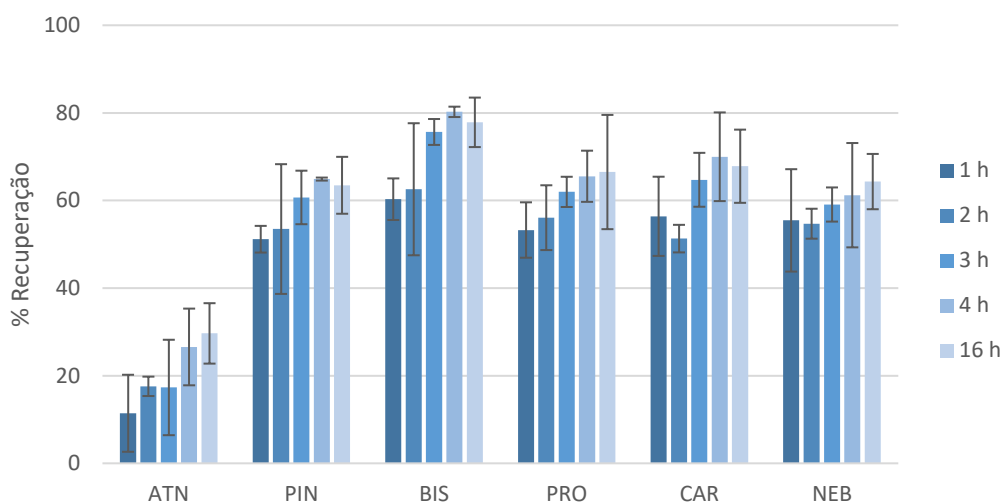


Figura 3.10 - Efeito do tempo de equilíbrio na extração dos  $\beta$ -bloqueantes em estudo em água ultrapura, obtido por BA $\mu$ E(Strata X-AW)- $\mu$ LD/HPLC-DAD. Ensaios realizados em triplicado. Condições dos ensaios: 5 mL de água ultrapura fortificada com 200  $\mu$ L da solução mistura de  $\beta$ -bloqueantes ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ); microextração: 990 rpm, pH 11; retroextração: 100  $\mu$ L MeOH:ACN (1:1, v/v), 15 min sob tratamento ultrassônico.

De uma forma geral, entre 1 e 4 horas de tempo de equilíbrio, observa-se o aumento gradual do valor da recuperação no gráfico da Figura 3.10. Contudo, entre as 4 e 16 horas de extração, verifica-se uma estabilização das recuperações, ainda que se quadruplique o tempo de equilíbrio.

Assim, com o intuito de minimizar o tempo de análise mantendo uma recuperação adequada, optou-se por utilizar 4 horas como tempo de equilíbrio otimizado. As recuperações obtidas situaram-se acima dos 30%.

### 3.3.2.2. Efeito da velocidade de agitação

A avaliação da velocidade de agitação é também um ponto crucial na cinética do processo. Isto resulta do facto de uma velocidade abaixo do ideal poder originar uma menor capacidade de extração, enquanto uma velocidade excessivamente elevada poderá causar danos na fase sorvente, pelo aumento do contacto entre o dispositivo de microextração e o frasco da amostra, levando a uma perda de rendimento.

Neste sentido, testaram-se velocidades de agitação compreendidas entre 750 e 990 rpm. Os resultados obtidos constam no gráfico da Figura 3.11.

Por análise da Figura 3.11, a máxima variação de recuperação registada entre as duas velocidades de agitação testadas foi de 5%, para o CAR. Os registos levam a concluir que nesta situação a menor velocidade de agitação estudada não afeta a eficiência do processo, e que as 990 rpm não configuram uma velocidade elevada a ponto de danificar a fase sorvente.

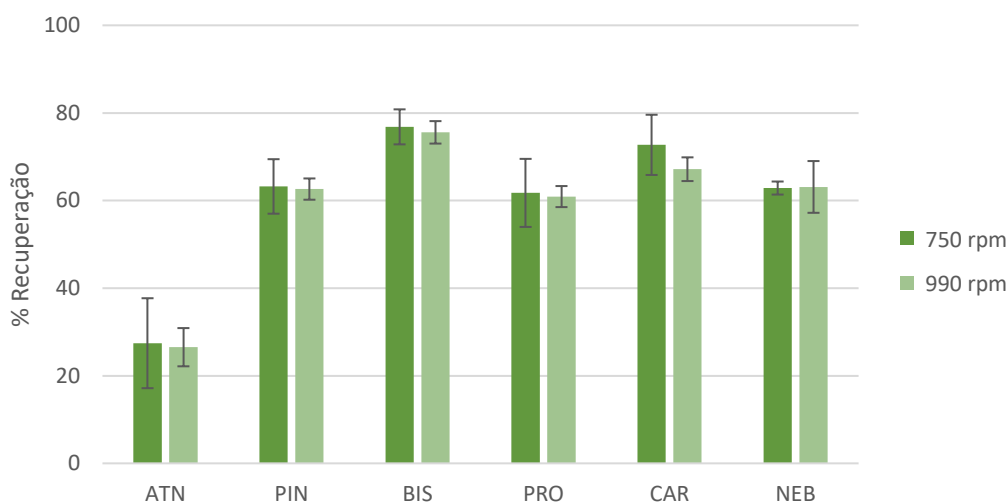


Figura 3.11 - Efeito da velocidade de agitação na extração dos  $\beta$ -bloqueantes em estudo em água ultrapura, obtido por BA $\mu$ E(Strata X-AW)- $\mu$ LD/HPLC-DAD. Ensaios realizados em triplicado. Condições dos ensaios: 5 mL de água ultrapura fortificada com 200  $\mu$ L da solução mistura de  $\beta$ -bloqueantes ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ); microextração: 4 h, pH 11; retroextração: 100  $\mu$ L MeOH:ACN (1:1, v/v), 15 min sob tratamento ultrassônico.

Optou-se, assim, por avançar no processo de otimização mantendo a velocidade de agitação nas 990 rpm, cujos resultados apresentam um menor erro associado. Neste ponto, registam-se recuperações mínimas próximas dos 30%.

### 3.3.2.3. Efeito do pH

O ajuste do pH da amostra influencia tanto a carga superficial do material sorvente como a carga do analito, que poderá encontrar-se neutro ou ionizado. Isto afeta o equilíbrio da retenção entre analito e sorvente, e, conseqüentemente, a eficiência da extração. Uma vez que o sorvente selecionado para produzir os dispositivos de microextração (Strata X-AW) é do tipo troca-iônica, o processo é favorecido quando as cargas do sorvente e dos compostos são complementares, embora a presença de um anel na sua estrutura também lhe confira propriedades de extração por fase reversa. Recorde-se que aquando da seleção da fase sorvente foi necessário ajustar a solução para pH 11.

Foram testados sete valores de pH (2, 4, 6, 8, 10, 11 e 12). Os valores mais ácidos foram estudados de modo a confirmar que não seriam a condição mais favorável neste contexto. O pH 8 considerou-se por ser um valor intermédio e imediatamente anterior ao  $pK_a$  da maioria dos compostos. Por último, testaram-se os valores de pH alcalinos, de forma a obter a melhor recuperação dos analitos, com base nos gráficos de especiação (Anexo II). No gráfico da Figura 3.12, constam os resultados obtidos.

Os registos apresentados no gráfico da Figura 3.12 coincidem com o que seria expectável no contexto estudado. Observa-se que a pH inferior a 10 a microextração de moléculas como o ATN e PIN é inviável. Já para BIS e PRO, o aumento gradual de pH gera um aumento da eficiência. Note-se que até pH 8 tanto o material sorvente como os analitos se encontram carregados positivamente, o que gera repulsão entre si. A pH superior, verificam-se interações de fase reversa, o que resulta numa extração mais eficiente. No caso das moléculas com menor  $pK_a$ ,

CAR e NEB, ainda que se observe um comportamento distinto das demais, também o pH mais alcalino alcança o resultado mais favorável. Devido às suas estruturas moleculares com maior número de anéis aromáticos, estes dois últimos  $\beta$ -bloqueantes não sofrem grande influência da carga iônica, predominando a interação de tipo fase reversa durante a extração.

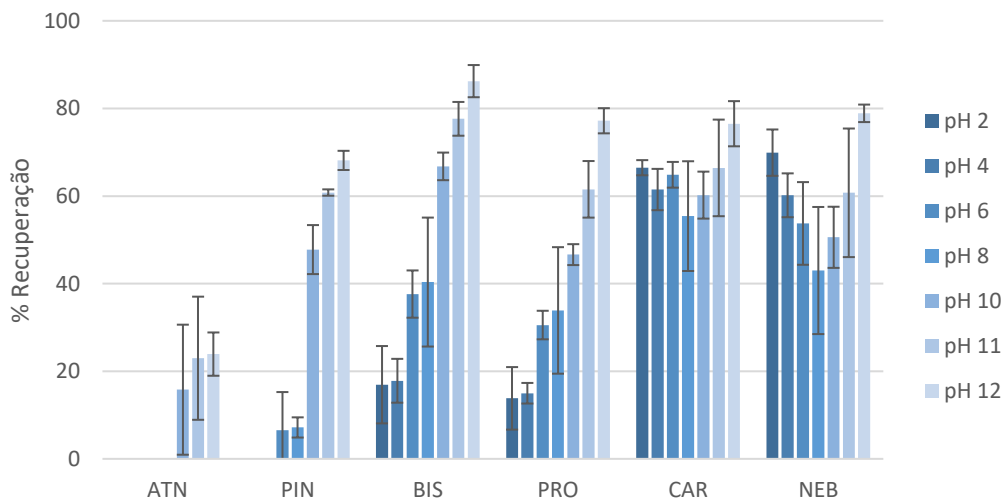


Figura 3.12 - Efeito do pH da matriz na extração dos  $\beta$ -bloqueantes em estudo em água ultrapura, obtido por BA $\mu$ E(Strata X-AW)- $\mu$ LD/HPLC-DAD. Ensaios realizados em triplicado. Condições dos ensaios: 5 mL de água ultrapura fortificada com 200  $\mu$ L da solução mistura de  $\beta$ -bloqueantes (10 mg L<sup>-1</sup>); microextração: 4 h (990 rpm); retroextração: 100  $\mu$ L MeOH:ACN (1:1, v/v), 15 min sob tratamento ultrassônico.

Com base nos resultados obtidos, selecionou-se pH 12 para prosseguir o processo de otimização do método. As recuperações mínimas registadas situam-se entre os 20 e 30%.

#### 3.3.2.4. Efeito do modificador orgânico

Neste estudo selecionou-se o MeOH como modificador orgânico, sendo a sua função minimizar o denominado *wall-effect*, ou seja, a possível adsorção de compostos às paredes de vidro do frasco de extração. Em particular, compostos mais hidrofóbicos tendem a ficar retidos na superfície do vidro de forma irreversível, levando à perda de analito e diminuição da taxa de recuperação. A presença de MeOH na amostra consegue diminuir este efeito, aumentando a solubilidade do analito. No entanto, um aumento excessivo da solubilidade dos analitos na fase aquosa poderá minimizar a eficiência do processo, o que exige cautela na variação deste parâmetro[87].

Procedeu-se à avaliação do efeito da presença de 0, 5, 10, 15 e 20% de MeOH na amostra. Na Figura 3.13 apresenta-se o gráfico com os resultados obtidos.

Verificou-se que os resultados no gráfico da Figura 3.13 coincidem com as características dos  $\beta$ -bloqueantes em estudo, cujos log  $K_{O/W}$  indicam uma hidrofobicidade pouco acentuada. A ausência de MeOH resultou em melhores recuperações para ATN e PIN, cujos valores de log  $K_{O/W}$  são mais reduzidos e conseqüentemente serão menos hidrofóbicos, embora no caso do BIS e PRO, com log  $K_{O/W}$  intermédios a modificação desta variável não apresente efeitos notórios. Devido aos

$\log K_{OW}$  mais elevados, em comparação com as restantes moléculas, CAR e NEB apresentam um aumento da recuperação associado à maior percentagem de MeOH.

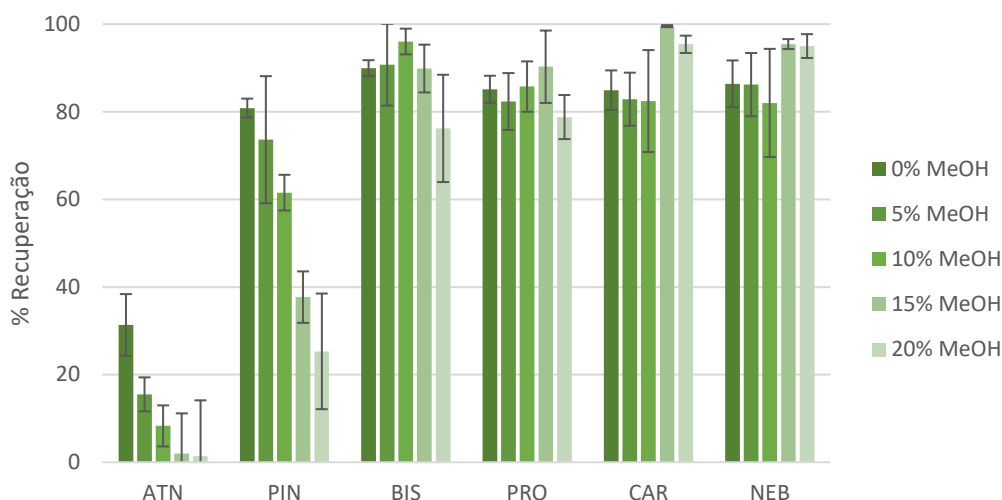


Figura 3.13 - Efeito do modificador orgânico na extração dos β-bloqueantes em estudo em água ultrapura, obtido por BAμE(Strata X-AW)-μLD/HPLC-DAD. Ensaios realizados em triplicado. Condições dos ensaios: 5 mL de água ultrapura fortificada com 200 μL da solução mistura de β-bloqueantes (10 mg L<sup>-1</sup>); microextração: 4 h (990 rpm), pH 12; retroextração: 100 μL MeOH:ACN (1:1, v/v), 15 min sob tratamento ultrassônico.

Considerando os dados do gráfico, optou-se por prosseguir no processo de otimização sem adição de modificador orgânico, uma vez que se verificou ser especialmente favorável para o ATN, cuja recuperação é inferior aos restantes analitos de uma forma geral. As recuperações obtidas encontram-se compreendidas entre 31,4 e 89,9%

### 3.3.2.5. Efeito da força iónica

Finalizou-se a otimização da microextração com a avaliação de outro modificador de matriz muito estudado, a adição de um sal inorgânico. Para tal, selecionou-se NaCl, cuja função é modificar a força iónica da solução, causando efeito de *salting-out*. Isto é, em solução ocorre a dissociação do sal em catiões (Na<sup>+</sup>) e aniões (Cl<sup>-</sup>) que interagem mais fortemente com a amostra aquosa que as moléculas-alvo. Este processo facilita a migração dos analitos, da fase aquosa para o material sorvente, particularmente os mais polares. Ainda assim, é necessário alcançar um ponto de equilíbrio, uma vez que a adição de sal também poderá gerar um aumento de viscosidade, que reduz a cinética de extração, ou a obstrução da área superficial da fase sorvente pelos iões dissociados, diminuindo a disponibilidade de interação com os analitos[88].

Testaram-se percentagens de modificador de força iónica da matriz de 0, 5, 10, 15 e 20%. O gráfico da Figura 3.14 representa os resultados obtidos.

Assim, interpretando o gráfico da Figura 3.14, verificou-se que para os β-bloqueantes menos polares ocorre um aumento da percentagem de recuperação associado à presença de NaCl pouco acentuado. Por sua vez, o ATN, com o menor  $\log K_{OW}$  no grupo molecular em estudo, apresenta uma variação notável na eficiência de microextração, com um aumento de mais de 40 pontos percentuais para teores de NaCl compreendidos entre 0 e 20%.

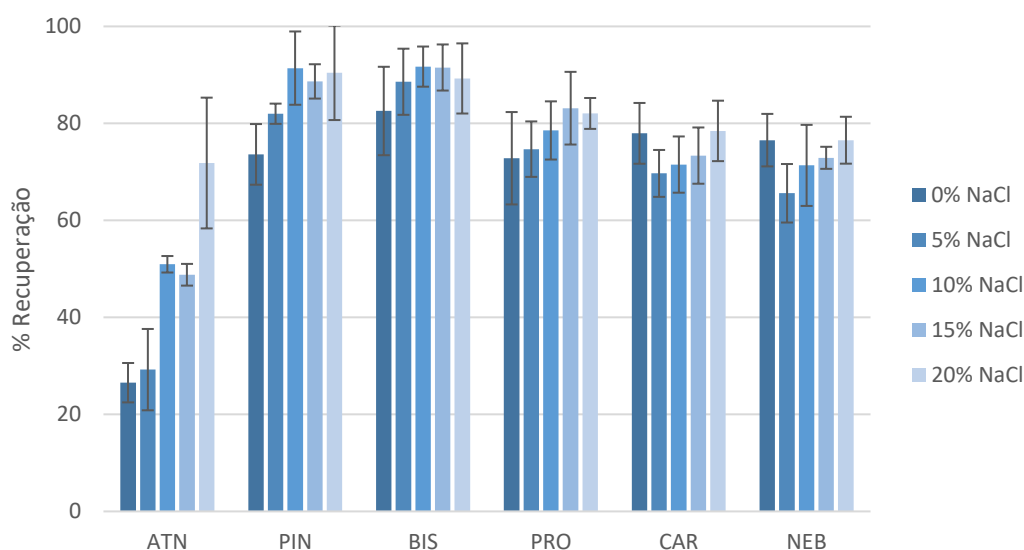


Figura 3.14 - Efeito da força iônica na extração dos  $\beta$ -bloqueantes em estudo em água ultrapura, obtido por BA $\mu$ E(Strata X-AW)- $\mu$ LD/HPLC-DAD. Ensaios realizados em triplicado. Condições dos ensaios: 5 mL de água ultrapura fortificada com 200  $\mu$ L da solução mistura de  $\beta$ -bloqueantes (10 mg L<sup>-1</sup>); microextração: 4 h (990 rpm), pH 12; retroextração: 100  $\mu$ L MeOH:ACN (1:1, v/v), 15 min sob tratamento ultrassônico.

Assim, concluiu-se que a melhor opção seria adicionar 20% de NaCl à amostra. As recuperações obtidas para os seis analitos situaram-se acima dos 70% de recuperação.

### 3.4. Condições experimentais otimizadas

Por motivos alheios ao presente estudo, após a conclusão do processo de otimização da metodologia foi impossível prosseguir doravante com ATN, pelo que se tornou necessário retificar as condições experimentais. Considerando os gráficos obtidos nos diversos parâmetros para os restantes cinco  $\beta$ -bloqueantes, apenas se considerou indispensável corrigir a força iônica da matriz, ou seja, optou-se pela remoção de qualquer percentagem de NaCl. Os ensaios foram repetidos para as novas condições selecionadas, com o intuito de garantir que os resultados se mantinham inalterados para as moléculas que prosseguiram em estudo. Na Figura 3.15 apresenta-se um cromatograma representativo da extração destes cinco analitos.

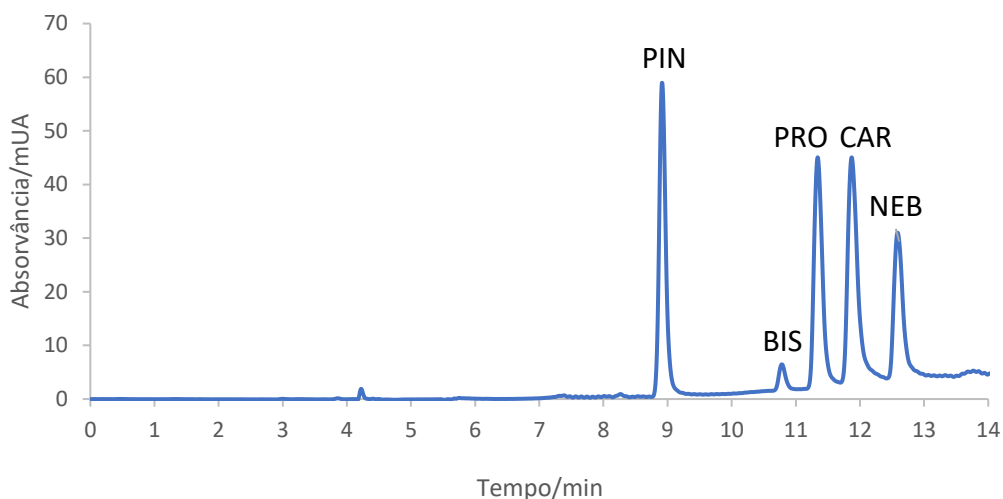


Figura 3.15 - Cromatograma obtido por HPLC-DAD relativo aos cinco  $\beta$ -bloqueantes estudados em condições experimentais otimizadas.

No gráfico da Figura 3.16 observa-se que a eficiência do método se mantém inalterada mesmo após a exclusão do ATN.

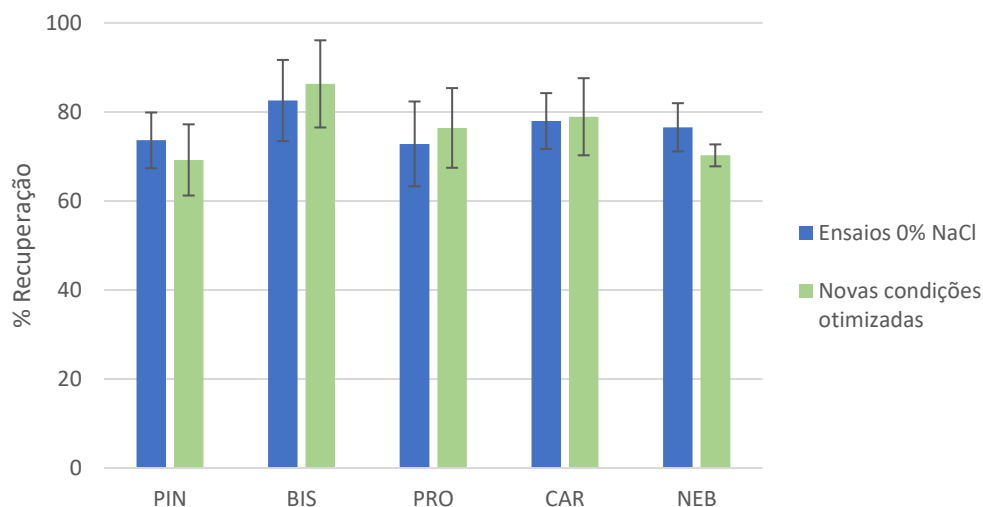


Figura 3.16 - Eficiência de extração dos  $\beta$ -bloqueantes em estudo em água ultrapura sob novas condições experimentais otimizadas, obtido por BA $\mu$ E(Strata X-AW)- $\mu$ LD/HPLC-DAD. Condições dos ensaios: 5 mL de água ultrapura fortificada com 200  $\mu$ L da solução mistura de  $\beta$ -bloqueantes (10 mg L<sup>-1</sup>); microextração: 4 h (990 rpm), pH 12; retroextração: 100  $\mu$ L MeOH:ACN (1:1, v/v), 15 min sob tratamento ultrassônico.

Na Tabela 3.4 apresentam-se as condições otimizadas definitivas, para o método desenvolvido para os cinco  $\beta$ -bloqueantes.

Tabela 3.4 - Condições experimentais otimizadas para a metodologia desenvolvida.

<b>Condições experimentais otimizadas</b>	
Sorvente	Strata X-AW
pH da matriz	12,0
MeOH (%)	0
NaCl (%)	0
Tempo de equilíbrio (h)	4
Velocidade de agitação (rpm)	990
Tempo de retroextração (min)	15
Solvente de retroextração	MeOH:ACN (1:1, v/v)

A otimização dos parâmetros experimentais estudados permitiu alcançar recuperações médias, em água ultrapura, compreendidas entre 71,4 e 84,4% (RSD  $\leq$  9,7%), conforme se pode observar na Tabela 3.5.

Tabela 3.5 - Recuperações médias dos cinco  $\beta$ -bloqueantes estudados em condições experimentais otimizadas da metodologia desenvolvida.

<b><math>\beta</math>-bloqueantes</b>	<b>Recuperação (%) <math>\pm</math> RSD (%) (n=6)</b>
PIN	71,4 $\pm$ 7,8
BIS	84,4 $\pm$ 9,7
PRO	74,6 $\pm$ 9,5
CAR	78,5 $\pm$ 7,8
NEB	72,8 $\pm$ 5,9

### 3.5. Validação do método

Determinadas as condições experimentais ideais, procedeu-se à validação da metodologia, englobando o estudo dos limiares analíticos, gama de linearidade, precisão e exatidão. Com esse propósito, realizaram-se ensaios em meio aquoso, sob as condições otimizadas, recorrendo a padrões mistura de  $\beta$ -bloqueantes com concentrações adequadas ao estudo destes parâmetros.

#### 3.5.1. Limiares analíticos e linearidade

A sensibilidade do método proposto foi determinada através dos limiares analíticos, mais concretamente LOD e LOQ, sendo estes avaliados pela razão S/N 3:1 e 10:1, respetivamente. Os limiares analíticos obtidos são apresentados na Tabela 3.6.

Tabela 3.6 - Valores de LOD e LOQ obtidos aquando da validação da metodologia desenvolvida.

<b><math>\beta</math>-bloqueante</b>	<b>LOD (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	<b>LOQ (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>
<b>PIN</b>	1,2	4,0
<b>BIS</b>	5,2	17,2
<b>PRO</b>	5,2	17,2
<b>CAR</b>	10,0	33,0
<b>NEB</b>	10,0	33,0

Verifica-se, assim, que a metodologia BA $\mu$ E(Strata X-AW)- $\mu$ LD/HPLC-DAD apresenta  $1,2 \mu\text{g L}^{-1} < \text{LOD} < 10,0 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g L}^{-1} < \text{LOQ} < 33,0 \mu\text{g L}^{-1}$ . Comparando os dados obtidos com as gamas de concentração apresentadas no Capítulo 1.6., constata-se que a metodologia será adequada para a análise de  $\beta$ -bloqueantes em matrizes aquosas biológicas (ppb), mas também ambientais, embora a gama entre ppb e ppt leve à necessidade de uma maior sensibilidade não alcançada neste estudo.

A fim de avaliar a linearidade do método, procedeu-se à construção de curvas de calibração para as cinco moléculas-alvo (Anexo III). Utilizaram-se padrões de 0,1 a 15,0 mg L<sup>-1</sup>, de modo a obter amostras fortificadas a 4,0, 17,2, 33,0, 100,0, 200,0 300,0, 400,0 e 600,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Este estudo foi realizado por meio de regressões lineares com método de mínimos quadrados. As curvas de calibração obtidas, incluídas no anexo, permitiram obter parâmetros como o declive (*a*), a interseção do eixo das ordenada (*b*) e o *r*<sup>2</sup> para cada  $\beta$ -bloqueante, como é apresentado na Tabela 3.7.

Tabela 3.7 - Parâmetros de regressão relativos às gamas lineares de trabalho obtidas para a metodologia desenvolvida.

<b><math>\beta</math>-bloqueante</b>	<b>Gama linear (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	<b><i>a</i></b>	<b><i>b</i></b>	<b><i>r</i><sup>2</sup></b>
<b>PIN</b>	4,0 – 600,0	1,6227	12,814	0,9987
<b>BIS</b>	17,2 – 600,0	1,2910	5,7098	0,9994
<b>PRO</b>		4,4620	29,121	0,9979
<b>CAR</b>	33,0 – 600,0	0,6164	-4,0560	0,9996
<b>NEB</b>		0,2896	-1,8139	0,9974

Os resultados foram obtidos com seis níveis de fortificação para todas as moléculas-alvo, porém, utilizaram-se valores distintos, dependendo da sensibilidade para cada analito. Registaram-se, assim, gamas lineares de 4,0 a 600,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  para PIN, de 17,2 a 600,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  para BIS e PRO, e de 33,0 a 600,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  para CAR e NEB. Adicionalmente, registaram-se coeficientes de determinação muito satisfatórios,  $r^2 \geq 0,9974$ , uma vez que, por definição, quanto mais próximo este parâmetro se encontrar da unidade, maior será a linearidade associada.

Ainda assim, a utilização exclusiva de *r*<sup>2</sup> para determinar a linearidade das regressões obtidas é considerada insuficiente. Complementou-se o estudo de linearidade recorrendo ao teste *lack-of-fit* (teste *F*), que permite avaliar a uniformidade na distribuição de dados

(homocedasticidade). O teste  $F$  consiste na comparação do valor  $F$  tabelado ( $F_{tab}$ ) e do valor  $F$  experimental ( $F_{exp}$ ), verificando-se uniformidade na distribuição dos dados quando  $F_{tab} > F_{exp}$ [89].

O valor de  $F_{tab}$  obtém-se por intermédio de uma tabela de distribuição  $F$ , dependendo do nível de confiança e dos graus de liberdade de distribuição em causa, ou, alternativamente, pode recorrer-se ao *software* Microsoft Excel. O valor de  $F_{exp}$  é calculado através da Equação 3.1, em que  $s_1^2$  e  $s_2^2$  representam a variância à menor e maior concentração da gama de trabalho, respetivamente.

$$F_{exp} = \frac{s_2^2}{s_1^2} \quad [3.1]$$

Com o intuito de determinar  $F_{tab}$ , e considerando um nível de confiança de 99%, recorreu-se à função INV.F.DIR(0.01;GdL\_1;GdL\_2), sendo GdL\_1 dado por  $n - 2$ , em que  $n$  é o número de concentrações estudadas, e GdL\_2 dado por  $n \times (p - 1)$ , sendo  $p$  o número de replicados. Neste trabalho,  $n = 6$  e  $p = 3$ . Os valores de  $F$  experimentais e tabelados são comparados na Tabela 3.8.

Tabela 3.8 - Valores de  $F$  experimental e  $F$  tabelado para os cinco  $\beta$ -bloqueantes em estudo.

$\beta$ -bloqueante	$F_{exp}$	$F_{tab}$
PIN	1,89	5,41
BIS	1,44	
PRO	5,36	
CAR	2,90	
NEB	1,19	

Com base na leitura da Tabela 3.8, constata-se que em todos os casos é cumprido o critério de homocedasticidade,  $F_{tab} > F_{exp}$ , pelo que se verifica uma distribuição uniforme dos dados.

Simultaneamente, estudou-se a homocedasticidade do método através da dispersão de resíduos, cujos gráficos se encontram em anexo (Anexo IV). Os resíduos foram obtidos com base na relação entre os valores de concentração teórico e expectável (calculado pela equação da curva de calibração para cada  $\beta$ -bloqueante). Através destes gráficos, verificou-se uma distribuição aleatória dos resíduos, não sendo observada qualquer tendência. Assim, as regressões lineares obtidas para as cinco moléculas são consideradas adequadas aos dados obtidos[89].

### 3.5.2. Exatidão e precisão

Conforme indicado na parte experimental, a determinação da exatidão e precisão foi realizada intra ( $n=5$ ) e interdia ( $n=10$ ), para três níveis de fortificação de 100,0, 300,0 e 600,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ . O critério de aceitação para a exatidão e precisão foi de que os valores residuais relativos e os RSD deveriam ser  $\leq 15\%$ , conforme indicado na literatura[75,77]. Os resultados obtidos constam na Tabela 3.9.

Tabela 3.9 - Valores de exatidão e precisão obtidos para os diferentes níveis de fortificação selecionados (alto: 600,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; médio: 300,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; baixo: 100,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), tanto para o estudo intra como para o interdia.

$\beta$ -bloqueante	Nível de fortificação ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Intradia		Interdia	
		Exatidão (%)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Precisão (%)
PIN	600,0	-1,7	11,5	-2,1	0,3
	300,0	2,8	9,7	2,1	0,5
	100,0	0,6	6,1	-1,5	1,4
BIS	600,0	0,3	7,1	-0,4	0,4
	300,0	2,2	2,0	0,5	0,7
	100,0	-0,3	5,6	-1,3	0,6
PRO	600,0	-0,1	9,4	-0,8	2,1
	300,0	5,5	5,0	2,1	0,8
	100,0	-4,0	9,4	-4,7	0,2
CAR	600,0	-0,8	14,0	-0,9	2,2
	300,0	1,1	6,8	-2,6	6,1
	100,0	1,2	9,0	-2,5	6,7
NEB	600,0	-1,7	10,8	-1,9	1,9
	300,0	5,1	5,2	0,9	6,3
	100,0	-10,3	13,8	-11,1	4,4

### 3.6. Aplicação a matrizes reais

Tendo por base os contextos em que a monitorização de  $\beta$ -bloqueantes é crucial, optou-se por aplicar a metodologia desenvolvida, otimizada e validada, a amostras aquosas biológicas e ambientais. Conforme descrito na parte experimental, recorreu-se a matrizes de urina, plasma, saliva e uma água residual de ETAR.

Atendendo ao facto de amostras biológicas como a urina e o plasma terem tendência para apresentar os fármacos já metabolizados pelo organismo, nomeadamente complexados ou ligados a proteínas, considerou-se essencial o tratamento prévio das mesmas, de modo a garantir que os  $\beta$ -bloqueantes em estudo estariam na sua forma livre. Para esse efeito selecionaram-se três agentes, NaOH, MeOH e ACN, que foram adicionados às amostras em diferentes proporções, com a intenção de selecionar o mais adequado a este estudo. Adicionalmente, considerando a complexidade de amostras reais, tanto biológicas como ambientais, que podem interferir com os resultados do sistema cromatográfico, avaliou-se o efeito da proporção de diluição em água ultrapura para as quatro amostras. Para a matriz de urina determinou-se que o ideal seria a hidrólise básica, adicionando 1 volume de NaOH a 5 volumes de urina, seguindo-se uma diluição

1:1 (v/v). Quanto à matriz de plasma considerou-se que o mais adequado seria a adição de 1 volume de NaOH para 4 volumes de plasma, e posterior diluição de 1 volume de sobrenadante para 4 volumes de água ultrapura. Tanto para a matriz de saliva como para a de água de ETAR foram obtidos os melhores resultados com a diluição 1:1 (v/v)[78–80]. Os gráficos obtidos para estes estudos comparativos encontram-se em anexo (Anexo V).

Considerando as condições ideais de hidrólise e diluição em amostras fortificadas a 400,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  com mistura dos cinco  $\beta$ -bloqueantes, aplicou-se o método validado, com ensaios em triplicado. As recuperações obtidas apresentam-se na Tabela 3.10.

*Tabela 3.10 - Recuperações médias dos cinco  $\beta$ -bloqueantes estudados obtidas aplicando a metodologia desenvolvida a urina, plasma, saliva e água de ETAR.*

<b><math>\beta</math>-bloqueante</b>	<b>Recuperação (%) <math>\pm</math> RSD (%)</b> (n=3)			
	<b>Urina</b>	<b>Plasma</b>	<b>Saliva</b>	<b>Água de ETAR</b>
PIN	62,7 $\pm$ 8,8	53,4 $\pm$ 0,8	66,0 $\pm$ 9,0	79,3 $\pm$ 3,6
BIS	67,6 $\pm$ 7,3	83,8 $\pm$ 0,6	85,2 $\pm$ 13,8	86,9 $\pm$ 2,0
PRO	64,3 $\pm$ 8,7	72,5 $\pm$ 1,4	74,2 $\pm$ 7,8	72,9 $\pm$ 5,1
CAR	85,1 $\pm$ 2,7	58,7 $\pm$ 4,1	74,1 $\pm$ 12,5	70,3 $\pm$ 8,2
NEB	76,5 $\pm$ 11,9	76,9 $\pm$ 1,0	85,4 $\pm$ 2,9	66,5 $\pm$ 9,8

Deste modo alcançaram-se recuperações superiores a 62,7% (RSD  $\leq$  11,9%) para urina, a 53,4% (RSD  $\leq$  4,1%) para plasma, a 66,0% (RSD  $\leq$  13,8%) para saliva, e a 66,5% (RSD  $\leq$  9,8%) para água de ETAR. Os cromatogramas obtidos por meio destas análises encontram-se na Figura 3.17.

Posteriormente, com o intuito de avaliar o comportamento da metodologia quando aplicada a matrizes reais, realizaram-se ensaios em triplicado com as diversas amostras fortificadas a 20,0, 36,0, 60,0, 100,0, 140,0, 200,0, 300,0 e 400,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Com os resultados obtidos, construíram-se curvas de calibração com cinco níveis de concentração, que resultaram nos valores de  $r^2$  da Tabela 3.11. A interpretação destes resultados sugere linearidade da aplicação do método desenvolvido numa larga gama de concentrações, para qualquer uma das matrizes aquosas ( $r^2 \geq 0,9900$ ). Os resultados obtidos permitem considerar a ausência de efeitos de matriz, aquando da aplicação da metodologia desenvolvida a amostras aquosas reais.

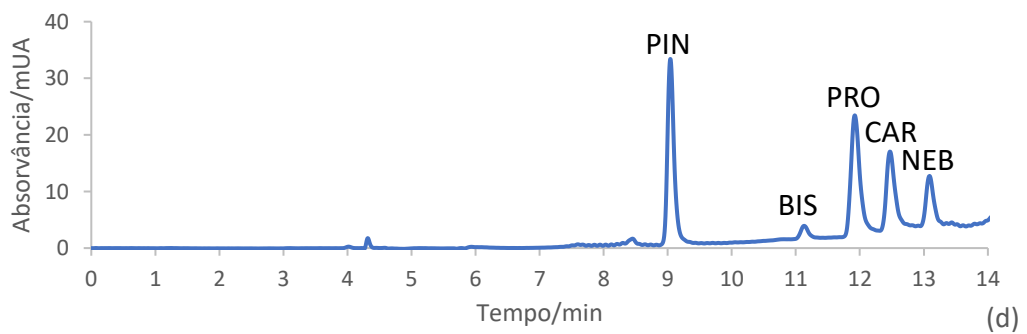
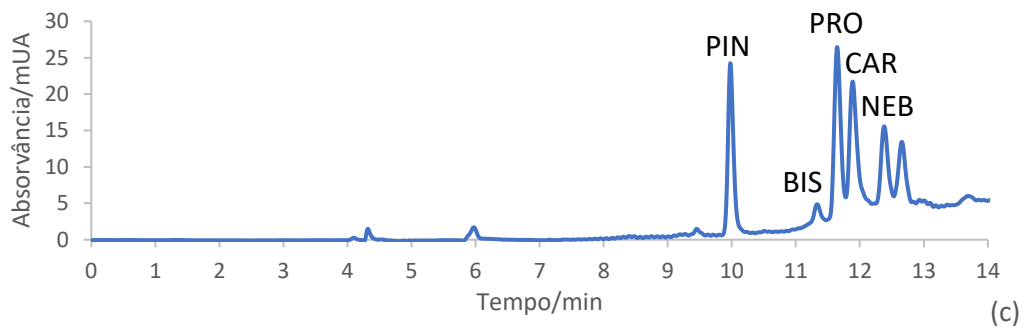
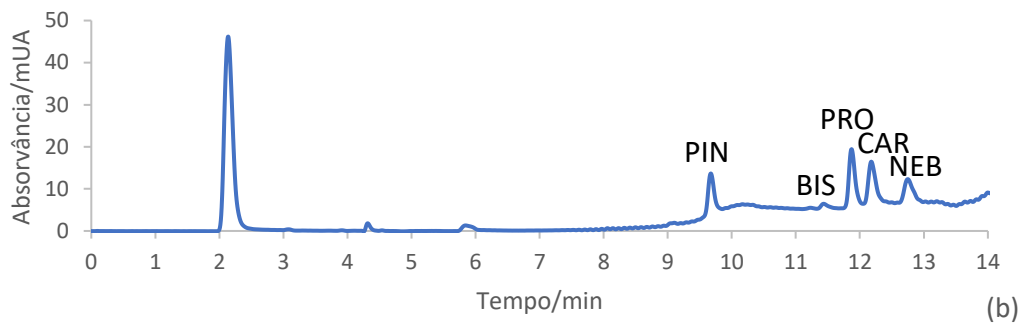
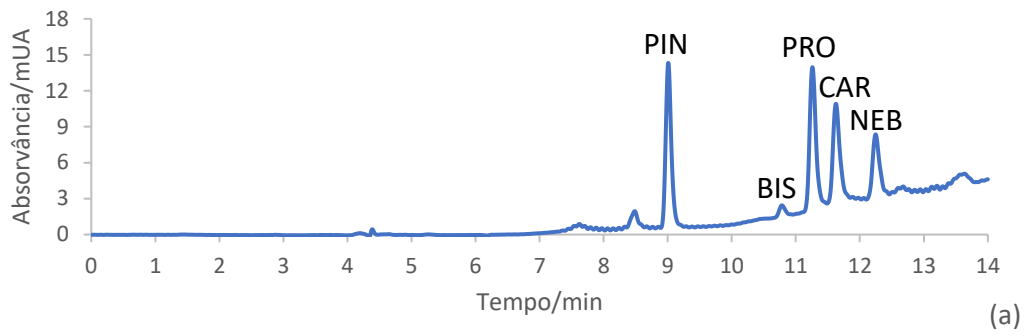


Figura 3.17 - Cromatogramas obtidos quando da aplicação da metodologia desenvolvida a amostras fotificadas com mistura dos  $\beta$ -bloqueantes estudados de (a) urina, (b) plasma, (c) saliva e (d) água de ETAR.

Tabela 3.11 - Parâmetros de regressão relativos à aplicação da metodologia desenvolvida a matrizes reais.

<b>β-bloqueantes</b>	<b>Matriz</b>	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>r<sup>2</sup></b>
<b>PIN</b>	Urina	2,2998	91,005	0,9952
	Plasma	1,3317	2,7272	0,9940
	Saliva	1,4662	-2,3167	0,9992
	Água de ETAR	1,9083	6,4502	0,9997
<b>BIS</b>	Urina	1,3053	-10,586	0,9994
	Plasma	1,7685	-1,292	0,9998
	Saliva	1,5487	54,679	0,9988
	Água de ETAR	1,6474	-8,6781	0,9993
<b>PRO</b>	Urina	5,1257	-6,8422	0,9995
	Plasma	5,7623	87,591	0,9972
	Saliva	4,3868	82,251	0,9991
	Água de ETAR	5,5697	-35,251	0,9932
<b>CAR</b>	Urina	0,72	3,9535	0,9962
	Plasma	0,9262	-4,4341	0,9990
	Saliva	0,7285	-6,1118	0,9900
	Água de ETAR	0,7901	-15,642	0,9954
<b>NEB</b>	Urina	0,3825	16,989	0,9986
	Plasma	0,647	7,6364	0,9973
	Saliva	0,4128	-2,7005	0,9961
	Água de ETAR	0,4117	4,7581	0,9994

Procedeu-se, ainda, à análise de amostras de urina e saliva provenientes de doador medicado com cloridrato de PRO. Os cromatogramas da Figura 3.18 foram obtidos através destas análises, e, com base no  $t_R$  e espectro UV-vis do β-bloqueante em causa, demonstram efetivamente a aplicabilidade deste método a matrizes biológicas reais.

Sugere-se, contudo, a aplicação de instrumentação mais seletiva e sensível, nomeadamente LC-MS, à metodologia desenvolvida, com o intuito de corroborar a presença de PRO nas amostras do voluntário medicado com este β-bloqueante, bem como alcançar os limiares analíticos desejados para amostras ambientais.

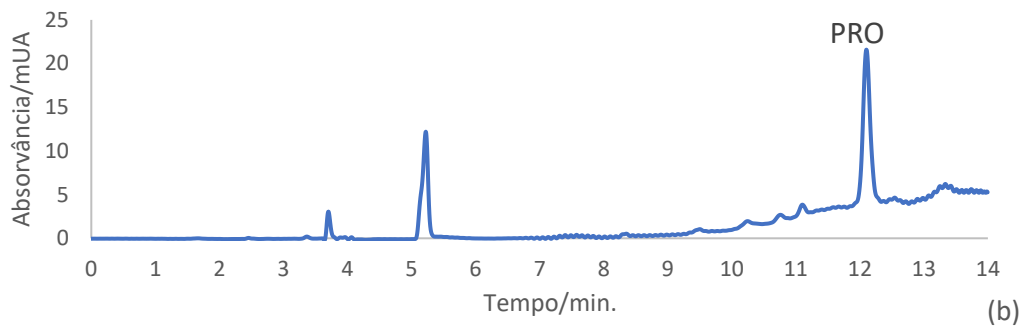
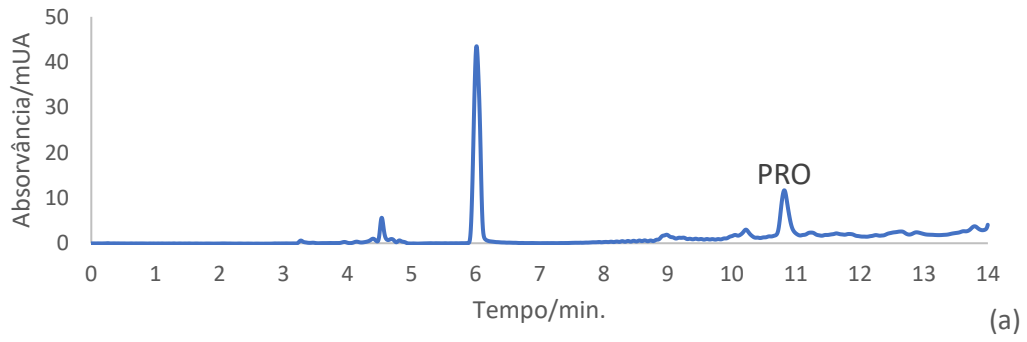


Figura 3.18 - Cromatogramas obtidos aquando da aplicação da metodologia desenvolvida a amostras de (a) urina e (b) saliva doadas por voluntário medicado com cloridrato de PRO.

### 3.7. Comparação com estudos anteriores

Correlacionar um método desenvolvido e proposto com trabalhos previamente publicados é essencial em qualquer estudo analítico. A comparação do trabalho desenvolvido com alguns artigos de metodologias já estabelecidas é apresentada na Tabela VI.1 em anexo (Anexo VI). De entre as moléculas-alvo, o PRO é a mais amplamente estudada, encontrando-se em múltiplos artigos publicados na última década. Os restantes  $\beta$ -bloqueantes estão menos presentes na literatura, especialmente o NEB, o que torna esta metodologia uma mais-valia nesta área.

Quando comparadas as recuperações, verifica-se que os valores obtidos neste trabalho são tendencialmente similares aos dos restantes estudos, ainda que esses cheguem a verificar recuperações na casa dos 90%, principalmente no caso de PRO e CAR. Os valores de RSD revelam precisões semelhantes às da literatura, chegando a ser inferiores aos indicados em algumas publicações. Por sua vez, os limiares analíticos situam-se na mesma ordem de grandeza, salvo exceções verificadas especialmente em estudos ambientais, porém, tratando-se de um parâmetro influenciado pela instrumentação, é possível equacionar futuramente a combinação desta metodologia com sistemas LC-MS. Relativamente à quantidade de amostra necessária para a realização das análises, a metodologia proposta apresenta um volume similar à generalidade dos estudos biológicos com que foi comparada, contudo, significativamente inferior ao volume utilizado nos restantes estudos ambientais. A metodologia proposta apresenta, ainda, a singularidade de permitir analisar distintas matrizes aquosas, tanto biológicas como ambientais, numa ampla gama linear, o que se revela uma mais-valia, dado que tal se regista em poucos artigos. Em todos os estudos, os coeficientes de determinação encontram-se próximos de 1.

Como vantagens do método proposto, destacam-se as elevadas recuperações e a ampla gama linear, a aplicação eficaz a matrizes biológicas e ambientais, o reduzido volume de solvente utilizado, o baixo custo, e ainda a possibilidade de se poderem realizar 15 análises em simultâneo. É então possível considerar que a metodologia proposta se apresenta como alternativa efetiva à determinação de  $\beta$ -bloqueantes em amostras aquosas reais.

## 4. Conclusões

O presente trabalho propõe uma nova metodologia (BA $\mu$ E- $\mu$ LD/HPLC-DAD) para determinação de cinco  $\beta$ -bloqueantes, nomeadamente BIS, CAR, NEB, PIN e PRO. A abordagem desenvolvida é considerada simples, adequada para análise vestigial e amiga do ambiente, podendo ser aplicada a amostras reais biológicas, em contexto de monitorização terapêutica, toxicologia e controlo de *doping*, mas também ambientais.

Numa fase inicial, após se selecionarem os analitos-alvo, verificou-se que HPLC-DAD seria o sistema instrumental mais adequado para efeitos de análise. Otimizando os parâmetros instrumentais foi possível analisar os cinco  $\beta$ -bloqueantes em tempo analítico inferior a 13 minutos, tendo-se obtido limiares analíticos aceitáveis (LOD  $\approx$  0,02 mg L<sup>-1</sup> e LOQ  $\approx$  0,07 mg L<sup>-1</sup>), bem como curvas de calibração compreendidas entre 0,07 e 15,00 mg L<sup>-1</sup> com boa linearidade ( $r^2 \geq 0,9961$ ).

A preparação de amostras prévia à instrumentação envolveu uma técnica de microextração inovadora que possibilita a utilização de diversos materiais sorventes, tendo sido o polímero de fase reversa e troca aniónica fraca Strata X-AW que apresentou resultados mais adequados à extração dos fármacos em estudo.

De seguida, otimizou-se a metodologia através da avaliação de diversos parâmetros que podem influenciar quer a microextração quer a retroextração, nomeadamente, o tempo de equilíbrio e a velocidade de agitação, mas também as condições da matriz (pH, força iónica e polaridade), tipo de solvente e tempo de retroextração. Note-se que a otimização foi realizada inicialmente incluindo ATN, porém esta molécula não prosseguiu no estudo. As condições otimizadas para extrair os cinco analitos foram de 4 h de tempo de equilíbrio (990 rpm), matriz a pH 12, e 15 minutos sob sonificação utilizando como solvente MeOH:ACN (1:1, v/v). Este processo permitiu alcançar recuperações médias compreendidas entre 71,4 e 84,4%.

Posteriormente, procedeu-se à validação da metodologia. Nesta etapa, foram determinados LOD e LOQ compreendidos entre 1,2 e 10,0  $\mu$ g L<sup>-1</sup> e 4,0 e 33,0  $\mu$ g L<sup>-1</sup>, respetivamente. As gamas lineares de trabalho situaram-se entre 4,0 e 600,0  $\mu$ g L<sup>-1</sup> para PIN, 17,2 e 600,0  $\mu$ g L<sup>-1</sup> para BIS e PRO, e 33,0 e 600,0  $\mu$ g L<sup>-1</sup> para CAR e NEB. Associada a estas curvas de calibração foi ainda registada uma boa linearidade, tanto considerando os valores de  $r^2 \geq 0,9974$ , como também por meio do estudo da homocedasticidade dos resultados com recurso a teste *F* e dispersão de resíduos. Aquando do estudo da precisão e exatidão da metodologia, obtiveram-se valores residuais relativos e de RSD inferiores a 5,5% e a 14,0%, respetivamente.

A metodologia já otimizada e validada foi, então, aplicada a matrizes reais de urina, plasma, saliva e água de ETAR fortificadas com soluções padrão dos cinco analitos-alvo. Através da observação das curvas de calibração obtidas em condições ideais de hidrólise e diluição, não se verificaram quaisquer efeitos de matriz. Para a matriz urina registaram-se recuperações médias compreendidas entre 62,7 e 85,1% (RSD  $\leq$  11,9%;  $r^2 \geq 0,9952$ ); para a matriz plasma, recuperações médias compreendidas entre 53,4 e 83,8% (RSD  $\leq$  9,5%;  $r^2 \geq 0,9940$ ); para a matriz saliva, recuperações médias compreendidas entre 66,0 e 85,4% (RSD  $\leq$  14,1%;  $r^2 \geq 0,9900$ ). Para a matriz água de ETAR, recuperações médias compreendidas entre 66,5 e 86,9% (RSD  $\leq$  14,3%;  $r^2 \geq 0,9932$ ).

Posteriormente, a metodologia desenvolvida foi aplicada a amostras de urina e saliva fornecidas por um voluntário medicado com PRO, tendo sido possível identificar este  $\beta$ -bloqueante nos ensaios efetuados.

Por fim, efetuou-se a comparação da presente metodologia (BA $\mu$ E) com outras abordagens analíticas propostas, sobretudo envolvendo técnicas de microextração bem estabelecidas (por exemplo, LLE, SPE, SPME, MEPS, MSPE, etc.). Neste contexto, foi possível verificar recuperações similares às da literatura, embora não tivessem sido alcançados valores de cerca de 90%, sobretudo para os  $\beta$ -bloqueantes PRO e CAR. Contudo, os valores de RSD revelaram precisões superiores às de algumas metodologias. Os limiares analíticos situaram-se na mesma ordem de grandeza, salvo exceções para os estudos ambientais, principalmente quando foram usados sistemas de instrumentação mais sofisticados. As gamas lineares do presente estudo destacaram-se em relação às restantes pela sua amplitude, assim como pela possibilidade de aplicação a 15 amostras em simultâneo, tanto biológicas como ambientais. Conclui-se, assim, que a metodologia proposta se configura como uma alternativa efetiva em relação a outras aceites e implementadas a nível internacional, para além de se mostrar de mais fácil manipulação e simplicidade.

Em suma, os objetivos propostos no presente projeto foram cumpridos na íntegra, salvo a exceção da aplicação ao ATN, tendo-se conseguido desenvolver uma metodologia analítica inovadora e robusta para determinação de  $\beta$ -bloqueantes, em matrizes reais quer em contexto clínico e de controlo de *doping*, quer ambiental.

Futuramente, pode perspetivar-se a expansão da gama de  $\beta$ -bloqueantes analisados em simultâneo e a aplicação a outras matrizes, como por exemplo águas fluviais. Sugere-se, igualmente, o recurso a sistemas de instrumentação mais seletivos e sensíveis, como LC-MS ou LC-MS/MS, para alcançar LOD menores (ou seja, ppt) e, como tal, mais adequados para monitorização ambiental, embora, neste sentido, a comparação com outros estudos ambientais também permita perspetivar a utilização de um maior volume de amostra.

## Bibliografia

- [1] World Health Organization. Cardiovascular diseases - Overview. [https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab_1). [Consultado a 18/05/2024]
- [2] Eurostat. Cardiovascular diseases statistics. [https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Cardiovascular\\_diseases\\_statistics](https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Cardiovascular_diseases_statistics). [Consultado a 18/05/2024]
- [3] World Health Organization. Cardiovascular diseases (CVD). [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)). [Consultado a 18/05/2024]
- [4] World Heart Federation. World Heart Report 2023: Confronting the World's Number One Killer, Geneva, Suíça, 2023.
- [5] American Heart Association. Types of heart medications. <https://www.heart.org/en/health-topics/heart-attack/treatment-of-a-heart-attack/cardiac-medications>. [Consultado a 18/05/2024]
- [6] S. Yildirim, C. Erkmen, B. Uslu, Novel Trends in Analytical Methods for  $\beta$ -Blockers: An Overview of Applications in the Last Decade, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 52 (2020) 1–39. <https://doi.org/10.1080/10408347.2020.1791043>.
- [7] X. Xiao, M.M. Zhang, Z.Q. Wang, Determination of  $\beta$ -Blockers in Bovine and Porcine Tissues and Bovine Milk by High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry, *Anal. Lett.* 52 (2019) 439–451. <https://doi.org/10.1080/00032719.2018.1470638>.
- [8] E. López-de-Sá, J. López-Sendón, Pharmacological treatment of chronic stable angina pectoris, in: P. Avanzas, J.C. Kaski (Eds.), *Pharmacol. Treat. Chronic Stable Angina Pectoris*, Springer, London, 2015: pp. 57–77. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-17332-0>.
- [9] The Nobel Prize. Sir James W. Black - Facts. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1988/black/facts/>. [Consultado a 18/05/2024]
- [10] L. Poirier, S.W. Tobe, Contemporary use of  $\beta$ -blockers: Clinical relevance of subclassification, *Can. J. Cardiol.* 30 (2014) 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2013.12.001>.
- [11] M.G. Khan, ed., *Beta-blockers*, in: *Encycl. Hear. Dis.*, Humana Press, 2011. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-219-3\\_24](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-219-3_24).
- [12] P.S. Shrivastav, S.M. Buha, M. Sanyal, Detection and quantitation of  $\beta$ -blockers in plasma and urine, *Bioanalysis.* 2 (2010) 263–276. <https://doi.org/10.4155/bio.09.184>.
- [13] V.K. Vashistha, A. Kumar, Stereochemical facets of clinical  $\beta$ -blockers: An overview, *Chirality.* 32 (2020) 722–735. <https://doi.org/10.1002/chir.23200>.
- [14] A.R. Bekhradnia, M.A. Ebrahimzadeh, Theoretical study on some non-selective beta-adrenergic antagonists and correlation to their biologically active configurations, *Med. Chem. Res.* 21 (2012) 2571–2578. <https://doi.org/10.1007/s00044-011-9781-3>.
- [15] PubChem. Atenolol. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Atenolol>. [Consultado a 18/05/2024]
- [16] StatPearls. Atenolol. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539844/>. [Consultado a 18/05/2024]
- [17] PubChem. Bisoprolol. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Bisoprolol>.

- [Consultado a 18/05/2024]
- [18] StatPearls. Bisoprolol. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551623/>. [Consultado a 18/05/2024]
- [19] PubChem. Carvedilol. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Carvedilol>. [Consultado a 18/05/2024]
- [20] StatPearls. Carvedilol. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534868/>. [Consultado a 18/05/2024]
- [21] PubChem. Nebivolol. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Nebivolol>. [Consultado a 18/05/2024]
- [22] StatPearls. Nebivolol. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551582/>. [Consultado a 18/05/2024]
- [23] PubChem. Pindolol. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pindolol>. [Consultado a 18/05/2024]
- [24] LiverTox. Pindolol. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548489/>. [Consultado a 18/05/2024]
- [25] PubChem. Propranolol. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Propranolol>. [Consultado a 18/05/2024]
- [26] StatPearls. Propranolol. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557801/>. [Consultado a 18/05/2024]
- [27] V. Dissanayake, M. Wahl, Beta-Blockers, in: W. Philip (Ed.), *Encycl. Toxicol.*, Third Edition, Academic Press, 2014: pp. 438–441. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00698-9>.
- [28] M. Schulz, S. Iwersen-Bergmann, H. Andresen, A. Schmoltdt, Therapeutic and toxic blood concentrations of nearly 1,000 drugs and other xenobiotics, *Crit. Care*. 16 (2012) 2–5. <https://doi.org/10.1186/cc11441>.
- [29] D. Šatínský, V. Sobek, I. Lhotská, P. Solich, Micro-extraction by packed sorbent coupled on-line to a column-switching chromatography system – A case study on the determination of three beta-blockers in human urine, *Microchem. J.* 147 (2019) 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.02.069>.
- [30] G.D. Burrows, B. Davies, L. Fail, C. Poynton, H. Stevenson, A placebo controlled trial of diazepam and oxprenolol for anxiety, *Psychopharmacology (Berl)*. 50 (1976) 177–179. <https://doi.org/10.1007/BF00430489>.
- [31] I.M. James, D.N.W. Griffith, R.M. Pearson, P. Newbury, Effect of Oxprenolol on Stage-Fright in Musicians, *Lancet*. 310 (1977) 952–954. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(77\)90890-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(77)90890-X).
- [32] L. Kirk, P.C. Baastrup, M. Schou, Propranolol and lithium-induced tremor, *Lancet*. 299 (1972) 839. [https://doi.org/doi:10.1016/S0140-6736\(72\)90817-3](https://doi.org/doi:10.1016/S0140-6736(72)90817-3).
- [33] C. Carlsson, T. Johansson, The psychological effects of propranolol in the abstinence phase of chronic alcoholics., *Br. J. Psychiatry*. 119 (1971) 605–606. <https://doi.org/10.1192/bjp.119.553.605>.
- [34] A.N. Singh, Therapeutic uses of beta-blockers in psychosomatics, in: A.J. Krakowski, C.P. Kimball (Eds.), *Psychosom. Med. Theor. Clin. Transcult. Asp.*, Springer, Boston, 1983: pp. 803–813. [https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4684-4496-4\\_89](https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4684-4496-4_89).

- [35] B.J. Shields, J.J. Lima, P.F. Binkley, C. V. Leier, J.J. Mackichan, Determination of pindolol in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 378 (1986) 163–171. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)80709-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)80709-4).
- [36] Y.D. Lapierre, Control of lithium tremor with propranolol, *Can. Med. Assoc. J.* 114 (1976) 619–624.
- [37] E.M. Sellers, D.H. Zilm, N.C. Degani, Comparative efficacy of propranolol and chlordiazepoxide in alcohol withdrawal, *J. Stud. Alcohol.* 38 (1977) 2096–2108. <https://doi.org/10.15288/jsa.1977.38.2096>.
- [38] Diário da República. Portaria n.º 455-A/2023, de 29 de dezembro.
- [39] World Anti-Doping Agency (WADA). The Prohibited List, 2024. <https://www.wada-ama.org/en/prohibited-list#search-anchor>. [Consultado a 18/05/2024]
- [40] World Anti-Doping Agency (WADA). Minimum Required Performance Levels and applicable Minimum Reporting Levels for non-threshold substances analyzed by Chromatographic - Mass Spectrometric analytical methods. 1.0, (2022) 1–12.
- [41] World Anti-Doping Agency (WADA). Cardiovascular Conditions: The therapeutic use of beta-blockers in athletes, (2020) 1–18.
- [42] V.I. Iancu, G.L. Radu, R. Scutariu, A new analytical method for the determination of beta-blockers and one metabolite in the influents and effluents of three urban wastewater treatment plants, *Anal. Methods.* 11 (2019) 4668–4680. <https://doi.org/10.1039/c9ay01597c>.
- [43] M. Gros, T.M. Pizzolato, M. Petrović, M.J.L. de Alda, D. Barceló, Trace level determination of  $\beta$ -blockers in waste waters by highly selective molecularly imprinted polymers extraction followed by liquid chromatography-quadrupole-linear ion trap mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1189 (2008) 374–384. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.10.052>.
- [44] F. Mlynek, M. Himmelsbach, W. Buchberger, C.W. Klampfl, Time study on the uptake of four different beta-blockers in garden cress (*Lepidium sativum*) as a model plant, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 28 (2021) 59382–59390. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11610-5>.
- [45] M. Pocrnić, M. Ansorge, M. Dohunová, I. Habinovec, E. Tesařová, N. Galić, Chiral separation of beta-blockers by high-performance liquid chromatography and determination of bisoprolol enantiomers in surface waters, *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 71 (2020) 56–62. <https://doi.org/10.2478/aiht-2020-71-3318>.
- [46] H. Nsubuga, C. Basheer, M.B. Haider, R. Bakdash, Sol-gel based biogenic silica composite as green nanosorbent for chemometric optimization of micro-solid-phase extraction of beta blockers, *J. Chromatogr. A.* 1554 (2018) 16–27. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.04.044>.
- [47] A. Rubio, C. Görgens, S. Guddat, T. Piper, A.M. Garzinsky, O. Krug, M. Thevis, Chiral analysis of selected enantiomeric drugs relevant in doping controls, *J. Chromatogr. Open.* 1 (2021) 100017. <https://doi.org/10.1016/j.jcoa.2021.100017>.
- [48] M. Delamoye, C. Duverneuil, F. Paraire, P. De Mazancourt, J.C. Alvarez, Simultaneous determination of thirteen  $\beta$ -blockers and one metabolite by gradient high-performance liquid chromatography with photodiode-array UV detection, *Forensic Sci. Int.* 141 (2004) 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2003.12.008>.
- [49] A.R. Ribeiro, L.H.M.L.M. Santos, A.S. Maia, C. Delerue-Matos, P.M.L. Castro, M.E.

- Tiritan, Enantiomeric fraction evaluation of pharmaceuticals in environmental matrices by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1363 (2014) 226–235. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.06.099>.
- [50] I. Baranowska, B. Kowalski, Using HPLC method with DAD detection for the simultaneous determination of 15 drugs in surface water and wastewater, *Polish J. Environ. Stud.* 20 (2011) 21–28.
- [51] K. Kaplan, T. Gürkan Polat, O. Duman, S. Tunç, Development of a simple, rapid, accurate, and sensitive method for carvedilol analysis in human blood serum by reversed phase-high performance liquid chromatography with diode array detector, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 41 (2018) 532–543. <https://doi.org/10.1080/10826076.2018.1477795>.
- [52] Z. Talebpour, M. Taraji, N. Adib, Stir bar sorptive extraction and high performance liquid chromatographic determination of carvedilol in human serum using two different polymeric phases and an ionic liquid as desorption solvent, *J. Chromatogr. A.* 1236 (2012) 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.02.063>.
- [53] K. Farhadi, M. Firuzi, M. Hatami, Stir bar sorptive extraction of propranolol from plasma samples using a steel pin coated with a polyaniline and multiwall carbon nanotube composite, *Microchim. Acta.* 182 (2014) 323–330. <https://doi.org/10.1007/s00604-014-1336-0>.
- [54] L. Zhang, X. Su, C. Zhang, L. Ouyang, Q. Xie, M. Ma, S. Yao, Extraction and preconcentration of  $\beta$ -blockers in human urine for analysis with high performance liquid chromatography by means of carrier-mediated liquid phase microextraction, *Talanta.* 82 (2010) 984–992. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.06.003>.
- [55] K. Goryński, A. Kiedrowicz, B. Bojko, Development of SPME-LC–MS method for screening of eight beta-blockers and bronchodilators in plasma and urine samples, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 127 (2016) 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.03.001>.
- [56] M. Samadifar, Y. Yamini, Microextraction by packed sorbent of some  $\beta$ -blocker drugs with chitosan@mof-199 bio-composite in human saliva, plasma, and urine samples, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 234 (2023) 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115520>.
- [57] H. Heidari, B. Limouei-Khosrowshahi, Magnetic solid phase extraction with carbon-coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles coupled to HPLC-UV for the simultaneous determination of losartan, carvedilol, and amlodipine besylate in plasma samples, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1114–1115 (2019) 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.03.025>.
- [58] X. Ren, M. He, B. Chen, B. Hu, Magnetic porous organic polymers for extraction of cardiovascular drugs in human urine samples followed by HPLC-UV, *Anal. Methods.* 12 (2020) 141–148. <https://doi.org/10.1039/c9ay02041a>.
- [59] M. Silva Gracia, A. Köppl, S. Unholzer, E. Haen, Development and validation of an HPLC-UV method for the simultaneous determination of the antipsychotics clozapine, olanzapine and quetiapine, several beta-blockers and their metabolites, *Biomed. Chromatogr.* 31 (2017) 1–11. <https://doi.org/10.1002/bmc.3968>.
- [60] A. Raoufi, M. Ebrahimi, M.R. Bozorgmehr, Application of response surface modeling and chemometrics methods for the determination of Atenolol, Metoprolol and Propranolol in blood sample using dispersive liquid–liquid microextraction combined with HPLC-DAD, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1132 (2019) 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.121823>.
- [61] P.O.M. Gundersen, A. Helland, O. Spigset, S. Hegstad, Quantification of 21 antihypertensive drugs in serum using UHPLC-MS/MS, *J. Chromatogr. B Anal. Technol.*

- Biomed. Life Sci. 1089 (2018) 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.04.038>.
- [62] J. Giebułtowicz, G. Kojro, K. Buś-Kwaśnik, P.J. Rudzki, R. Marszałek, A. Leś, P. Wroczyński, Cloud-point extraction is compatible with liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry for the determination of bisoprolol in human plasma, *J. Chromatogr. A.* 1423 (2015) 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.10.076>.
- [63] T.A. Rodina, E.S. Mel'nikov, A.I. Dmitriev, S.A. Belkov, A. V. Sokolov, V. V. Arkhipov, A.B. Prokof'ev, Simultaneous Determination of Metoprolol and Bisoprolol in Human Serum by HPLC-MS/MS for Clinical Drug Monitoring, *Pharm. Chem. J.* 51 (2018) 1111–1118. <https://doi.org/10.1007/s11094-018-1750-4>.
- [64] C. Miège, M. Favier, C. Brosse, J.P. Canler, M. Coquery, Occurrence of betablockers in effluents of wastewater treatment plants from the Lyon area (France) and risk assessment for the downstream rivers, *Talanta.* 70 (2006) 739–744. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.07.002>.
- [65] S. Magiera, C. Uhlschmied, M. Rainer, C.W. Huck, I. Baranowska, G.K. Bonn, GC-MS method for the simultaneous determination of  $\beta$ -blockers, flavonoids, isoflavones and their metabolites in human urine, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 56 (2011) 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.04.024>.
- [66] Z. Wang, X. Zhang, S. Jiang, X. Guo, Magnetic solid-phase extraction based on magnetic multiwalled carbon nanotubes for the simultaneous enantiomeric analysis of five  $\beta$ -blockers in the environmental samples by chiral liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, *Talanta.* 180 (2018) 98–107. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.12.034>.
- [67] P.S. Rawat, P.R. Ravi, L. Kaswan, R.S. Raghuvanshi, Development and validation of a bio-analytical method for simultaneous quantification of nebivolol and labetalol in aqueous humor and plasma using LC-MS/MS and its application to ocular pharmacokinetic studies, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1136 (2020) 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.121908>.
- [68] M.J.M. Wells, Principles of Extraction and the Extraction of Semivolatile Organics from Liquids, in: J.D. Winefordner, S. Mitra (Eds.), *Sample Prep. Tech. Anal. Chem.*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 2003: pp. 37–131. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/0471457817>.
- [69] W. Liu, Z. Yan, X. Huang, J. Chen, M. Lu, L. Zhang, G. Chen, Simultaneous determination of blockers and agonists by on-fiber derivatization in self-made solid-phase microextraction coating fiber, *Talanta.* 132 (2015) 915–921. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.07.064>.
- [70] N.R. Neng, A.R.M. Silva, J.M.F. Nogueira, Adsorptive micro-extraction techniques—Novel analytical tools for trace levels of polar solutes in aqueous media, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 7303–7310. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.09.048>.
- [71] J.M.F. Nogueira, Microextração adsortiva em barra (BA $\mu$ E): Um conceito analítico inovador para microextração estática, *Sci. Chromatogr.* 5 (2013) 275–283. <https://doi.org/10.4322/sc.2014.010>.
- [72] S.M. Ahmad, Metodologias Analíticas Inovadoras Baseadas em Microextração Adsorptiva em Barra (BA $\mu$ E) para a Monitorização de Contaminantes e Substâncias de Abuso Emergentes em Matrizes Ambientais e Biológicas - Tese de Doutoramento em Química, FCUL, 2019.
- [73] D.A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler, S.R. Crouch, *High-Performance Liquid*

- Chromatography, in: *Fundam. Anal. Chem.*, 9th ed., Cengage Learning, 2013: pp. 912–932.
- [74] D.C. Harris, *High-Performance Liquid Chromatography*, in: *Quant. Chem. Anal.*, 7th ed., W. H. Freeman and Company, New York, 2007: pp. 556–587.
- [75] S.M. Ahmad, J.M.F. Nogueira, High throughput bar adsorptive microextraction: A novel cost-effective tool for monitoring benzodiazepines in large number of biological samples, *Talanta*. 199 (2019) 195–202. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.02.004>.
- [76] A.H. Ide, J.M.F. Nogueira, New-generation bar adsorptive microextraction (BA $\mu$ E) devices for a better eco-user-friendly analytical approach—Application for the determination of antidepressant pharmaceuticals in biological fluids, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 153 (2018) 126–134. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.02.001>.
- [77] P. Amaratunga, C. Thomas, B.L. Lemberg, D. Lemberg, Quantitative measurement of XLR11 and UR-144 in oral fluid by LC-MS-MS, *J. Anal. Toxicol.* 38 (2014) 315–321. <https://doi.org/10.1093/jat/bku040>.
- [78] S. Saito, Y. Hirao, A.F. Quadery, B. Xu, A. Elguoshy, H. Fujinaka, S. Koma, K. Yamamoto, T. Yamamoto, The optimized workflow for sample preparation in lc-ms/ms-based urine proteomics, *Methods Protoc.* 2 (2019) 1–13. <https://doi.org/10.3390/mps2020046>.
- [79] G. Zanchetti, I. Floris, A. Piccinotti, S. Tameni, A. Poletti, Rapid and robust confirmation and quantification of 11-nor- $\Delta^9$ - tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid (THC-COOH) in urine by column switching LC-MS-MS analysis, *J. Mass Spectrom.* 47 (2012) 124–130. <https://doi.org/10.1002/jms.2034>.
- [80] L. Dehennin, P. Lafarge, P. Dailly, D. Bailloux, J.P. Lafarge, Combined profile of androgen glucuro- and sulfoconjugates in post-competition urine of sportsmen: A simple screening procedure using gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 687 (1996) 85–91. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(96\)00131-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(96)00131-4).
- [81] Drugbank Online. Bisoprolol fumarate. <https://go.drugbank.com/salts/DBSALT001015>. [Consultado a 18/05/2024]
- [82] Drugbank Online. Nebivolol hydrochloride. <https://go.drugbank.com/salts/DBSALT001027>. [Consultado a 18/05/2024]
- [83] Drugbank Online. Propranolol hydrochloride. <https://go.drugbank.com/salts/DBSALT000549>. [Consultado a 18/05/2024]
- [84] J.M.F. Nogueira, Novel sorption-based methodologies for static microextraction analysis: A review on SBSE and related techniques, *Anal. Chim. Acta.* 757 (2012) 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.10.033>.
- [85] C. Almeida, J.M.F. Nogueira, Comparison of the selectivity of different sorbent phases for bar adsorptive microextraction—Application to trace level analysis of fungicides in real matrices, *J. Chromatogr. A.* 1265 (2012) 7–16. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.09.047>.
- [86] Phenomenex. Strata X-AW Polymeric SPE Products. <https://www.phenomenex.com/products/strata-x-solid-phase-extraction-products/strata-x-aw>. [Consultado a 18/05/2024]
- [87] Erik Baltussen, Pat Sandra, Frank David, Carel Cramers, Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles, *J. Microcolumn Sep.* 11 (1999) 737–747. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-667X\(1999\)11:10<737::AID-MCS7>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-667X(1999)11:10<737::AID-MCS7>3.0.CO;2-4).

- [88] C.F. Poole, Milestones in the Development of Liquid-Phase Extraction Techniques, in: C.F. Poole (Ed.), *Handbooks Sep. Sci. Liq. Extr.*, Elsevier Inc., 2020: pp. 1–44. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816911-7.00001-3>.
- [89] C.P. Da Silva, E.S. Emídio, M.R.R. De Marchi, Method validation using weighted linear regression models for quantification of UV filters in water samples, *Talanta*. 131 (2015) 221–227. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.07.041>.
- [90] S. Yıldırım, K. Fikarová, V. Pilařová, L. Nováková, P. Solich, B. Horstkotte, Lab-in-syringe automated protein precipitation and salting-out homogenous liquid-liquid extraction coupled online to UHPLC-MS/MS for the determination of beta-blockers in serum, *Anal. Chim. Acta.* 1251 (2023) 340966. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2023.340966>.
- [91] O. Mompó-Roselló, A. Ribera-Castelló, E.F. Simó-Alfonso, M.J. Ruiz-Angel, M.C. García-Alvarez-Coque, J.M. Herrero-Martínez, Extraction of  $\beta$ -blockers from urine with a polymeric monolith modified with 1-allyl-3-methylimidazolium chloride in spin column format, *Talanta*. 214 (2020) 120860. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.120860>.
- [92] A. Mahmoudi, M. Rajabi, Selective determination of some beta-blockers in urine and plasma samples using continuous flow membrane microextraction coupled with high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1128 (2019) 121768. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.121768>.
- [93] S. Jamshidi, M.K. Rofouei, G. Thorsen, Using magnetic core-shell nanoparticles coated with an ionic liquid dispersion assisted by effervescence powder for the micro-solid-phase extraction of four beta blockers from human plasma by ultra high performance liquid chromatography with mass spectrometry, *J. Sep. Sci.* 42 (2019) 698–705. <https://doi.org/10.1002/jssc.201800834>.
- [94] M. Hemmati, M. Rajabi, A. Asghari, Ultrasound-promoted dispersive micro solid-phase extraction of trace anti-hypertensive drugs from biological matrices using a sonochemically synthesized conductive polymer nanocomposite, *Ultrason. Sonochem.* 39 (2017) 12–24. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.03.024>.

## Anexos

### Anexo I – Espectros UV-vis dos $\beta$ -bloqueantes em estudo

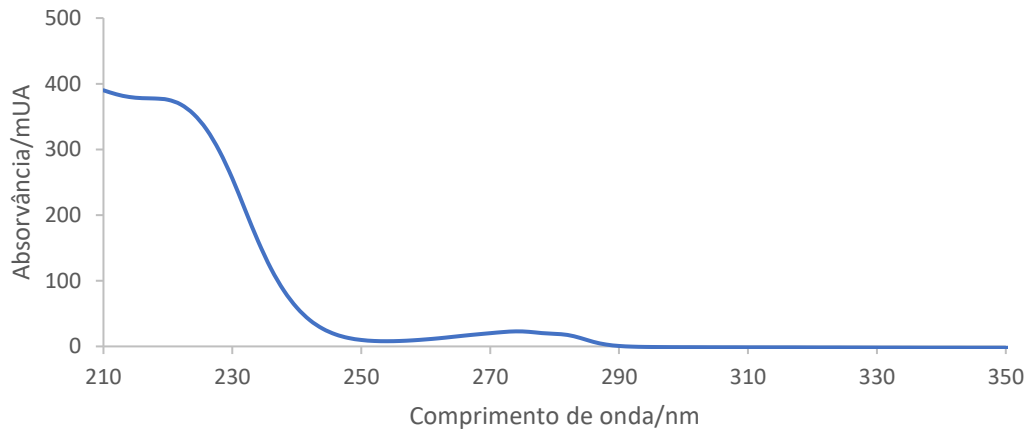


Figura I.1 - Espectro UV-vis ATN.

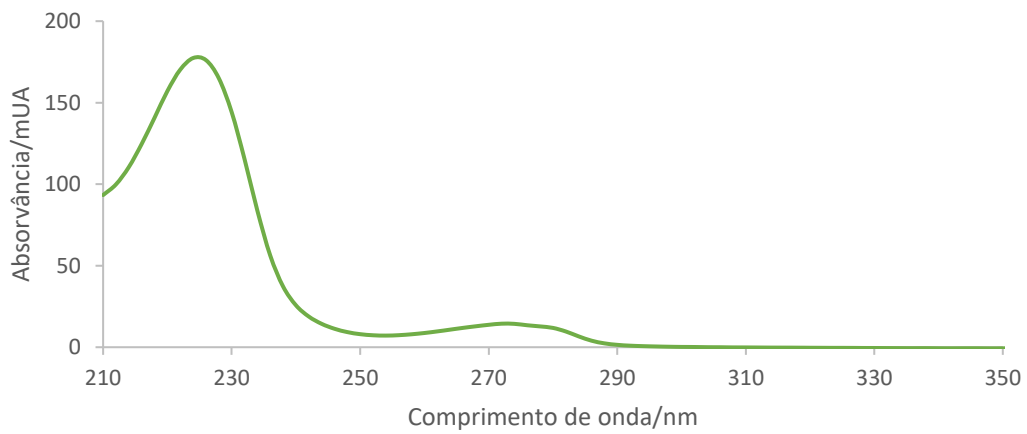


Figura I.2 - Espectro UV-vis BIS.

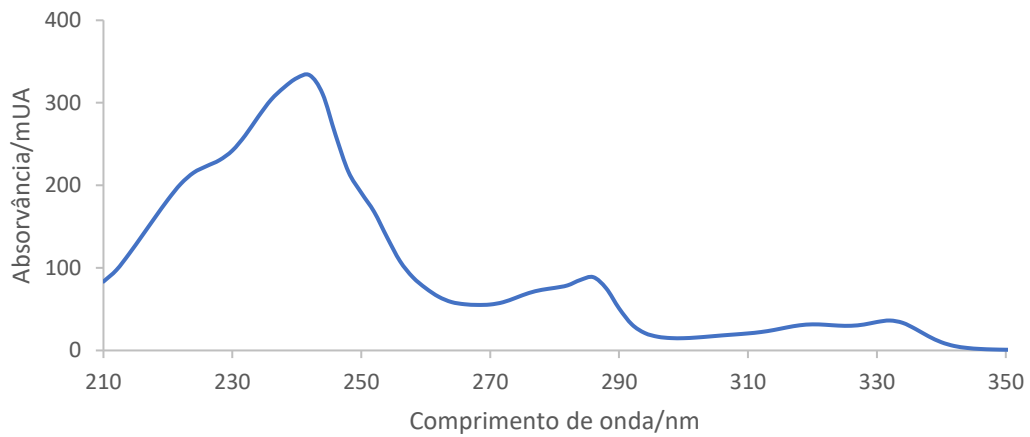


Figura I.3 - Espectro UV-vis CAR.

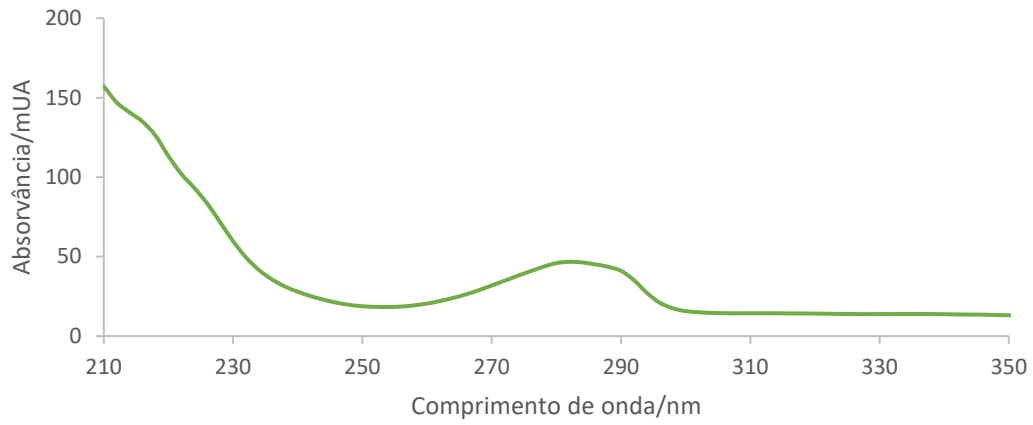


Figura 1.4 - Espectro UV-vis NEB.

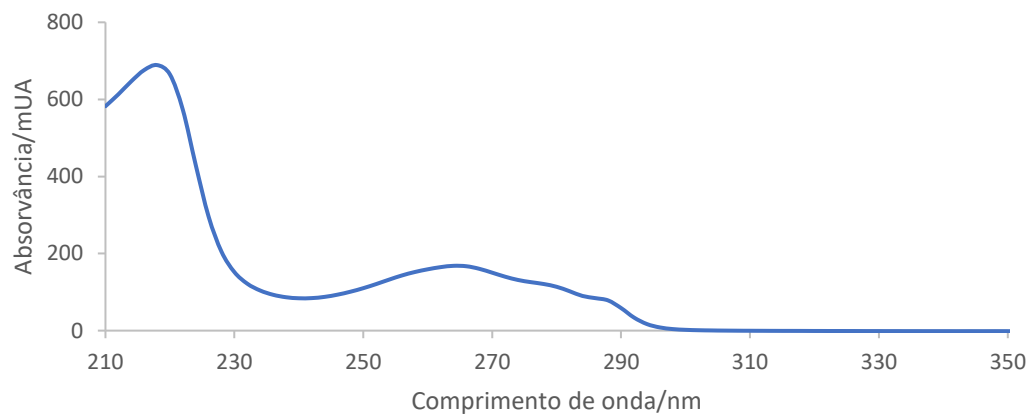


Figura 1.5 - Espectro UV-vis PIN.

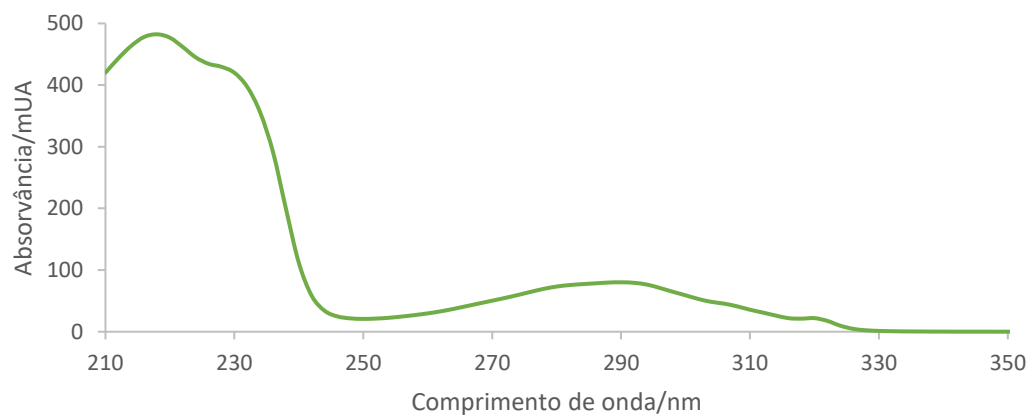


Figura 1.6 - Espectro UV-vis PRO.

## Anexo II - Gráficos de especiação dos $\beta$ -bloqueantes em estudo

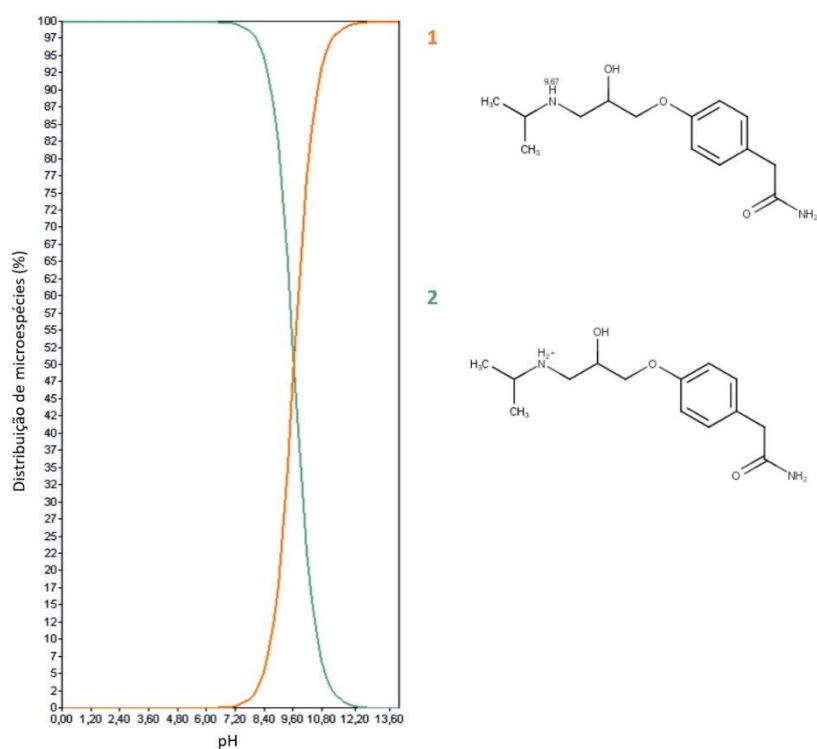


Figura II.1 - Gráfico de especiação e estrutura molecular das espécies de ATN. Adaptado do software MarvinSketch.

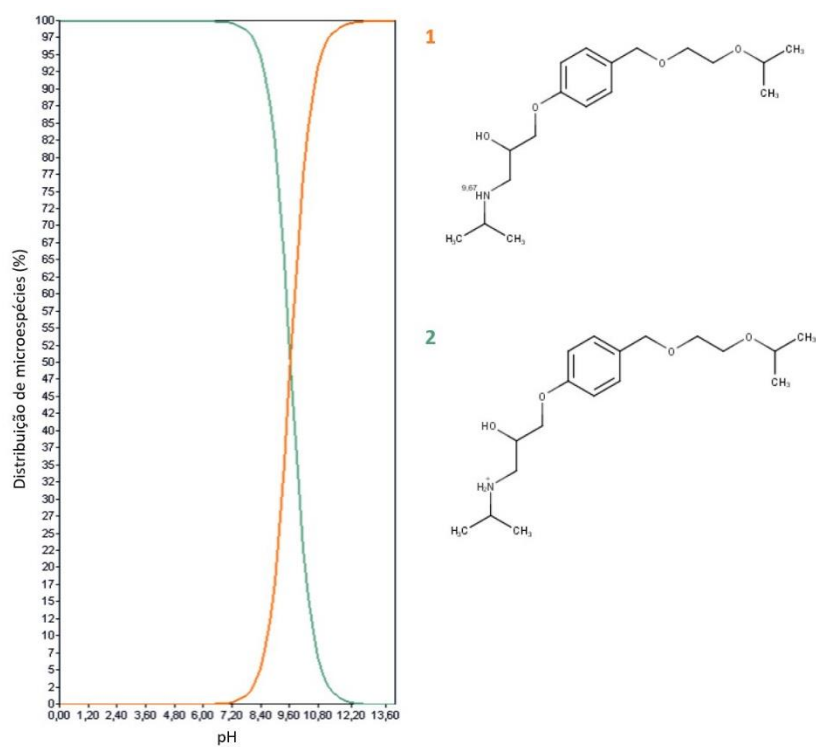


Figura II.2 - Gráfico de especiação e estrutura molecular das espécies de BIS. Adaptado do software MarvinSketch.

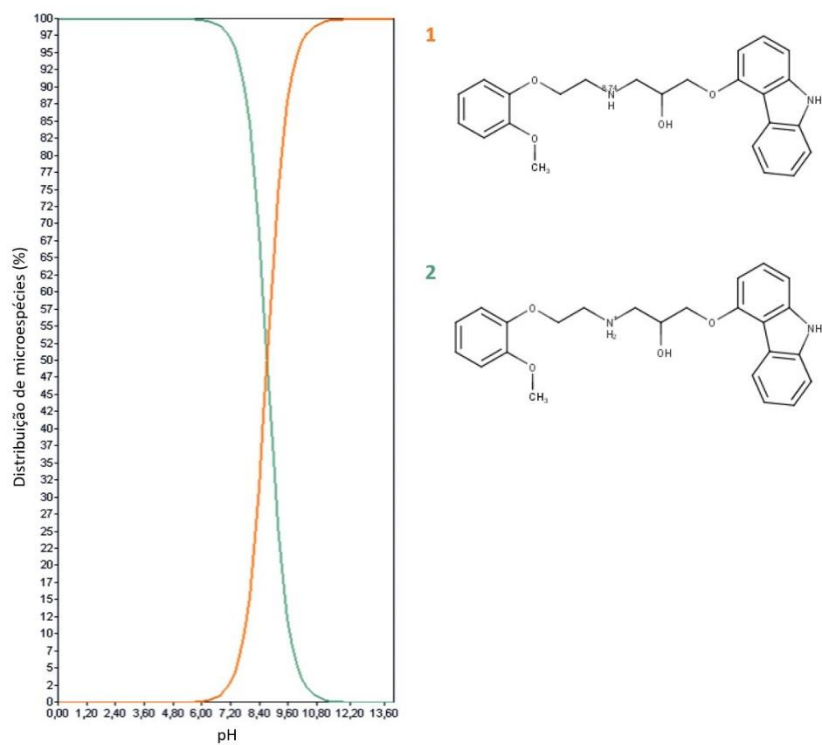


Figura II.3 - Gráfico de especiação e estrutura molecular das espécies de CAR. Adaptado do software MarvinSketch.

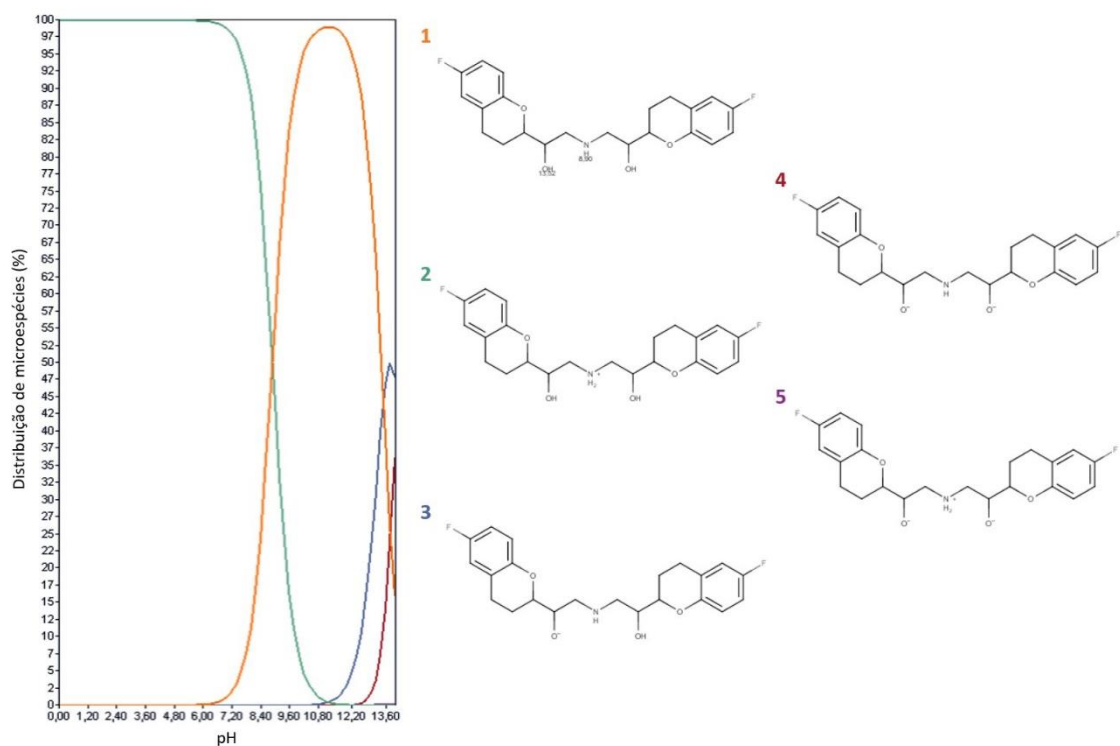


Figura II.4 - Gráfico de especiação e estrutura molecular das espécies de NEB. Adaptado do software MarvinSketch.

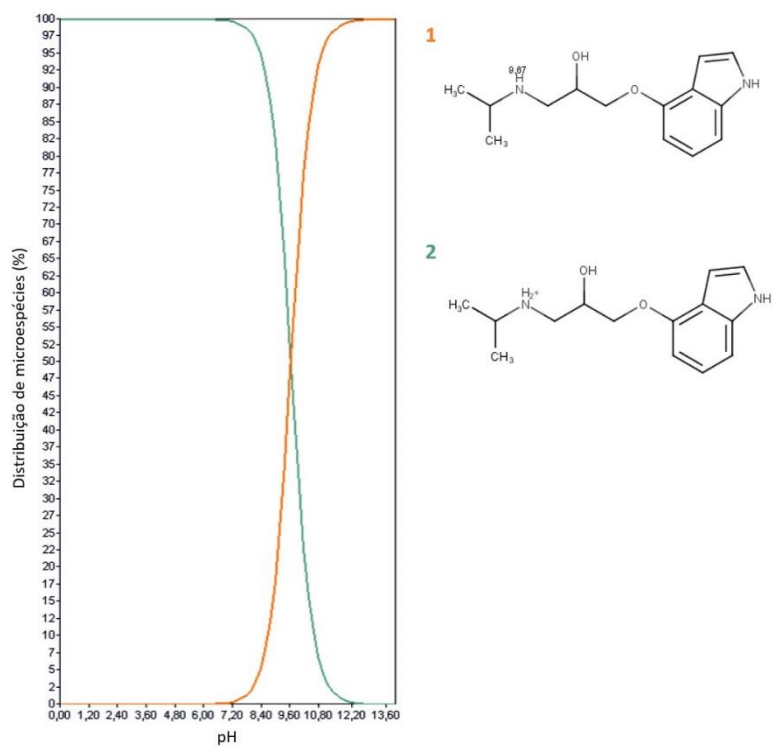


Figura II.5 - Gráfico de especiação e estrutura molecular das espécies de PIN. Adaptado do software MarvinSketch.

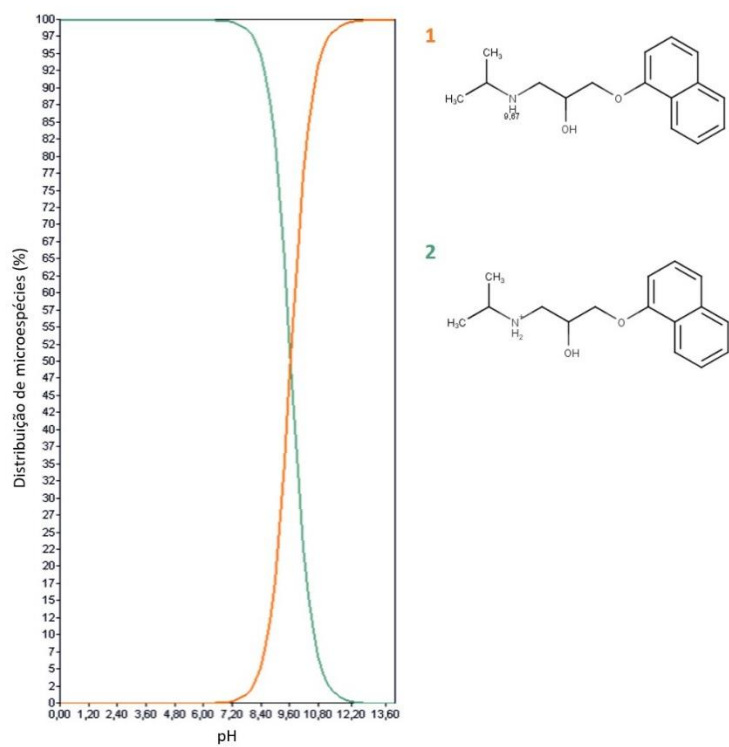


Figura II.6 - Gráfico de especiação e estrutura molecular das espécies de PRO. Adaptado do software MarvinSketch.

### Anexo III - Curvas de calibração

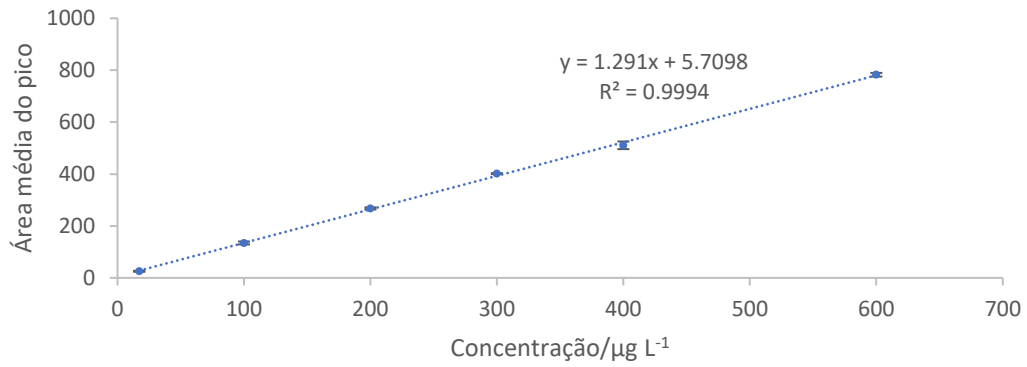


Figura III.1 - Curva de calibração obtida para BIS.

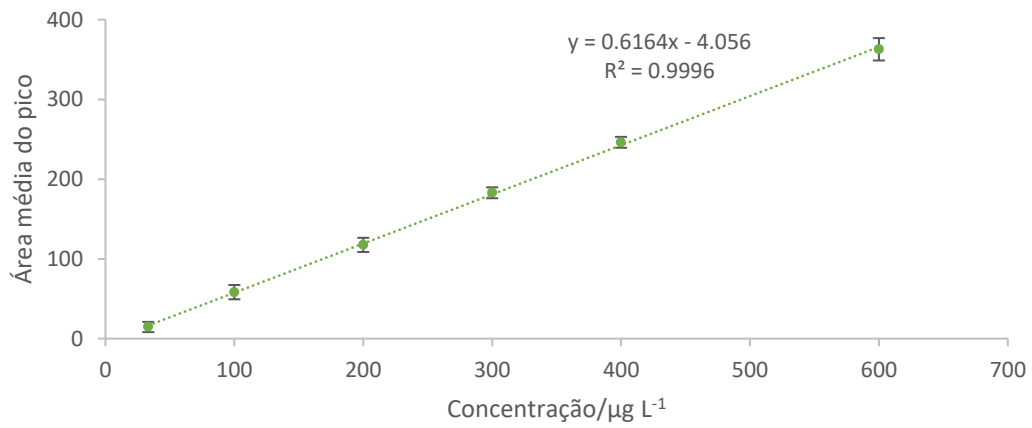


Figura III.2 - Curva de calibração obtida para CAR.

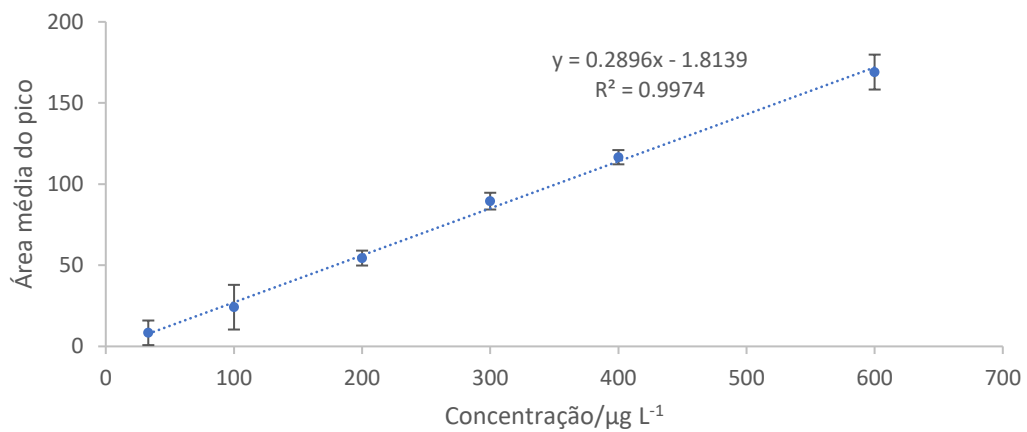


Figura III.3 - Curva de calibração obtida para NEB.

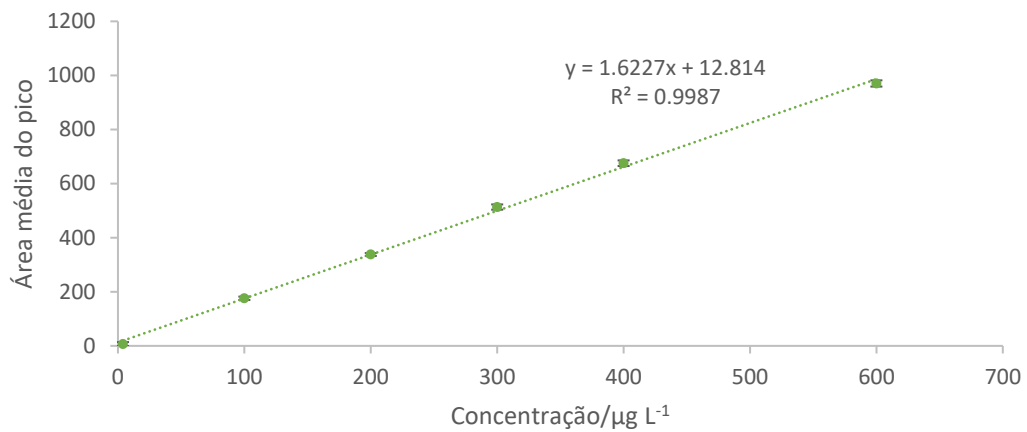


Figura III.4 - Curva de calibração obtida para PIN.

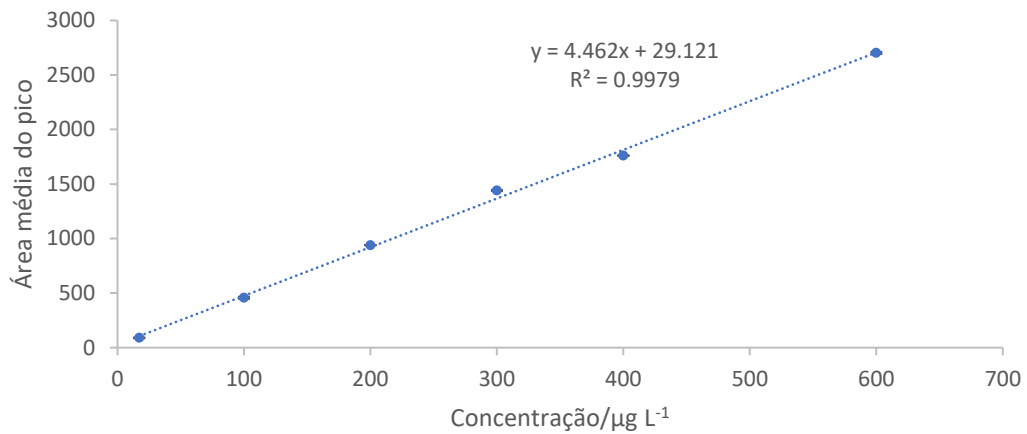


Figura III.5 - Curva de calibração obtida para PRO.

## Anexo IV - Dispersão de resíduos

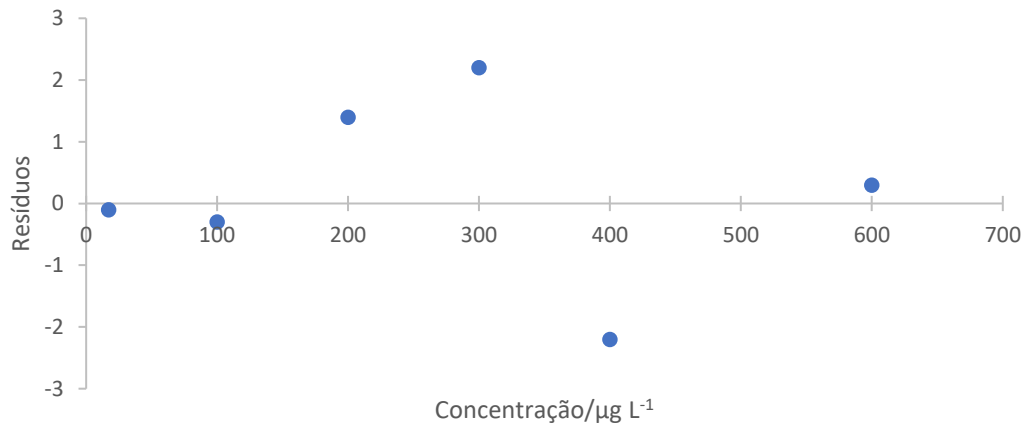


Figura IV.1 - Dispersão de resíduos obtida para BIS.

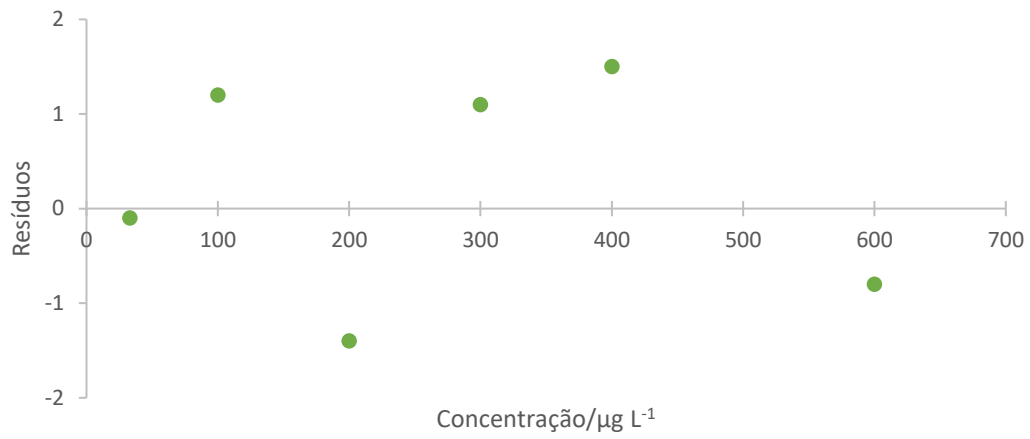


Figura IV.2 - Dispersão de resíduos obtida para CAR.

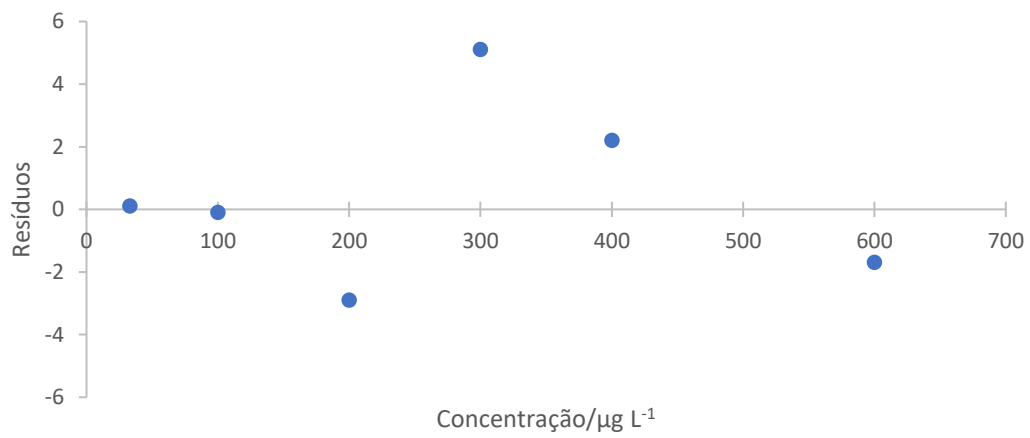


Figura IV.3 - Dispersão de resíduos obtida para NEB.

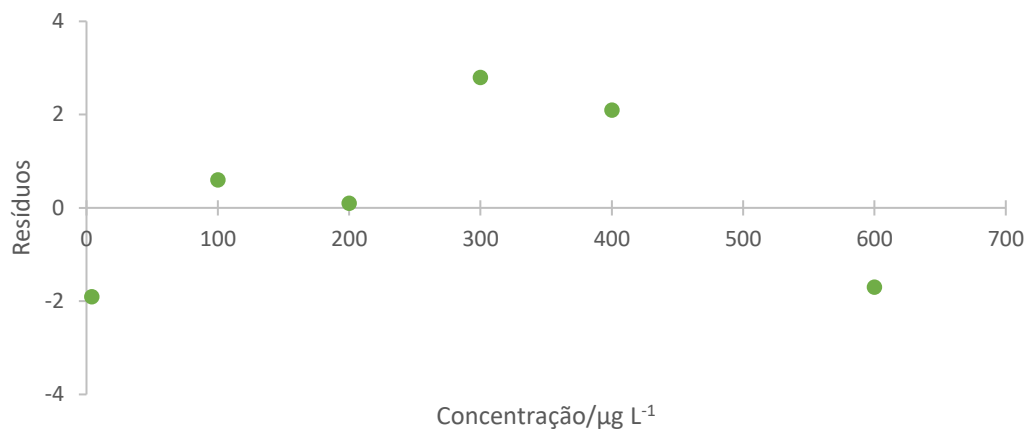


Figura IV.4 - Dispersão de resíduos obtida para PIN.

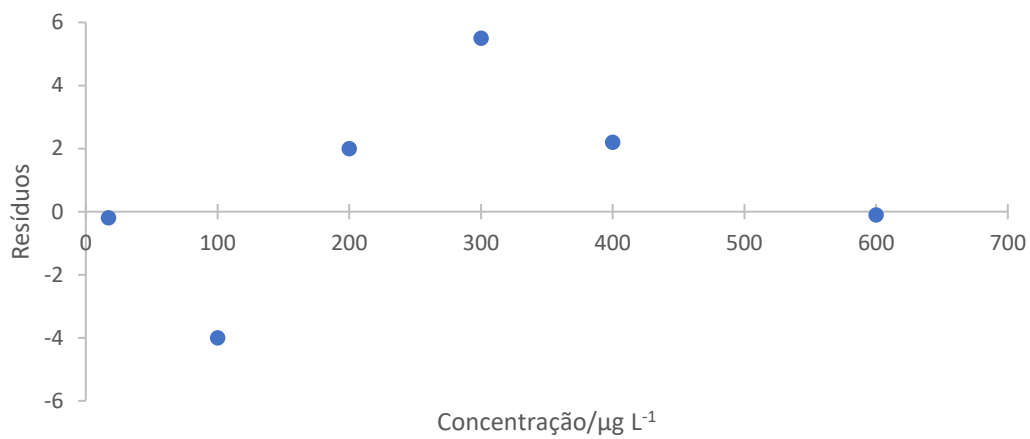


Figura IV.5 - Dispersão de resíduos obtida para PRO.

## Anexo V – Estudos comparativos em amostras reais

### a) Estudos comparativos para urina

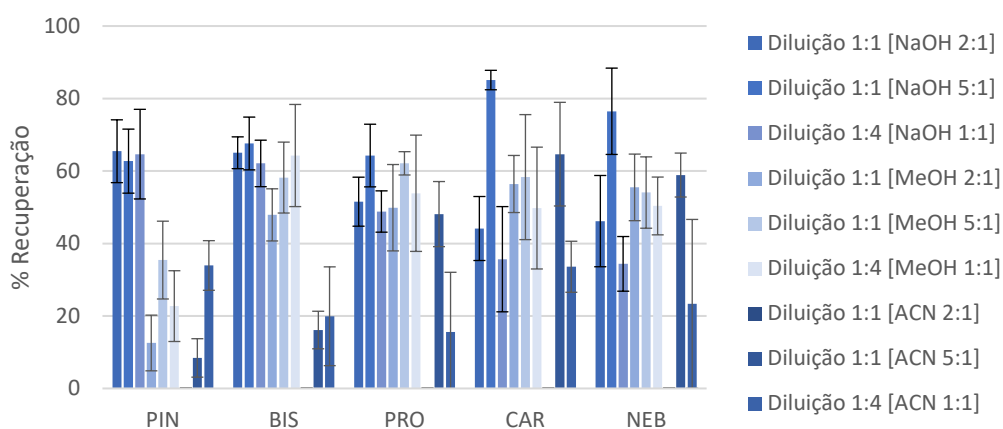
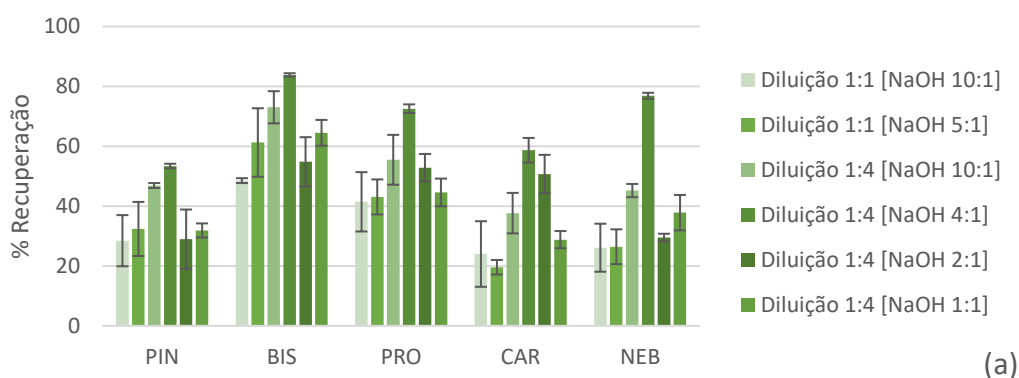
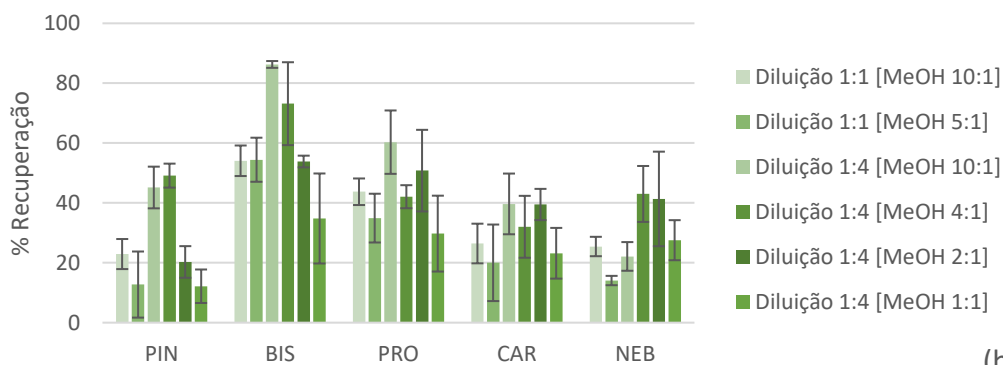


Figura V.1 - Estudo comparativo da eficiência de extração da metodologia quando aplicada a amostra de urina, variando a taxa de diluição em água ultrapura e de agente hidrolisante (NaOH, MeOH e ACN).

### b) Estudos comparativos para plasma



(a)



(b)

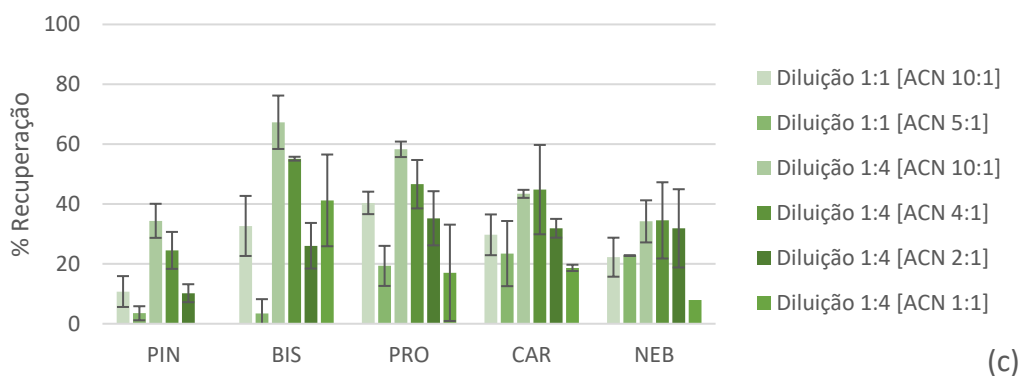


Figura V.2 - Estudo comparativo da eficiência de extração da metodologia quando aplicada a amostra de plasma, variando a taxa de diluição em água ultrapura e de agente hidrolisante ((a) NaOH, (b) MeOH e (c) ACN).

**c) Estudos comparativos para saliva**

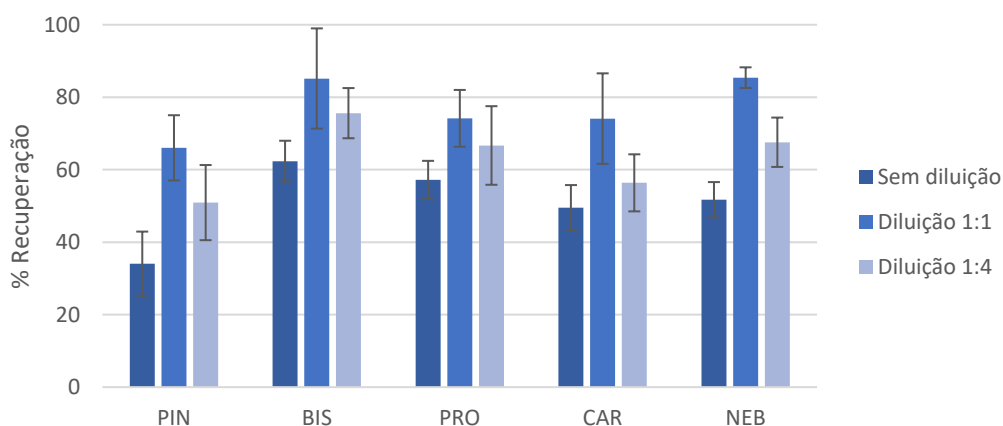


Figura V.3 - Estudo comparativo da eficiência de extração da metodologia quando aplicada a amostra de saliva, variando a taxa de diluição em água ultrapura.

**d) Estudos comparativos para água de ETAR**

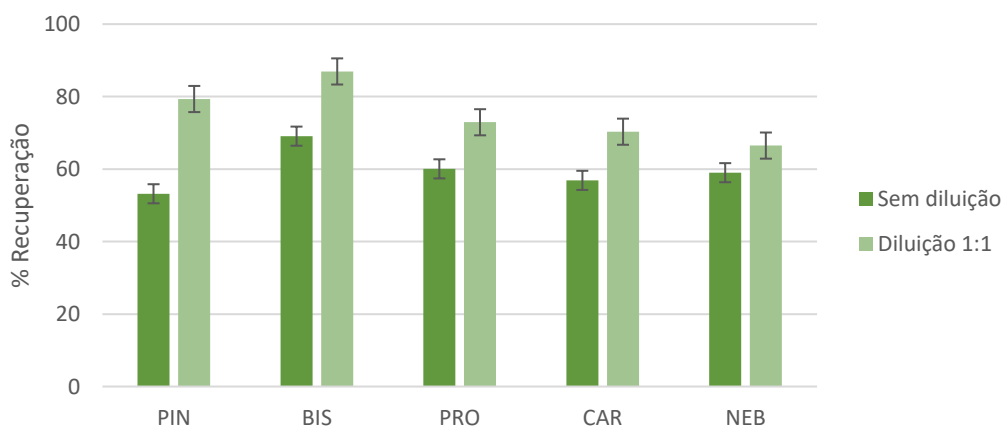


Figura V.4 - Estudo comparativo da eficiência de extração da metodologia quando aplicada a amostra de água de ETAR, variando a taxa de diluição em água ultrapura.

## Anexo VI – Comparação com outros estudos

Tabela VI.1 - Comparação da metodologia desenvolvida com outros estudos para análise vestigial de  $\beta$ -bloqueantes em amostras aquosas.

$\beta$ -bloqueante	Matriz	Método analítico	Recuperação (%)	RSD (%)	LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Gama linear ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	$r^2$	Ref.
<b>PIN</b>	Urina, plasma, saliva e água de ETAR	BA $\mu$ E- $\mu$ LD/HPLC-DAD	71,4	7,8	1,2	4,0	4,0 – 600,0	0,9987	Presente estudo
	Urina	LLE/LC-HRMS	$\geq 78,2$	$\leq 6,8$	0,01	-	25 – 200	0,99	[47]
	Urina e plasma	SPME/LC-MS	$\geq 54$	$\leq 15,1$	$\geq 0,018$	$\geq 0,06$	1 – 1000	$\geq 0,994$	[55]
	Soro	PP/SHLLE/UHPLC-MS/MS	23	$\leq 11$	0,5	1,5	-	0,9969	[90]
	Água de ETAR	MSPE/LC-MS/MS	$\geq 85,9$	$\leq 7,9$	0,00074	0,00281	0,005 – 0,5	$\geq 0,9963$	[66]
<b>BIS</b>	Urina, plasma, saliva e água de ETAR	BA $\mu$ E- $\mu$ LD/HPLC-DAD	84,4	9,7	5,2	17,2	17,2 – 600,0	0,9994	Presente estudo
	Urina	CM-LPME/HPLC-DAD	$\geq 100,3$	$\leq 5,0$	10	-	50 – 8000	0,9999	[54]
	Plasma	CPE/HPLC-MS/MS	$\geq 46$	$\leq 14$	-	0,3	0,3 – 70	0,999	[62]
	Soro	PP/UHPLC-MS/MS	$\geq 86$	$\leq 9,1$	0,1	0,81	1,6 – 163	0,9996	[61]

<b>β-bloqueante</b>	<b>Matriz</b>	<b>Método analítico</b>	<b>Recuperação (%)</b>	<b>RSD (%)</b>	<b>LOD (μg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>LOQ (μg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Gama linear (μg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>r<sup>2</sup></b>	<b>Ref.</b>
<b>BIS</b>	Soro	PP/HPLC-MS/MS	-	≤ 9,61	-	1	1 – 250	≥ 0,99	[63]
	Soro	Purificação online/HPLC-UV	≥ 98,07	≤ 12,17	1,18	5,0	5 – 200	0,9981	[59]
	Água de ETAR	SPE/LC-MS/MS	≥ 74,9	≤ 8,74	≥ 0,00278	≥ 0,00844	0,02 – 0,4	≥ 0,9973	[49]
<b>PRO</b>	Urina, plasma, saliva e água de ETAR	BAμE-μLD/HPLC-DAD	74,6	9,5	5,2	17,2	17,2 – 600,0	0,9979	Presente estudo
	Urina	CM-LPME/HPLC-DAD	≥ 97,9	≤ 5,9	5	-	50 – 8000	0,9998	[54]
	Urina	Online MEPS/HPLC-FLD	≥ 95,6	≤ 6,5	1,4	4,6	4,6 – 460	≥ 0,99526	[29]
	Urina	SPE/HPLC-UV	-	≤ 7,8	20,0	66,0	-	-	[91]
	Urina	LLE/LC-HRMS	≥ 94,4	≤ 8,2	0,01	-	25 – 200	0,99	[47]
	Urina	MSPE/HPLC-UV	≥ 96,4	5,2	0,06	-	0,2 – 200	0,9979	[58]
	Urina e plasma	CFMM/HPLC-UV	58	≤ 3,7	0,5	3,0	3 – 1000	0,999	[92]
	Urina, saliva e plasma	MEPS/HPLC-UV	≥ 77,2	≤ 8,1	1,5	-	5 – 600	≥ 0,9926	[56]
	Plasma	DSPE/HPLC-MS	91	≤ 6,2	0,33	1	1 – 10000	0,999	[93]

<b>β-bloqueante</b>	<b>Matriz</b>	<b>Método analítico</b>	<b>Recuperação (%)</b>	<b>RSD (%)</b>	<b>LOD (μg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>LOQ (μg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Gama linear (μg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>r<sup>2</sup></b>	<b>Ref.</b>
<b>PRO</b>	Soro	PP/SHLLE/ UHPLC- MS/MS	101	≤ 6,8	0,4	1,1	-	0,9968	[90]
	Soro	PP/UHPLC- MS/MS	≥ 87	≤ 9,3	0,08	0,32	1,3 – 259	0,9998	[61]
	Sangue	DLLME/HPLC- DAD	91,664	4,41	0,0026	0,0089	0,009 – 1	0,9989	[60]
	Água de ETAR	SPE/LC- MS/MS	≥ 71,9	≤ 7,45	≥ 0,00065	≥ 0,00198	0,02 – 0,4	≥ 0,9982	[49]
	Água de ETAR	SPE/HPLC- DAD	≥ 87,4	≤ 11,6	0,034	0,103	0,11 – 10,0	0,9999	[50]
<b>CAR</b>	Urina, plasma, saliva e água de ETAR	BAμE- μLD/HPLC- DAD	78,5	7,8	10,0	33,0	33,0 – 600,0	0,9996	Presente estudo
	Urina	MSPE/HPLC- UV	≥ 93,4	8,6	0,11	-	0,5 – 200	0,9993	[58]
	Urina e plasma	SPE/HPLC-UV	85	≤ 5,4	0,8	3,0	2,5 – 3000	0,99	[94]
	Plasma	MSPE/HPLC- UV	≥ 91,67	≤ 3,55	0,09	0,27	1 – 1500	0,9996	[57]
	Soro	PP/UHPLC- MS/MS	≥ 90	≤ 12,1	0,03	0,51	2,0 – 203	0,9995	[61]
	Soro	SPE/HPLC- DAD	99,83	0,84	0,05663	0,17161	0,1 – 1	0,9999	[51]
	Soro	Purificação online/HPLC- UV	≥ 95,47	≤ 13,96	0,97	2,5	2,5 – 80	0,9940	[59]

<b>β-bloqueante</b>	<b>Matriz</b>	<b>Método analítico</b>	<b>Recuperação (%)</b>	<b>RSD (%)</b>	<b>LOD (μg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>LOQ (μg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Gama linear (μg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>r<sup>2</sup></b>	<b>Ref.</b>
<b>CAR</b>	Água de ETAR	SPE/HPLC-DAD	≥ 45,6	≤ 7,1	0,105	0,315	0,32 – 10,0	0,9998	[50]
<b>NEB</b>	Urina, plasma, saliva e água de ETAR	BAμE-μLD/HPLC-DAD	72,8	5,9	10,0	33,0	33,0 – 600,0	0,9974	Presente estudo
	Soro	Purificação online/HPLC-UV	≥ 99,38	≤ 14,62	15,79	40	40 – 1600	0,9995	[59]
	Plasma de coelho	PP/LC-MS/MS	≥ 70,5	3,2	-	0,43	0,43 – 750	0,9981	[67]

CFMM/HPLC-UV: Microextração por membrana de fluxo contínuo com HPLC-UV (do inglês *continuous flow membrane microextraction/HPLC-UV*)

CM-LPME/HPLC-DAD: LPME mediada por portador com HPLC-DAD (do inglês *carrier mediated LPME/HPLC-DAD*)

CPE/HPLC-DAD: Extração por ponto de turvação com HPLC-DAD (do inglês *cloud-point extraction/HPLC-DAD*)

DLLME/HPLC-DAD: Microextração líquido-líquido dispersiva com HPLC-DAD (do inglês *dispersive liquid-liquid microextraction/HPLC-DAD*)

DSPE/HPLC-MS: SPE dispersiva com HPLC-MS (do inglês *dispersive SPE/HPLC-MS*)

MEPS/HPLC-DAD: Microextração por sorvente empacotado com HPLC-DAD (do inglês *microextraction by packed sorbent/HPLC-DAD*)

MSPE/LC-MS/MS: SPE magnética com LC-MS/MS (do inglês *magnetic SPE/LC-MS/MS*)

PP/SHLLE/UHPLC-MS/MS: Precipitação de proteínas seguida de LLE homogênea assistida por *salting out* com cromatografia líquida de ultra alta eficiência - MS/MS (do inglês *protein precipitation/salting out homogenous LLE/ultra-high performance liquid chromatography - MS/MS*)