

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Utilização da Espectrometria de Massas no Estudo de Produtos de  
Transformação/Degradação de Fármacos de uso Humano e Veterinário**

Jéferson Segalin

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em preenchimento parcial dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Tânia Mara Pizzolato

Porto Alegre, agosto de 2015.

“A razão humana, num determinado domínio dos seus conhecimentos, possui o singular destino de se ver atormentada por questões que não pode evitar, pois lhe são impostas pela sua natureza, mas às quais também não pode dar respostas por ultrapassarem completamente as suas possibilidades.”

**Crítica da Razão Pura – Immanuel Kant**

## **Agradecimentos**

Este trabalho só foi possível graças à generosa contribuição de inúmeras pessoas.

Agradeço à orientadora, Tânia Mara Pizzolato, pelo apoio a mim doado, por se colocar sempre à disposição e pela compreensão que demonstrou durante todo o período de orientação.

A toda equipe, e agora colegas, do Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas e medicamentos Veterinários (RPM) do Laboratório Nacional de Agropecuária, Lanagro RS, em especial ao Fabiano Barreto, ao Rodrigo Hoff Barcelos, à Louise Jank, à Juliana Arsand, e à Tanara Magalhães. Ao Fabiano Barreto e Rodrigo Hoff Barcelos agradeço enormemente por terem aberto as portas do laboratório e disponibilizando os equipamentos que foram utilizados na elaboração desta tese. Registro novamente meu agradecimento ao Fabiano Barreto por ter viabilizado os experimentos animais com a amoxicilina e agradeço ao Ugo Souza pela sua contribuição com essa parte do trabalho. Não tenho como deixar de fazer um especial agradecimento à Louise Jank por toda a sua generosidade, comprometimento e dedicação para executar tarefas em prol do meu trabalho.

Agradeço a todos da UFRGS que contribuíram com este trabalho, em especial à Carla Sirtori por ter compartilhado comigo o seu vasto conhecimento e *know-how* em produtos de transformação; ao Paolo Livotto pelo auxílio com os cálculos teóricos; à Martha F. S. Lima pela sua contribuição com os estudos cinéticos. Agradeço também à Tiele Caprioli Machado e Marla Azário Lansarin pelo fornecimento das amostras utilizadas no estudo dos produtos de transformação/degradação da rosuvastatina.

## **Lista de Trabalhos gerados**

Artigo aceito para publicação:

“Identification of Transformation Products of Rosuvastatin in Water During ZnO Photocatalytic Degradation through the use of Associated LC-QTOF-MS to Computational Chemistry.” *Journal of Hazardous Materials*; 299 (2015) 78–85.

Em elaboração:

“Antibiotics degradation by photolytic process in different water matrices: kinetics and photodegradation products.”

# ÍNDICE GERAL

1. INTRODUÇÃO .....	17
1.1 Objetivo Geral .....	18
1.2 Objetivos Específicos .....	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	19
2.1 Espectrometria de Massas .....	19
2.1.1 Fonte de Ionização .....	21
2.1.2 Ionização por Electrospray - ESI .....	22
2.1.3 Fonte nano-ESI .....	26
2.1.4 Analisadores Utilizados em Espectrometria de Massas .....	27
2.1.5 Analisadores de Massas em Tandem .....	31
2.1.6 Sistema de Fragmentação de Íons por CID .....	32
2.1.7 Modos de Análise .....	34
2.1.8 Detectores .....	36
2.2 Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas .....	38
2.3 Índice de Deficiência de Hidrogênios .....	39
2.4 Distribuição Isotópica .....	39
2.5 Química Computacional .....	46
2.5.1 Cálculos <i>Ab Initio</i> como Ferramenta para Elucidação Estrutural .....	49
2.6 Fármacos como Contaminantes Emergentes .....	50
2.7 Estudo de Produtos de Transformação, Degradação e Metabólitos .....	52
2.8 Fotodegradação .....	67
2.9 Agentes Antimicrobianos .....	68
2.10 Resistência a Antibióticos .....	69
2.11 Fármacos Abordados no Presente Trabalho .....	71
3. PARTE EXPERIMENTAL .....	77
3.1 Experimentos de Fotocatálise da Rosuvastatina .....	78
3.2 Experimentos de Fotólise do Sulfametoxazol, Ciprofloxacino e Norfloxacino .....	79
3.3 Experimento com Amoxicilina .....	79
3.4 Condições para Análise por Cromatografia a Líquido Acoplada à Espectrometria de Massas ...	80
3.5 Parâmetros Computacionais .....	83
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	83
4.1 Estabelecimento da Metodologia da Identificação dos Produtos de Transformação por LC-Q-TOF-MS/MS .....	83
4.2 Análise do Padrão de Rosuvastatina .....	91

4.3 Identificação dos Produtos de Transformação da Rosuvastatina .....	93
4.3.1 Identificação dos Produtos com Zinco .....	96
4.3.2 Identificação dos Produtos de Transformação da Rosuvastatina por Fotocatálise .....	103
4.3.3 Produtos de Transformação TP1 .....	110
4.3.4 Produtos de Transformação Mono-Hidroxilados TP2 e TP6 .....	112
4.3.5 Produtos de Transformação Di-hidroxilados e Tri-hidroxilados TP3 e TP4.....	117
4.3.6 Produtos de Transformação TP5, TP7 e TP8 .....	118
4.3.7 Produtos de Transformação TP9 e TP10 .....	119
4.3.8 Avaliação Cinética da Degradação da Rosuvastatina .....	123
4.4 Identificação dos Produtos Transformação do Sulfametoxazol.....	125
4.5 Identificação dos Produtos Transformação do Ciprofloxacino .....	139
4.6 Identificação dos Produtos Transformação do Norfloxacino.....	155
4.7 Uso da Espectrometria de Massa no Estudo da Amoxicilina .....	171
4.7.1 Amoxicilina em Meio Aquoso.....	172
4.7.2 Transferência da Amoxicilina para o Leite Bovino .....	177
5. CONCLUSÕES .....	184
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	187

## ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 – Principais fontes de ionização utilizadas em espectrometria de massas. ....	21
Quadro 2 – Principais analisadores utilizados em espectrometria de massas. ....	27
Quadro 3 – Informações sobre a composição isotópica de alguns elementos químicos. ....	40
Quadro 4 – Produtos de transformação/degradação do ciprofloxacino segundo trabalhos já publicados. ....	54
Quadro 5 – Produtos de transformação/degradação do norfloxacino, segundo trabalhos já publicados. ....	57
Quadro 6 – Produtos de transformação/degradação do sulfametoxazol segundo trabalhos já publicados. ....	59
Quadro 7 – Produtos de transformação/degradação da rosuvastatina segundo trabalhos já publicados. ....	61
Quadro 8 – Produtos de transformação/degradação e metabólitos da amoxicilina segundo trabalhos publicados. ....	65
Quadro 9 – Resumo dos compostos abordados no presente trabalho .....	72
Quadro 10 – Gradiente da fase móvel para análise das amostras de sulfametoxazol, ciprofloxacino e norfloxacino. ....	81
Quadro 11 Gradiente da fase móvel para análise das amostras de amoxicilina. ....	81
Quadro 12 Gradiente da fase móvel para análise das amostras de rosuvastatina. ....	82
Quadro 13 – Condições de operação do espectrômetro de massas em modo MS com critério IDA da Análise ESI(+) para os antibióticos e para rosuvastatina. ....	82
Quadro 14 – Condições de operação no espectrômetro API 5000 para quantificação da amoxicilina. ....	82
Quadro 15 – Amostras de rosuvastatina estudadas e tempo de fotocatalise a que foram submetidas. ....	93
Quadro 16 – Áreas relativas dos picos correspondentes à rosuvastatina protonada (íon $[M+H]^+$ ). ....	95
Quadro 17 – Produtos formados pela reação com o ZnO. ....	96
Quadro 18 – Composições possíveis para os produtos (P) da RST para o $t_R \sim 1,7$ min. ....	98
Quadro 19 – Composição isotópica do átomo de zinco. ....	98
Quadro 20 – Razão entre a intensidade dos picos com $m/z$ de 304,8803 e 303,8772 daltons dos espectros teóricos. ....	101
Quadro 21 – Áreas relativas dos picos referentes aos íons com $m/z$ 105,96 e 303,87 Da ....	103

Quadro 22 – Valores de massa exata determinados por LC-QTOF-MS/MS da rosuvastatina e os produtos de transformação gerados por fotocatalise. ....	104
Quadro 23 – Área do pico correspondente ao tempo de retenção 3,0 minutos ( $m/z$ 138,03 Da), para os diferentes tempos de fotocatalise.....	110
Quadro 24 – Produtos de transformação sugeridos para o íon com $m/z$ 138,0332. ....	111
Quadro 25 – Parâmetros Computacionais Obtidos para o TP2.....	115
Quadro 26 – Parâmetros computacionais obtidos para o TP10. ....	122
Quadro 27 – Dados de massa exata determinados mediante análise do sulfametoxazol por LC-QTOF-MS/MS e seus prováveis produtos de transformação gerados por fotólise.....	128
Quadro 28 – Energias das estruturas do sulfametoxazol hidroxilado em diferentes posições. ....	136
Quadro 29 – Massa exata determinada por LC-QTOF-MS/MS para o ciprofloxacino (CFX) e para seus prováveis produtos de transformação gerados por fotólise, juntamente com as fragmentações identificadas. ....	142
Quadro 30 – Dados de massa exata determinados por LC-QTOF-MS/MS do norfloxacino (NFX) e seus prováveis produtos de transformação gerados por fotólise, juntamente com as fragmentações identificadas. ....	158
Quadro 31 – Concentrações e áreas dos picos da curva de calibração da AMX em leite.....	177
Quadro 32 – Áreas dos picos da análise em modo MRM, valores de concentração e razão das áreas do pico qualificador e quantificador da AMX. ....	179



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema do modelo de evaporação de íons. ....	23
Figura 2 - Representação do modelo de resíduo de carga.....	24
Figura 3 – Representação esquemática do processo de electrospray.....	26
Figura 4 – Representação esquemática de picos com diferentes resoluções.....	28
Figura 5 – Representação esquemática de um quadrupolo de hastes cilíndricas e de sua polarização. ....	29
Figura 6 – Representação esquemática do espectrômetro híbrido do tipo Q-TOF. ....	32
Figura 7 – Esquema de um hexapolo. ....	33
Figura 8 – Detector de placa de microcanais .....	37
Figura 9 – Representação de um microcanal presente no detector do tipo MCP.....	38
Figura 10 – Espectro teórico da espécie $[\text{Br}]^+$ e a composição isotópica dos picos.....	42
Figura 11 – Espectro teórico da espécie $[\text{Br}_2]^+$ e a composição isotópica dos picos. ....	42
Figura 12 – Espectro teórico da espécie $[\text{Cl}]^+$ e a composição isotópica dos picos.....	42
Figura 13 – Espectro teórico da espécie $[\text{S}]^+$ e a composição isotópica dos picos. ....	43
Figura 14 – Espectro teórico da espécie $[\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_3\text{S} + \text{H}]^+$ com a composição isotópica dos picos e a sua intensidade relativa. ....	43
Figura 15 – Espectro teórico da espécie $[\text{CH}_3\text{SH}]^+$ e a composição isotópica dos picos.....	43
Figura 16 – Espectro teórico da espécie $[\text{C}_{10}\text{H}_{22}]^+$ e a composição isotópica dos picos.....	44
Figura 17 – Espectro teórico da espécie $[\text{C}_{50}\text{H}_{102}]^+$ e a composição isotópica dos picos. ....	45
Figura 18 – Espectro teórico da espécie $[\text{C}_{50}\text{H}_{102}]^{2+}$ e a composição isotópica dos picos. ....	45
Figura 19 – Representação esquemática do processo de elucidção da estrutura de produtos de transformação. ....	90
Figura 20 – Fórmula estrutural da rosuvastatina.....	91
Figura 21 – Dados obtidos para a solução padrão aquosa de rosuvastatina na concentração de $26,33 \text{ mg L}^{-1}$ .....	92
Figura 22 – Sugestão dos principais fragmentos na análise MS/MS da rosuvastatina protonada $[\text{M} + \text{H}]^+$ .....	93
Figura 23 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos na análise das dez amostras de rosuvastatina submetidas a diferentes tempos de fotocatalise. ....	94
Figura 24 – Ampliação dos cromatogramas da rosuvastatina não decomposta.....	95
Figura 25 – Cromatogramas sobrepostos com ampliação na região com $t_R$ entre 1,5 e 2,0 minutos.....	97

Figura 26 – Espectro de massas MS dos produtos (P) da rosuvastatina com $t_R \sim 1,7$ min. ....	98
Figura 27 – Distribuição isotópica do $Zn^+$ .....	99
Figura 28 – Distribuição isotópica do $[Zn_2]^+$ .....	99
Figura 29 – Espectro de massas teórico de um composto $ZnC_2H_4N$ . .....	100
Figura 30 – Espectro de massas da região entre 105 e 111 daltons, referente ao pico cromatográfico com tempo de retenção 1,7 min da amostra $t_{15min}$ .....	100
Figura 31 – Espectro de massas teórico do composto $Zn_2C_5H_6NO_6$ .....	101
Figura 32 – Espectro de massas experimental da região com $m/z$ de $\sim 300$ daltons, obtido a partir do pico cromatográfico referente ao tempo de retenção de 1,7 minutos.....	101
Figura 33 – Espectro MS/MS experimental para o pico correspondentes aos $m/z$ de 303,87 - 305,87 - 307,87 e 311,87 daltons. ....	103
Figura 34 – Cromatogramas sobrepostos para a região com $t_R$ em torno de 3,0 minutos.....	110
Figura 35 – Espectro de massas experimental (A) e teórico do composto $C_2H_8N_3O_2S$ (B) e $CaC_4H_8N_3$ (C). .....	111
Figura 36 – Espectro de massas MS/MS e estruturas de fragmentação sugeridas para o TP1. ....	112
Figura 37 – Espectro de massas MS/MS do TP2 em dois diferentes valores de energia de colisão.....	113
Figura 38 – Cromatograma correspondente ao íon extraído com $m/z$ 498.1705 e os espectros MS/MS da região J e K do cromatograma. ....	114
Figura 39 – Espectro de massas MS/MS do TP6 com a região de interesse ampliada .....	116
Figura 40 – Espectro de massas MS do composto com $m/z$ de 516,1821 daltons (em A) e espectro de massas MS/MS (em B).....	117
Figura 41 – Espectro MS/MS dos isômeros TP7 e TP8.....	119
Figura 42 – Estruturo do TP9 e seu espectro MS/MS.....	120
Figura 43 – Espectro MS/MS do TP10. ....	120
Figura 44 – Degradação da RST por fotocatalise com ZnO .....	123
Figura 45 – Concentração dos TPS durante o processo de fotocatalise por ZnO. ....	124
Figura 46 – Espectro MS (quadro superior) e MS/MS (quadro inferior) do sulfametoxazol, em solução aquosa na concentração de $10 \text{ mg L}^{-1}$ . ....	126
Figura 47 – Cromatogramas sobrepostos das amostras de sulfametoxazol submetidas a fotólise em tempo zero, 30 minutos e 240 minutos.....	127
Figura 48 – Espectro de massas em modo MS/MS do composto TP4 com as duas propostas de estrutura e de padrão de fragmentação. ....	133

Figura 49 – Espectro de massas em MS/MS do TP7. ....	133
Figura 50 – Cromatograma do íon extraído com $m/z$ 270,0543 $\pm$ 0,0005 Da. ....	136
Figura 51 – Cromatograma do ciprofloxacino na concentração de 10 mg L <sup>-1</sup> . ....	139
Figura 52 – Espectro MS do CFX (A) - espectro MS/MS do CFX (B) – espectro MS/MS ampliado na região de $m/z$ 100 a 230 Da (C). ....	140
Figura 53 – Cromatogramas sobrepostos das mostras de ciprofloxacino nos tempos de fotólise igual a zero e 240 minutos. ....	141
Figura 54 – Espectro MS/MS do TP1. ....	150
Figura 55 – Espectro de massas em modo MS/MS do TP2. ....	150
Figura 56 – Espectro de massas em MS/MS do TP3. ....	151
Figura 57 – Ampliação do espectro MS/MS na região próxima ao $m/z$ 160 Da. ....	151
Figura 58 – Espectro de massas MS/MS do TP7 e do CPX. ....	152
Figura 59 – Cromatogramas de extração do íon 348,135 $\pm$ 0,001 Da. ....	153
Figura 60 – Produtos de transformação do CFX, com $m/z$ 348 Da e $t_R$ 12,8, 16,6 e 19,2 minutos. ....	153
Figura 61 – Espectro de massas em MS/MS do TP9 e TP12 ....	154
Figura 62 – Cromatograma do norfloxacino na concentração de 10 mg L <sup>-1</sup> . ....	156
Figura 63 – Espectro de massas em MS do NFX(A) - espectro MS/MS do NFX (B). ....	156
Figura 64 – Cromatogramas sobrepostos das amostras de norfloxacino nos tempos de zero e 240 minutos de fotólise. ....	157
Figura 65 – Espectro em modo MS/MS do TP1. ....	165
Figura 66 – Espectro em modo MS/MS do TP2 e TP11. ....	166
Figura 67 – Espectro MS/MS do TP3 e TP14. ....	167
Figura 68 – Espectro MS/MS do TP4 (A), ampliado na região de $m/z$ 160 a 180 Da (B). ...	168
Figura 69 – Espectro em modo MS/MS do TP5. ....	169
Figura 70 – Cromatograma do íon extraído para o $m/z$ de 336,1354 Da. ....	170
Figura 71 – Espectro em modo MS/MS do TP10 (quadro superior) e TP13. ....	170
Figura 72 – Espectro de fragmentação em modo MS/MS do TP12. ....	171
Figura 73 – Cromatograma expandido da amoxicilina em meio aquoso e espectro de massa (MS) acumulados da região do pico cromatográfico que aparece em destaque ....	173
Figura 74 – Espectro em modo MS e MS/MS da amoxicilina ....	173
Figura 75 – Espectro em modo MS e MS/MS do íon com $m/z$ 349,0866 Da. ....	174
Figura 76 – Espectro em modo MS e MS/MS do íon com $m/z$ 731,2155 Da ....	174

Figura 77 – Cromatograma da AMX, expandido na região entre 1,0 e 5,0 minutos; espectro de massas acumulado da região do cromatograma que aparece em destaque .....	176
Figura 78 – Curva de calibração para a amoxicilina (pico 114 Da).....	178
Figura 79 – Variação da concentração da amoxicilina no leite bovino até 104 horas após a administração da primeira dose.....	180
Figura 80 – Espectro experimental obtido para a AMX em água, ampliado na região de $m/z$ 114 Da e sugestões da estrutura dos íons. ....	182
Figura 81 – Cromatogramas sobrepostos das amostras de leite coletadas ao longo de 104 horas. ....	182

## ABREVIATURAS

AMX: amoxicilina

APCI: do inglês, *atmospheric pressure chemical ionization*

CE: do inglês, *collision energy*

CI: do inglês, *chemical ionization*

CID: do inglês, *collision induced dissociation*; dissociação induzida por colisão

CPX: ciprofloxacino

DBE: do inglês, *double-bond equivalent*

DDA: análise dependente de dados, do inglês, *data-dependent analysis*

DDDs: doses diárias definidas, do inglês, *defined daily doses*

DE: disruptores endócrinos

DFT: do inglês, *Density Functional Theory*

EASI: do inglês, *easy ambient sonic-spray ionization*

EDC: do inglês, *endocrine disrupting chemicals*

EI: do inglês, *electron impact*

ESI: do inglês, *electrospray ionization*; ionização por *electrospray*

FAB: do inglês, *fast atom bombardment*

FT-ICR-MS: do inglês, *Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry*

GC-MS: cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

ICP: do inglês, *inductively coupled plasma*

LC: do inglês, *liquid chromatography*; cromatografia líquida

LC-MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

LC-MS/MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em modo *tandem*

MCP: do inglês, *Micro Channel Plate*

MALDI: do inglês, *matrix-assisted laser desorption ionization*

MRM: do inglês, *multiple reaction monitoring*

MS: do inglês, *mass spectrometry*; espectrometria de massas

MS/MS: espectrometria de massa em modo *tandem*

NFX: norfloxacion

ppb: partes por bilhão

ppm: partes por milhão

Q-TOF: espectrômetro de massas híbrido com analisador do tipo quadrupolo e TOF em *tandem*

RDBE: do inglês, *ring double-bond equivalent ou rings-plus-double-bonds equivalent*

RST: rosuvastatina

SIM: do inglês, *selected ion monitoring*

SMX: sulfametoxazol

TOF: do inglês, “*time of flight*”, detector de tempo de voo

*m/z*: razão massa/carga que um íon apresenta

TOF-MS: espectrômetro de massas com analisador time of flight

TP: produto de transformação

TPs: produtos de transformação

$t_R$ : tempo de retenção

*UPLC*: do inglês, *Ultra Performance Liquid Chromatography*; cromatografia líquida de ultra eficiência

## RESUMO

A espectrometria de massas, acoplada ou não a outras técnicas, tem sido de grande utilidade na determinação de novos compostos, produtos de transformação/degradação, metabólitos e na quantificação em nível de traços nas mais diferentes matrizes, devido à grande versatilidade dessa técnica, especialmente em relação aos modos de análise.

Neste trabalho foi sistematizada uma metodologia para a aplicação das técnicas de espectrometria de massas na identificação de produtos de transformação/degradação de fármacos de uso humano e veterinário. Ferramentas da química computacional foram utilizadas para auxiliar na elucidação das estruturas dos compostos formados.

A metodologia foi empregada para a identificação e quantificação dos produtos de transformação/degradação da rosuvastatina, gerados durante o processo de fotocatalise heterogênea com ZnO, para a identificação dos produtos de transformação/degradação gerados durante a fotólise em meio aquoso do sulfametoxazol, ciprofloxacino e norfloxacino, e para a quantificação da amoxicilina transferida ao leite bovino. A viabilidade de se realizar a identificação de metabólitos da amoxicilina presentes no leite bovino por meio do mesmo processo de preparo de amostra e de análise utilizado para a quantificação também foi avaliada.

Foram identificados dez principais produtos de transformação/degradação da fotocatalise da rosuvastatina, dez principais produtos de transformação/degradação da fotólise em meio aquoso do sulfametoxazol, quinze principais produtos de transformação/degradação da fotólise em meio aquoso do ciprofloxacino e quinze principais produtos de transformação/degradação da fotólise em meio aquoso do norfloxacino. A metodologia empregada para a quantificação da amoxicilina em leite bovino se demonstrou adequada, mas estudos adicionais são necessários para que seja possível identificar os seus metabólitos nessa matriz.

Os resultados dos cálculos *ab initio* que foram utilizados para o estudo dos produtos de transformação/degradação da rosuvastatina e sulfametoxazol mostram que essa técnica pode ser bastante útil na elucidação estrutural dos compostos que são formados.

**Palavras-chave:** espectrometria de massas, LC-QTOF-MS/MS, química computacional, elucidação estrutural, produtos de transformação, produtos de degradação, rosuvastatina, sulfametoxazol, ciprofloxacino, norfloxacino, amoxicilina.

## ABSTRACT

Mass spectrometry, coupled or not with other techniques, is very useful for the determination of new compounds, transformation/degradation products, metabolites and quantification at trace levels in many different matrices, due to the versatility of such a technique, specially regarding to analysis modes.

In the present work a methodology was systematized for the application of mass spectrometry techniques in order to identify metabolites and transformation/degradation products for human and veterinary drugs usage. Computational chemistry tools were used to assist in the elucidation of the structure of the compounds formed during the process.

The methodology was employed for identification and quantification of rosuvastatin transformation/degradation products generated during the heterogeneous photocatalysis process with ZnO, for the identification of sulfamethoxazole, ciprofloxacin and norfloxacin transformation/degradation products generated during the photolysis in aqueous medium and for quantifying amoxicillin transferred to bovine milk. The feasibility of identification of amoxicillin metabolites present in bovine milk using the same sample preparation procedure exploited for the quantification analysis was also assessed.

Ten main transformation/degradation products of rosuvastatin photocatalysis were identified, as well as ten main transformation/degradation products of sulfamethoxazole photolysis in aqueous medium, fifteen main transformation/degradation products of ciprofloxacin photolysis in aqueous medium and fifteen main transformation/degradation products of norfloxacin photolysis in aqueous medium. The methodology applied for the bovine milk amoxicillin quantification was demonstrated to be adequate, but additional studies are needed to identify amoxicillin metabolites in the milk matrix.

The results of *ab initio* calculations utilised for the study of rosuvastatin and sulfamethoxazole transformation/degradation products show that this technique can be very useful for the structural elucidation of chemical compounds which are formed.

**Keywords:** mass spectrometry, LC-Q-TOF-MS/MS, computational chemistry, structural elucidation, transformation products, degradation products, rosuvastatin, sulfamethoxazole, ciprofloxacin, norfloxacin, amoxicillin.



## 1. INTRODUÇÃO

A espectrometria de massas (MS) é uma técnica instrumental utilizada em uma infinidade de campos do conhecimento. Devido à sua versatilidade, dinamismo e enorme potencial, o seu escopo de aplicação é constantemente ampliado. Trata-se de uma das principais técnicas instrumentais para a confirmação inequívoca da presença de uma substância em uma amostra ou para a investigação dos compostos que a constitui.

Nas análises em que as moléculas alvo são encontradas como parte de uma matriz complexa, as técnicas cromatográficas possibilitam uma separação prévia da mistura, o que facilita a identificação e quantificação dos analitos <sup>(1)</sup>. A cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), apesar de ser utilizada há décadas, necessita que os analitos sejam voláteis e que tenham estabilidade térmica, o que pode exigir procedimentos de derivatização prévia. Porém, para muitos tipos de compostos, as limitações impostas pela técnica a tornam inadequada <sup>(1)</sup>.

O surgimento de métodos de ionização compatíveis com a cromatografia líquida (LC), como a ionização por *electrospray* ESI), tornou possível o acoplamento da cromatografia líquida com a espectrometria de massas (LC-MS), o que acabou com muitas das limitações impostas pela GC-MS. O desenvolvimento de espectrômetros com analisadores de massas em *tandem* (MS/MS) fornecem valiosas informações para a elucidação da composição e estrutura de moléculas, o que torna a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em modo *tandem* (LC-MS/MS) uma poderosa ferramenta analítica com aplicações nas mais diversas áreas. Na Química Ambiental, podemos destacar as aplicações para detecção e quantificação de poluentes presentes nos solos e na água, além de contaminantes na flora e fauna. Na área da Segurança e Forense, possui vasta aplicação em testes qualitativos e quantitativos de drogas e outras substâncias ilícitas ou controladas, nas investigações de *causa mortis*, na confirmação de autenticidade de documentos e assinaturas e nos estudos de falsificação de obras de arte. Na indústria, é empregada para pesquisa e controle de qualidade da matéria prima e dos produtos. Na área da Biologia e da Saúde, é uma das técnicas de análise mais empregada em proteômica e metabolômica. É ainda, indispensável para a pesquisa de fármacos, para o estudo de biomarcadores úteis ao diagnóstico de doenças, na detecção e quantificação de contaminantes presentes em leite e outros alimentos e produtos de uso humano.

Os fármacos de uso humano são uma classe de substâncias com grande relevância ambiental, pois são importantes contaminantes das águas e dos solos e da biota. Uma das rotas de degradação desses compostos é aquela ocasionada pela radiação proveniente da luz solar, especialmente para os compostos presentes nos cursos de água superficial. O processo de fotólise pode gerar produtos de transformação que são tão ou mais tóxicos que os compostos originais. Aliado a isso, o emprego de processos oxidativos avançados para tratamento de efluentes, como o da fotocatalise, também pode gerar substâncias indesejadas <sup>(2)</sup>. Assim, a identificação dos produtos de transformação/degradação de fármacos é fundamental para se avaliar o real impacto dos contaminantes no meio ambiente e também para aprimorar os processos de tratamentos de efluentes.

Os medicamentos veterinários são outra importante categoria de contaminante dos ecossistemas. Da mesma forma que os medicamentos de uso humano, eles também são responsáveis pela contaminação das águas e dos solos. Além disso, são empregados para aumento da produção de matérias-primas destinados à indústria alimentícia. Se as boas práticas veterinárias não forem rigorosamente observadas, os produtos de origem animal poderão conter resíduos de medicamentos, o que pode ter graves implicações na saúde humana, especialmente se os limites considerados “seguros” não forem respeitados. A possibilidade de monitorar a presença e a concentração dessas substâncias nos alimentos é um bom exemplo da importância da Química Analítica para a saúde pública.

### **1.1 Objetivo Geral**

O objetivo geral do trabalho é o desenvolvimento de uma metodologia para a caracterização dos produtos de transformação/degradação, originados a partir de processos oxidativos avançados, de fármacos de uso humano e veterinário através de técnicas de espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida (LC-MS/MS), com o auxílio de técnicas da Química Computacional.

### **1.2 Objetivos Específicos**

Os objetivos específicos do trabalho são:

Estabelecer para os compostos em estudo a metodologia para análise através de cromatógrafo a líquido de alto desempenho acoplado a espectrômetro de massas em tandem com ionização por electrospray (ESI);

Identificar os produtos de transformação/degradação da rosuvastatina gerados pela fotocátalise com óxido de zinco, em meio aquoso;

Identificar os produtos de transformação/degradação do sulfametoxoxazol por fotólise direta;

Identificar os produtos de transformação/degradação do ciprofloxacino por fotólise direta;

Identificar os produtos de transformação/degradação do norfloxacino por fotólise direta;

Quantificar a transferência de amoxicilina para o leite bovino e avaliar a possibilidade de se identificar seus metabólitos;

Utilizar técnicas da Química Computacional para auxiliar na elucidação das estruturas de produtos de transformação/degradação.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Espectrometria de Massas**

A espectrometria de massas (MS) é uma técnica que fornece a razão massa/carga ( $m/z$ ) de espécies químicas, como de átomos, moléculas e agregados, desde que apresentem carga elétrica líquida diferente de zero. Os equipamentos mais modernos apresentam como principais características a altíssima sensibilidade, seletividade e exatidão <sup>(1,3,4)</sup>. Os equipamentos comerciais hoje disponíveis podem apresentar sensibilidade na ordem de zeptomols ( $10^{-21}$ ) e já existem trabalhos reportando análises na faixa de yoctomols ( $10^{-24}$ ), o que permite a detecção de analitos em amostras que contenham apenas algumas centenas dessas moléculas <sup>(5)</sup>. A seletividade e o poder de resolução da técnica permitem diferenciar espécies químicas com diferença de massa inferior à massa de um elétron (massa do elétron é de aprox.  $9,10939 \times 10^{-28}$  g). A espectrometria de massas de alta resolução permite análises com desvios de massa menores que 5 partes por milhão (ppm) com o uso de equipamentos com analisadores do tipo tempo de voo (TOF) com sistemas de reflexão de íons (tubos de voo em “V” ou

“W”). Já a espectrometria de massas de ultra-alta resolução, que emprega equipamentos como os de ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier (FT-ICR/MS), possui uma altíssima exatidão de massa e permite análises com erros de massas menores que 50 partes por bilhão <sup>(6)</sup>.

As constantes inovações tecnológicas são uma característica bastante presente no campo da espectrometria de massas. Equipamentos com fontes de ionização mais versáteis, melhorias nos analisadores e detectores, maior sensibilidade, resolução, exatidão e novas funcionalidades são frequentemente disponibilizados pelo mercado. Existem muitos tipos de espectrômetros de massas comerciais que diferem nas suas características de funcionalidades, aplicações, configurações e preços. Alguns tipos de dados só podem ser obtidos mediante o uso de um espectrômetro específico. Isso exige do usuário um conhecimento sólido das características e limitações de cada equipamento<sup>(1,3,4)</sup>.

Os espectrômetros de massas são compostos por quatro partes: fonte de ionização para atribuir cargas às espécies químicas da amostra; analisador de massas, que é o responsável pela separação dos íons com base na sua razão massa/carga ( $m/z$ ); o detector sensível aos íons que o alcançam, e a interface computacional que permite que o usuário interaja com o equipamento, além de armazenar e processar os dados das análises<sup>(1,3,4)</sup>.

É relevante destacar que os espectrômetros de massas são equipamentos de alto custo de aquisição. Os valores começam com algumas centenas de milhares de dólares para os mais simples até vários milhões de dólares para os mais sofisticados. O custo com a infraestrutura, manutenção do equipamento, insumos, softwares para tratamento de dados, contratação de pessoal qualificado para operar o equipamento e treinamentos também precisam ser considerados. A tecnologia dos espectrômetros evolui constantemente, o que gera uma depreciação relativamente rápida dos espectrômetros. Além disso, esses equipamentos são projetados para operarem continuamente. Não é raro que ocorram problemas de funcionamento caso fiquem desativados por muito tempo, por isso é importante avaliar se a demanda por análises é suficiente ou se é necessário estabelecer parcerias e associação entre diferentes grupos de pesquisa para garantir a continuidade de uso dentro do mínimo recomendável. Assim, um robusto estudo de viabilidade deve ser conduzido previamente à aquisição do equipamento.

### 2.1.1 Fonte de Ionização

A presença de carga elétrica na espécie a ser analisada é condição necessária para que a espectrometria de massas possa ser empregada. Para tanto, inúmeras técnicas já foram desenvolvidas e estão em constante aprimoramento. Algumas das principais técnicas de ionização e seus princípios estão presentes no Quadro 1 <sup>(1,3,4)</sup>.

Quadro 1 – Principais fontes de ionização utilizadas em espectrometria de massas.

Técnica	Princípio
Impacto eletrônico (EI)	Colisão de elétrons energéticos contra as moléculas para gerar espécies carregadas positivamente
Ionização química (CI)	Colisão de íons gerados a partir de um gás reagente
Dessorção/ionização por campo elétrico (FD/FI)	Elevado potencial elétrico aplicado em dispositivos pontiagudos (lâminas, filamentos) promovendo a ionização do analito
Ionização por luz síncrotron	Fótons de luz gerados em aceleradores de partículas (luz síncrotron) promovem a ionização
Ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI)	Pulsos de feixe de laser (UV) ionizam a matriz que confere carga às moléculas de analito
Bombardeamento por átomos rápidos (FAB)	Feixe de átomos inertes de alta energia
Dessorção de Plasma (PDMS)	Fragmentsos de fissão de <sup>252</sup> Cf (MeV)
Ionização por eletronebulização “electrospray” (ESI)	Campo elétrico intenso ocasiona eletronebulização que gera os íons
Ionização química à pressão atmosférica (APCI)	Íons de gás reagente e descarga corona promovem a ionização das moléculas
Ionização ambiente por sonic-spray (EASI)	Spray pneumático supersônico promove a ionização das moléculas
Plasma acoplado indutivamente (ICP)	Plasma de argônio ioniza os elementos presentes na amostra
Emissão de íons secundários (SIMS)	Feixe de íons enérgicos sobre superfícies sólidas ejeta íons secundários

Ionização térmica (TS)	Temperatura alta gera as espécies carregadas
Impacto de íons pesados (HIMS)	Feixe de íons de aceleradores de partículas

A lista de técnicas de ionização que consta no Quadro 1 não é exaustiva, uma vez que inúmeras outras fontes podem ser encontradas, inclusive comercialmente. No presente trabalho foi utilizada a técnica de ionização por eletronebulização (*electrospray ionization* - ESI), por esse motivo será dada maior atenção a ela.

### 2.1.2 Ionização por Electrospray - ESI

A técnica de ESI foi desenvolvida pelo grupo de pesquisa liderado por John Bennett Fenn, trabalho que lhe rendeu o prêmio Nobel em Química no ano de 2002 <sup>(7)</sup>.

Trata-se de uma técnica de ionização branda que gera pouquíssima fragmentação decorrente do processo de ionização, ao contrário do impacto eletrônico, por exemplo. O processo de ionização ocorre à pressão atmosférica, aplicando-se uma alta diferença de potencial entre a porção terminal do capilar pelo qual flui a amostra e o dispositivo de entrada (normalmente um cone) do espectrômetro. A nebulização pneumática e o aquecimento promovem a eliminação do solvente que, com a ação do alto campo aplicado, resulta na formação dos íons em fase gasosa <sup>(8)</sup>.

Dentre as principais características da ESI destaca-se que o processo de ionização é bastante eficiente e adequado para moléculas polares e que essa fonte de ionização pode ser facilmente acoplada a sistemas de cromatografia a líquido ou eletroforese capilar. Além disso, possibilita que moléculas não voláteis sejam transferidas para a fase gasosa, inclusive macromoléculas como proteínas, que podem ser analisadas mesmo em equipamentos com limite de  $m/z$  baixo (como 4000 ou 5000 u), pois são formadas espécies multicarregadas. Essa fonte de ionização pode gerar íons “*quasi-molecular*” carregados positivamente (geralmente  $[M + H]^+$  ou  $[M + nH]^{n+}$ ) ou negativamente (geralmente  $[M - H]^-$ ), dependendo especialmente dos grupos funcionais da molécula, do modo de análise e dos aditivos empregados. Nos sistemas acoplados com cromatógrafos utiliza-se como eluente a água e solventes miscíveis, especialmente acetonitrila e metanol. Para análises em modo positivo, isto é, que detectam espécies positivamente carregadas, emprega-se como aditivo o ácido fórmico e o ácido acético em baixas concentrações (em torno de 0,1 %). Para modo negativo, um dos principais aditivos é o hidróxido de amônio, pois ele favorece a desprotonação dos analitos em

solução. A ionização por ESI costuma ser sensível aos constituintes da matriz, especialmente a sais, pois podem ocasionar o aparecimento de adutos e podem causar supressão iônica. Os principais adutos formados são com moléculas de solventes e de espécies presentes na solução, tais como:  $\text{NH}_4^+$  (M+18),  $\text{Na}^+$  (M+23),  $\text{K}^+$  (M+39)<sup>(9)</sup>.

Logo após a descoberta que a técnica de ionização por *electrospray* pode gerar um grande feixe de íons moleculares, dois modelos para explicar o processo de ionização foram propostos: o modelo de evaporação de íon e o modelo de cargas residuais<sup>(10)</sup>. As explicações devem ser entendidas como um modelo, e como tal, elas não descrevem completamente os processos envolvidos.

Modelo de evaporação de íon: este modelo assume que as gotas da solução que contém o analito, imediatamente após a sua saída do capilar, se encolhem por evaporação até que a intensidade do campo na sua superfície seja suficientemente grande para que os íons solvatados possam ser expulsos da gotícula, conforme representado na Figura 1. A evaporação é facilitada pelo aquecimento e pelo fluxo constante de gás nitrogênio. O ganho de energia no forte campo elétrico na superfície da gotícula compensa a energia necessária para aumentar rapidamente a superfície da gota quando o íon solvatado é expelido<sup>(10)</sup>.

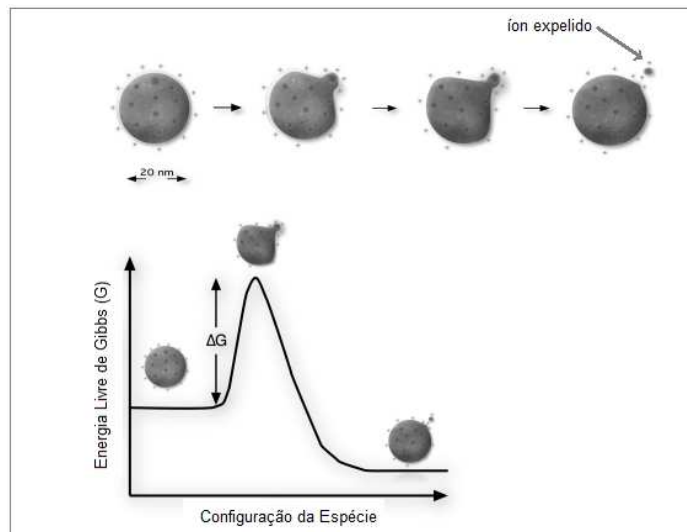


Figura 1 – Esquema do modelo de evaporação de íons<sup>(10)</sup>.

Modelo resíduo de carga: este modelo assume que o processo de *electrospray* gera gotas que apresentam apenas um íon do analito. O íon é liberado quando o solvente evapora, conforme pode ser visto na Figura 2. Uma importante característica desse modelo é que a taxa de ionização é fortemente independente do íon. A geração de

pequenas gotículas e a eficiência da evaporação do solvente é que determinam a corrente de íons, e não as suas propriedades físico-químicas <sup>(10)</sup>.

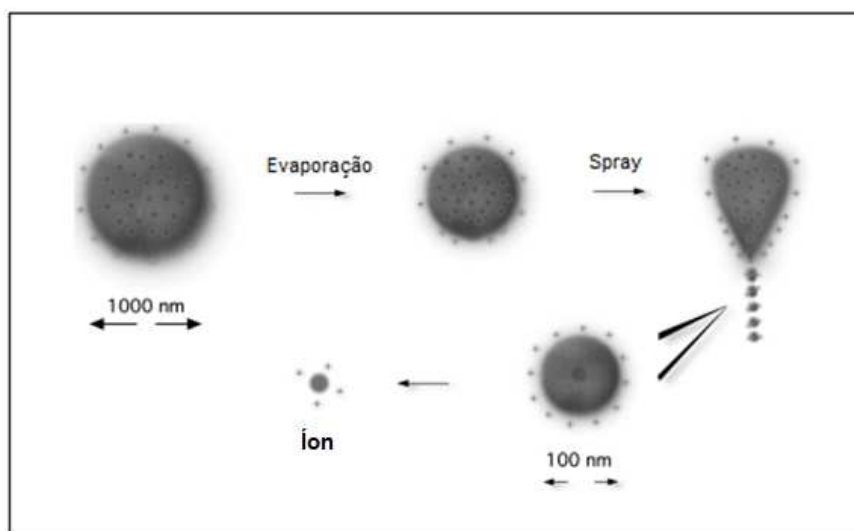


Figura 2 - Representação do modelo de resíduo de carga <sup>(10)</sup>.

O processo denominado de *electrospray*, apresentado na Figura 3, é importante no entendimento do mecanismo de ionização, independentemente de qual é o modelo de explicação mais adequado. O seu ponto de partida está baseado na dispersão do líquido. Quando aplicamos uma diferença de potencial em um líquido retido dentro de uma extremidade de um tubo capilar, esse líquido é expulso com um perfil elíptico. O formato desse perfil é aquele que conduz ao equilíbrio entre as duas forças dominantes em todos os pontos da superfície. A tensão superficial tenta puxar o líquido para dentro da extremidade do capilar com o objetivo de diminuir a área superficial. A segunda é proveniente da atração eletrostática que se aplica no sistema e faz com que o líquido seja atraído pelo contra-eletródo, ou seja, no sentido oposto ao da tensão superficial. Quando é executado um aumentando gradativo na tensão elétrica aplicada, observa-se que em um determinado valor de tensão ocorre uma mudança repentina na superfície elíptica, o que origina um cone pontiagudo que aponta no sentido em que agem as forças de Coulomb. Esse é o chamado cone de Taylor, assim denominado em função das pesquisas de Geoffrey Taylor na área. Antes da tensão limiar ser atingida, a igualdade entre as duas forças é satisfeita por um certo raio de curvatura específico no ponto de ápice da elipse formada pelo fluído. No entanto, a equação para o exato ponto do vértice, mostra que a uma determinada tensão, (a tensão que caracteriza a formação do cone de Taylor), o balanço de forças se torna independente do raio de curvatura.



Assim, teoricamente, ele pode se tornar igual a zero. Nesse momento a electronebulização (processo de *electrospray*) tem início <sup>(10)</sup>. Essa descrição do cone de Taylor é uma abordagem estática e não inclui o comportamento de nebulização. A superfície carregada com uma ponta de dimensão infinitesimal constituiria uma singularidade para o campo elétrico. Em vez disso, o líquido começa a nebulizar. A descrição explica porque as gotículas recém-geradas estão carregadas próximas ao seu limite teórico, o limite de Rayleigh. A densidade de carga na extremidade do cone sempre satisfaz a condição de que o campo elétrico apenas contrabalança a tensão de superfície para uma gota. Esta é a definição do limite de estabilidade de Rayleigh <sup>(10)</sup>.

Uma vez que as gotículas são formadas, o solvente começa a evaporar enquanto estão em voo em direção ao contra-eletrodo (cone localizado na entrada do espectrômetro). As moléculas de solvente são perdidas na forma de partículas neutras, o que conduz a um aumento na densidade do campo elétrico na superfície das gotas. Em menos de alguns microssegundos, o limite da densidade do campo é atingido e um novo cone de Taylor se forma na gotícula, o que leva a ejeção de gotículas altamente carregadas ainda menores, cujo diâmetro é aproximadamente dez vezes inferior ao da original. Esses sucessivos processos de ejeção de partículas com dimensões cada vez mais reduzidas geram uma população de gotículas muito pequenas, responsáveis pela principal fonte de íons detectáveis pelo espectrômetro de massas. Quando a gotícula não é completamente esférica, esse processo irá ocorrer no seu ponto com o menor raio de curvatura, onde a densidade do campo elétrico da superfície é mais elevada e onde o limite de Rayleigh é atingido localmente, mesmo que a gotícula em sua totalidade não o atinja. Isso explica por que ocorre a descarga das gotículas via emissão do cone de Taylor mesmo que a gotícula, considerando todo o seu volume, não tenha atingido o limite Rayleigh <sup>(10)</sup>. Em resumo, o *spray* originado do cone de Taylor gera uma dispersão muito fina de líquido sem a necessidade de uma grande evaporação prévia de solvente. Ocorre a formação de muitas gotículas com diâmetro na ordem de 200 nm ou menores.

Em relação ao tipo de mecanismo envolvido na ionização por *electrospray*, o consenso corrente é que o processo para íons moleculares grandes (algo como acima de 1000 Da) são gerados pela dessolvatação passiva a partir de nano gotículas contendo apenas um íon de analito, de acordo com o modelo de resíduo de carga. Os Íons menores podem ser gerados a partir de nano gotículas, como descrito pelo modelo de evaporação de íon <sup>(10)</sup>.

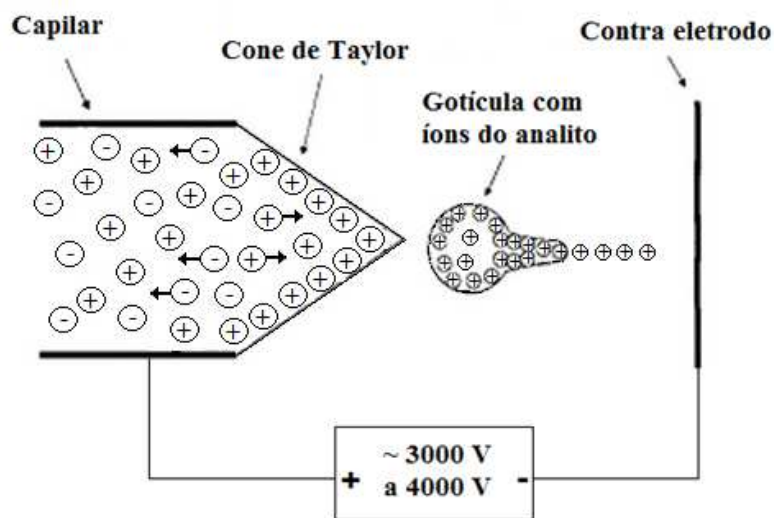


Figura 3 – Representação esquemática do processo de electrospray.

### 2.1.3 Fonte nano-ESI

As fontes de ionização padrão por *electrospray* operam a uma vazão de aproximadamente 1 mL/min. Essa vazão gera gotículas primárias com muitos microns de diâmetro, as quais contém milhares de moléculas do analito. Após algum tempo de evaporação, essas gotículas passam por processo de emissão via cone de Taylor. As gotículas secundárias geradas são de aproximadamente uma ordem de magnitude menores que as primárias e possuem uma carga já próxima ao seu limite Rayleigh. Essas gotículas podem sofrer um segundo processo de emissão por cone de Taylor, gerando, finalmente, as gotículas que contém apenas uma molécula de analito, que dão origem ao íon molecular observado. Quando a gotícula sofre um ciclo de emissão por cone de Taylor, ela perde 20 a 30% da sua carga e apenas 2% da sua massa. Considerando o mecanismo do *spray*, a maior parte da massa das gotículas secundárias é oriunda da superfície da gotícula primária. Apenas uma pequena porcentagem da massa total das gotículas primárias termina em gotículas que finalmente se tornam íons observáveis. Assim, é muito mais fácil observar as moléculas mais hidrofóbicas que se encontram na superfície da gotícula do que as moléculas hidrofílicas que se encontram distribuídas no interior. Na fonte de ionização nano-electrospray (que operam com fluxos na ordem de 300 a 600 nL/min), todo o volume de líquido é dispersado de forma que todas as moléculas do analito possam ser observadas. A fonte nano-ESI foi projetada para originar as gotículas primárias já com as características necessárias para

gerar íons observáveis ao espectrômetro, o que a torna uma das mais eficientes fontes de *electrospray*, com eficiência de ionização próxima a 100% <sup>(3, 10)</sup>. Já foram publicados trabalhos relatando a detecção de 30 zeptomols de proteína em amostras, utilizando esse tipo de fonte <sup>(5)</sup>. A desvantagem é que essa fonte é mais frágil e que requer cuidados adicionais, especialmente quando operam com capilares muito finos. Estes precisam ser substituídos com frequência, pois facilmente são danificados. Além disso, elas são mais complicadas de trabalhar. Algumas exigem ajustes de posicionamento em relação ao cone de entrada do espectrômetro e uma parametrização com ajustes precisos para se conseguir um bom *spray* e para aumentar a sensibilidade da análise <sup>(3, 10)</sup>.

#### 2.1.4 Analisadores Utilizados em Espectrometria de Massas

Os analisadores ou separadores de massas são a principal parte de um espectrômetro de massas. Eles promovem a separação das espécies carregadas em função da sua razão entre massa e carga ( $m/z$ ). Os principais analisadores de massas e suas características são apresentados no Quadro 2.

Quadro 2 – Principais analisadores utilizados em espectrometria de massas <sup>(3)</sup>.

Analisador de massas	Faixa de Resolução	Faixa de Exatidão típica (erro em ppm)	Limite superior de massa (Da)
Setor magnético Campo magnético simples	Baixa 1000 ou menor	~1.000	10.000 a 20.000
Setor magnético Focalização dupla	Alta (60.000 a 100.000)	5	10.000 a 20.000
Quadrupolo	Baixa – aproximadamente 2000- 4000	< 100	~4.000 a 5.000
Analisador <i>ion-trap</i>	De baixa a alta, dependendo do tipo de <i>ion-trap</i>	~ 100	~ 5.000 a 6.000
Analisador TOF ( <i>time-of-flight</i> ) - linear	Baixa 4000 a 5000	100 a 200	500.000 a 1.000.000
Analisador TOF ( <i>time-of-flight</i> ) - Em V, W	Alta 30000	5	~ 5.000 a 10.000
Analisador TOF em espiral	Alta 50.000 ou mais	~2	~ 5.000
Orbitrap	Alta 60.000-100.000 ou maior, depende da configuração	~1 a 3 ou menor	~ 50.000
Ressonância ciclotrônica	Altíssima 1.000.000 ou melhor	~1 ou menor	~ 30.000 a 50.000

A exatidão, resolução e faixa de massas variam em função da tecnologia e do conjunto formado com os demais componentes do sistema, como lentes, detector e eletrônica, porém o analisador de massas é determinante na qualidade dos resultados de análise.

A resolução de um espectrômetro de massas indica a sua capacidade em separar dois valores de massas adjacentes, quanto maior a resolução, maior essa capacidade. A Figura 4 traz a comparação entre um pico gerado por dois espectrômetros com diferentes resoluções, sendo que o pico 1 se refere a um equipamento com resolução inferior àquele que gerou os picos identificados com o número 2.

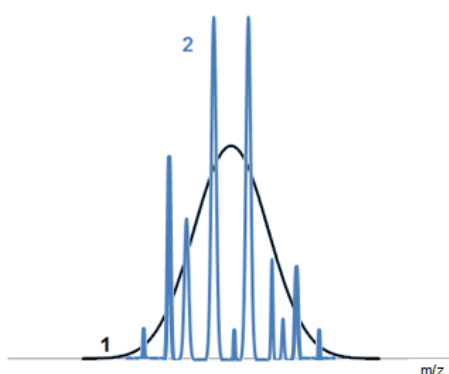


Figura 4 – Representação esquemática de picos com diferentes resoluções.

A exatidão é o parâmetro que indica o grau de conformidade do valor de  $m/z$  medido com o valor de verdadeiro <sup>(3)</sup>. Através da sua análise sabemos qual é a expectativa de erro de  $m/z$  máximo aceitável para análise com o equipamento. Outros parâmetros da análise como sensibilidade, linearidade, repetibilidade e reprodutibilidade dependem também de outros dispositivos utilizados no equipamento, como qualidade do sistema elétrico e eletrônico, entre outros.

Os analisadores quadrupolar, também chamados de quadrupolos, são os tipos mais comuns, devido ao seu *design* compacto, baixo tempo de varredura (na ordem de 100 ms) e menor preço em comparação a outros analisadores. São compostos por dois pares de hastes metálicas, normalmente cilíndricas. Um desses conjuntos é submetido a um potencial elétrico positivo, enquanto o outro, a um negativo. A cada conjunto é aplicada uma tensão de corrente contínua (DC) em combinação com uma tensão de corrente alternada (também chamada de potencial de radiofrequência alternante – RF).

O par positivo de hastes age como filtro para os íons com  $m/z$  acima do valor da faixa determinada para a análise, enquanto que o outro par, como filtro para os íons com  $m/z$  menor do valor da faixa. Para uma dada amplitude de tensão DC e RF, apenas os íons com uma razão  $m/z$  específica serão ressonantes e irão adquirir uma trajetória estável que os conduzem de uma extremidade a outra do quadrupolo. Os íons não ressonantes são desestabilizados e atingem as hastes ou são retirados pelo sistema de vácuo<sup>(1, 3, 4)</sup>.

A Figura 5 apresenta uma representação esquemática de um analisador de massas do tipo quadrupolo.

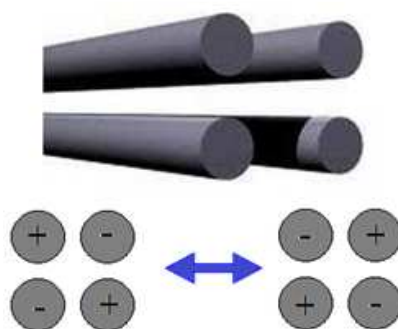


Figura 5 – Representação esquemática de um quadrupolo de hastes cilíndricas e de sua polarização.

O desempenho (por exemplo, a habilidade de separar duas massas adjacentes através de uma faixa determinada) de um quadrupolo depende da sua geometria, da eletrônica, das voltagens que se parametriza e da sua qualidade da manufatura. Os quadrupolos podem ser usados em dois modos principais: em modo SIM (do inglês, *single ion monitoring*) ou em modo SCAN. No modo SIM, os parâmetros (amplitude da DC e RF) são ajustados para se detectar apenas um único íon específico ou um conjunto de íons com valores de  $m/z$  pré-estabelecidos. Esse modo de análise fornece maior sensibilidade para usuários interessados em moléculas alvo, uma vez que um maior tempo pode ser destinado para a sua seleção e separação. No modo SCAN, a amplitude das voltagens DC e RF é alterada segundo uma rampa (enquanto se mantém a razão RF/DC constante) para obter o espectro de massas de todas as espécies presentes em uma certa faixa de  $m/z$ .

O analisador de massas baseado no tempo de voo dos íons (TOF, do inglês *Time-of-Flight*) teve seu conceito teórico desenvolvido especialmente por William E.

Stephens nos anos 1940 <sup>(11)</sup>. Porém, apenas nos anos 1980 surgiu o interesse comercial por esse analisador de massas, em vista das suas aplicações para macromoléculas <sup>(11)</sup>.

O TOF é um analisador de massas simples e robusto, compatível com diversas fontes de ionização e que opera em ampla faixa de  $m/z$ . O princípio de operação de um espectrômetro de massas com analisador de tempo de voo (TOF-MS) basicamente envolve a medida do tempo que um íon leva para atravessar o tubo de voo até se chocar com o detector. Os íons formados na fonte de ionização são conduzidos até a entrada do TOF onde podem, dependendo do equipamento, ser acumulados por um curtíssimo espaço de tempo (na ordem de alguns microssegundos). Um pulso de alta voltagem acelera muito rapidamente os íons em direção ao detector. Como eles possuem diferentes razões  $m/z$ , serão progressivamente separados em grupos de acordo com sua velocidade (e, portanto, segundo a razão  $m/z$ ) à medida que atravessam o tubo de voo. Os íons colidem sequencialmente no detector em ordem crescente do valor da razão  $m/z$ , gerando pulsos elétricos que são computados. A razão  $m/z$  é calculada com base no tempo, registrado por um controlador, entre o momento que é dado o pulso que acelera o íon, até o momento da sua colisão no detector.

Existem duas categorias de analisadores TOF: os lineares e os dotados de refletores (*reflectrons*) de íons. Os lineares possuem a vantagem de praticamente não apresentar limite máximo para a razão  $m/z$ . Porém, em muitos equipamentos o limite superior está situado entre 500.000 a 1.000.000 daltons. O principal problema desse tipo de analisador é a baixa resolução, pois ela é afetada por fatores que alteram a distribuição de energia dos íons. Espécies com mesmo  $m/z$  podem adquirir diferentes quantidades de energia, especialmente durante o processo de ionização da amostra. Outro fator relevante está relacionado com a variação de energia cinética dos íons quando ocorre o pulso que os introduz no tubo de voo. No momento que ocorre o pulso de aceleração na entrada do TOF, os íons acumulados podem apresentar uma distribuição variada na quantidade, na direção e no sentido do seu movimento translacional, o que resulta em diferentes valores de velocidade durante o voo através do tubo, mesmo para espécies com mesmo  $m/z$  <sup>(1, 3, 4)</sup>. Esse problema é minimizado pelo segundo grupo de analisadores TOF, os não-lineares com refletores de íons. Esses instrumentos possuem alta resolução e fornecem resultados de  $m/z$  com exatidão de 5 partes por milhão (ppm) ou maior. O principal ganho do refletor (presente no esquema mostrado na Figura 6) é corrigir pequenas diferenças na energia cinética que íons com uma mesma razão  $m/z$  possam apresentar. O chamado refletor é constituído por um

arranjo de grades que geram um campo elétrico que irá refletir os íons, o que resulta em uma trajetória curva para os mesmos. Para íons com um mesmo  $m/z$ , aqueles com maior velocidade penetram mais no campo elétrico gerado no refletor, o que implica que percorrerão uma trajetória maior daquela dos íons com menor velocidade. O resultado final é a correção nos tempos de voo, fazendo com que íons de mesmo  $m/z$  colidam no detector com uma dispersão bem menor daquela que ocorre nos tubos de voo linear<sup>(1,3,4)</sup>.

### 2.1.5 Analisadores de Massas em Tandem

A espectrometria de massas em *tandem* permite executar análises denominadas de  $MS^n$ , em que, normalmente,  $n$  é igual a dois (análise MS/MS) ou menos comumente, três (MS/MS/MS). Mais raros são os experimentos com  $n$  maior do que três. A principal característica dos espectrômetros em *tandem* é que eles possuem analisadores de massa em série, como, por exemplo, nos equipamentos denominados triplo-quadrupolo e Q-TOF. O primeiro tipo possui três quadrupolos em série, sendo que o segundo analisador, que também pode ser um hexapolo, funciona como uma câmara de colisão responsável por fragmentar íons. O segundo tipo de equipamento, esquematizado na Figura 6, possui um quadrupolo como primeiro analisador de massas. O segundo analisador normalmente é outro quadrupolo ou um hexapolo. Ele funciona como câmara de colisão nas análises MS/MS ou como condutor de íons para o terceiro analisador nas análises MS. O terceiro analisador de massas é um TOF. A espectrometria de massas em *tandem* possui inúmeras vantagens em relação à espectrometria de massas MS. Ela permite obter valores da razão  $m/z$  tanto do íon precursor, quanto dos seus fragmentos, o que fornece informações estruturais sobre o íon precursor<sup>(1, 3, 4)</sup>.

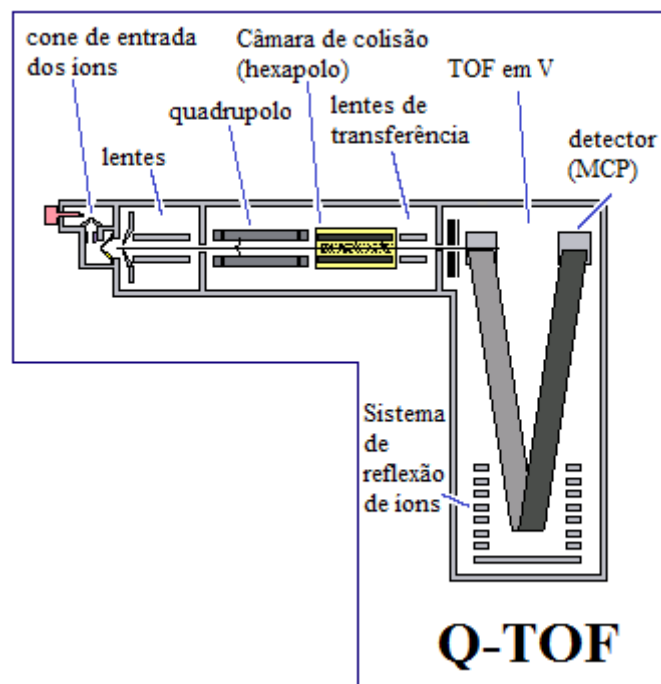


Figura 6 – Representação esquemática do espectrômetro híbrido do tipo Q-TOF.

(adaptação do manual do usuário do Q-TOF da Waters)

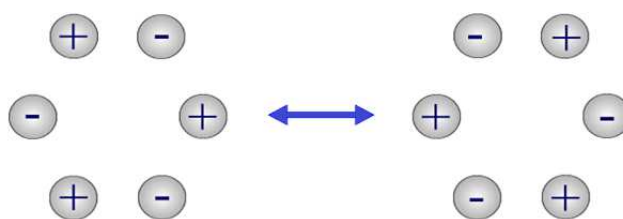
### 2.1.6 Sistema de Fragmentação de Íons por CID

A dissociação induzida por colisão (CID, do inglês: *Collision Induced Dissociation*) é o método de fragmentação de íons mais utilizado em espectrometria de massas para análises em que se utilizam analisadores em *tandem* (análise MS/MS). O princípio da técnica está baseado na aceleração dos íons antes da sua entrada na câmara de colisão (normalmente um quadrupolo ou hexapolo) que possui em seu interior um gás inerte, como argônio, xenônio e criptônio, para CID de baixa energia, e hélio ou nitrogênio para CID de alta energia. Na colisão, parte da energia translacional é convertida em energia interna, o que induz a fragmentação dos íons.<sup>(12)</sup> A análise dos fragmentos gerados (também chamados de íons filhos) a partir de um íon previamente selecionado (denominado de íon pai) permite obter informações estruturais do íon de origem.

De forma resumida, o processo ocorre da seguinte maneira: um íon é selecionado no primeiro analisador de massas com base em algum critério informado, como intensidade, valor de  $m/z$  pré-estabelecido, presença de certos fragmentos ou perda de um fragmento com massa pré-estabelecida. Os demais íons que não atendem ao critério são eliminados do sistema pelas bombas de vácuo ou pela colisão com



componentes do analisador, como as hastes que formam os quadrupolos. Este íon selecionado é acelerado (com base em um valor de energia que é parametrizado pelo usuário) e conduzido até a câmara de colisão. Os hexapolos, apresentados esquematicamente na Figura 7, são bastante utilizados como câmara de colisão para colisões de baixa energia (na ordem de algumas dezenas ou poucas centenas de eV), tendo em vista que permitem desacelerar os íons mais rapidamente e acelerá-los mais lentamente, resultando em uma distribuição de energia menor dos íons na entrada do próximo analisador de massas, o que aumenta a resolução e a sensibilidade do equipamento.



A oscilação entre os dois estágios acima é na ordem de 800.000 vezes por segundo

Figura 7 – Esquema de um hexapolo.

(adaptação do manual do usuário do Q-TOF da Waters)

No interior do hexapolo, os íons sofrem colisão com um gás inerte. A colisão gera *fragmentos* que são conduzidos ao próximo analisador de massas, onde são separados pela razão  $m/z$  para posterior detecção.

Os espectros de fragmentação CID obtidos através de colisões de alta energia (na ordem de keV) resultam em espectros melhor reproduzíveis e normalmente com menor rearranjo, o que torna mais simples a interpretação do que quando obtidos em colisões de baixa energia (na ordem de dezenas ou algumas centenas de eV). Porém, esse modo só é possível em equipamentos dotados de setor magnético ou TOF que possuam a capacidade de fornecer aos íons a alta energia translacional necessária para esse tipo de fragmentação de moléculas <sup>(3)</sup>. A técnica consiste na introdução do gás no interior da célula de colisão como um feixe perpendicular ao feixe de íons acelerados por um potencial de alguns quilovolts. Esse feixe de gás de colisão é direcionado para uma saída onde uma bomba de vácuo os retira para preservar o vácuo do sistema <sup>(3)</sup>.

### 2.1.7 Modos de Análise

Há várias formas de se conduzir uma análise por técnicas de espectrometria de massas. As mais comuns são apresentadas abaixo.

Modo *full scan*: pode ser executada por equipamentos dotados de um único analisador ou equipamentos em *tandem*. É feita a aquisição do valores de  $m/z$  de todos os íons dentro de certo intervalo de  $m/z$  pré-estabelecido (como por exemplo, entre 100 e 500 daltons). Não ocorre fragmentação dos íons na câmara de colisão. O primeiro analisador “filtra” os íons conforme a faixa pré-estabelecida e promove uma separação inicial dos íons. O segundo analisador (se presente), que normalmente funciona como câmara de colisão, tem como principal função conduzir os íons do primeiro para o terceiro analisador, além de desagregar, via colisão de baixa energia (na ordem algumas unidades de eV, como 3 eV ou 5 eV) com o gás inerte presente no seu interior, complexos de espécies que eventualmente se formem por algum tipo de interação entre duas ou mais espécies não ligadas quimicamente. O terceiro analisador (se presente) separa os íons com base na sua razão  $m/z$ , normalmente de maneira mais eficaz e eficiente daquela que ocorre no primeiro analisador, especialmente se esse terceiro for um analisador de alta resolução. Com esse modo de análise temos a informação do perfil de todos os íons presentes na amostra dentro do intervalo de  $m/z$  que foi definido pelo usuário.

Modo SIM (do inglês, *selected ion monitoring*): modo possível em equipamentos dotados de um ou mais analisadores. Nesse modo o operador especifica uma faixa estreita de massa para avaliar, tipicamente uma unidade de  $m/z$ . Essa análise possui maior sensibilidade em relação ao *full scan*. Opta-se por esse método de análise quando já se tem um alvo específico (íon com  $m/z$  conhecido) para monitorar. Esse tipo de análise pode ser particularmente interessante para amostras com matrizes complexas ou com concentrações bastante reduzidas.

Modo *product ion scan*: nesse modo, possível em equipamentos em *tandem*, o primeiro analisador seleciona os íons com um valor  $m/z$  bem estabelecido. Os íons são enviados à câmara de colisão onde sofrem choques com o gás inerte, gerando fragmentos do íon precursor. Os fragmentos gerados são conduzidos ao terceiro analisador onde são separados e depois levados ao detector. Dessa forma, obtemos o espectro MS/MS dos íons, o que nos dá informações estruturais importantes. Alguns equipamentos dotados de apenas um analisador de massas são capazes de realizar uma análise similar. Porém, existem algumas diferenças importantes, pois os íons são fragmentados diretamente na fonte, ou seja, logo na entrada do espectrômetro, o que não garante que todos os

fragmentos gerados sejam oriundos de íons precursores com a mesma razão  $m/z$ . Essa funcionalidade é especialmente útil para amostras com um único analito e com elevado grau de pureza ou para amostras com uma separação prévia de analitos muito boa. Caso a amostra contenha impurezas em concentrações significativas que coeluem com o analito, a fragmentação na fonte conduzirá a uma mistura de fragmentos oriundos de diversas moléculas, o que restringe bastante a utilidade dos dados obtidos.

Modo precursor íon scan: modo de análise possível em equipamentos em *tandem* que informa quais são os íons que geram um fragmento MS/MS de interesse. O primeiro analisador separa íons presentes na amostra com base na razão  $m/z$  do mesmos e os conduz à câmara de colisão. Após o choque com o gás inerte, os fragmentos são enviados ao próximo analisador que separa os íons e os conduz ao detector para que o mesmo registre o sinal apenas quando é atingido por um íon MS/MS com o valor de  $m/z$  pré-estabelecido pelo operador.

Modo MRM (do inglês, *multiple reaction monitoring*): este modo está disponível em equipamentos em *tandem*. É muito usado para diagnosticar se um determinado composto está ou não presente em uma amostra e também com o objetivo de quantificação. Esse modo de análise é particularmente útil para amostras com matrizes complexas, pois apresenta grande seletividade. Nesse modo de análise, informa-se ao espectrômetro uma lista prévia dos íons de interesse para que seja feita a fragmentação MS/MS. Para cada um desses íons, informa-se ainda um ou mais fragmentos MS/MS, chamados de transição, que deverão ser selecionados no último analisador de massas e conduzidos até o detector. Dessa forma, somente gerarão sinal no detector aqueles íons que atenderem ao critério de  $m/z$  estabelecido para o primeiro analisador de massas e que também originem na câmara de colisão algum dos fragmentos pré-definidos. Isso impede que se registrem eventuais íons que tenham um valor de  $m/z$  idêntico ou muito próximo àqueles definidos como íon precursor, mas que não venham a gerar na câmara de colisão os fragmentos pré-estabelecidos. Se eles não geram os fragmentos MS/MS que se está monitorando, não se trata do íon precursor de interesse. De forma resumida, os analisadores de massas no modo MRM desempenham as seguintes tarefas: o primeiro quadrupolo (Q1) é configurado para transmitir apenas compostos com a razão  $m/z$  constante na lista. O segundo analisador (Q2/câmara de colisão) gera os fragmentos após a colisão do íon precursor com o gás inerte. O terceiro quadrupolo (Q3) é configurado para transmitir ao detector apenas um ou dois fragmentos com uma

determinada razão massa/carga (como por exemplo,  $m/z = 181,1 \pm 0,3$  e  $m/z = 190,5 \pm 0,3$ ).

Modo SRM (do inglês, *selected reaction monitoring*): esse modo corresponde praticamente ao MRM, tanto é que alguns muitas vezes nem é feita a distinção entre os termos. A diferença é que no SRM se monitora apenas um único íon precursor, o que confere grande sensibilidade à análise.

Modo *neutral loss*: modo de análise presente em diversos equipamentos em *tandem*. Os analisadores operam de forma sincronizada. O primeiro analisador realiza uma varredura para cada valor  $m/z$  e os envia à câmara de colisão. Na sequência e de forma sincronizada, o terceiro analisador realiza a mesma varredura que ocorre no primeiro, porém com uma diferença de  $m/z$  que corresponde a uma diminuição de massa do valor especificado pelo operador. Por exemplo, enquanto o primeiro analisador separa e transmite o íon com  $m/z$  de 400, o terceiro analisador separa os íons gerados na câmara de colisão e transmite ao detector apenas os fragmentos com  $m/z$  de 382, caso estejamos interessados em saber se algum íon da amostra esteja perdendo um fragmento neutro na forma de uma molécula de água (18 daltons) quando submetido ao processo de CID.

Modo  $MS^E$ : esse modo de análise é possível em alguns equipamentos mais modernos, pois a tecnologia é recente. Durante a aquisição de dados a energia de colisão é dinamicamente alterada entre um baixo e um alto valor. Isso produz de forma alternada espectros de massa dos íons intactos e os respectivos espectros de fragmentação de todos os íons precursores, além de perdas neutras. Todas essas informações são adquiridas em uma única análise <sup>(13)</sup>. Um possível problema em relação ao uso do modo  $MS^E$  é a coeluição de íons. Se a separação não é efetiva, dois ou mais íons poderão ser fragmentados ao mesmo tempo, o que acarretará em um espectro de fragmentação complexo que conterà informações de mais de um tipo de íon, dificultando a interpretação do espectro.

### 2.1.8 Detectores

O detector é o componente que possui a capacidade de responder e registrar as espécies eletricamente carregadas que lhe são enviadas. O estímulo recebido pelo detector pode ser ampliado antes que o sinal seja encaminhado ao sistema de processamento de dados. Os equipamentos do tipo ressonância ciclotrônica e orbitrap têm a detecção baseada na corrente induzida pelo movimento dos os íons no analisador.

Ou seja, a detecção ocorre durante o processo de separação das espécies com diferentes razões  $m/z$ . Para os demais equipamentos, os detectores mais comuns são as fotomultiplicadoras e, em especial, o multiplicador de elétrons <sup>(3)</sup>.

Fotomultiplicadoras são dispositivos que transformam fótons em corrente elétrica mensurável. No multiplicador de elétrons, os íons colidem com a entrada do detector. Essa colisão resulta tipicamente na ejeção de outros 2 ou 3 elétrons secundários que são acelerados por uma diferença de potencial. Os elétrons secundários colidem com a parede interna do detector, produzindo elétrons adicionais a cada colisão. Dessa forma, a colisão de um íon com a entrada do detector resulta em uma corrente de elétrons mensurável, gerando o sinal que será enviado ao sistema de processamento de dados.

Muitos equipamentos possuem como detector um dispositivo denominado MCP - detector de placa de microcanais (MCP, do inglês Micro Channel Plate), representado esquematicamente do lado esquerdo da Figura 8 e através de uma fotografia (lado direito). O dispositivo é formado por um conjunto de milhares ou até milhões de multiplicadores de elétrons em miniatura, dispostos paralelamente entre si. A Figura 9 apresenta um esquema de como um microcanal registra a chegada de um íon. O MCP é utilizado em equipamentos com analisadores do tipo TOF, tendo resposta extremamente rápida, além de alta sensibilidade.

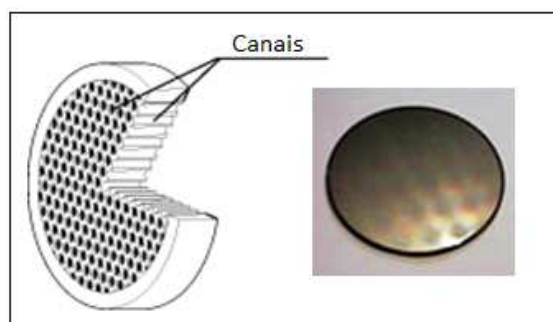


Figura 8 – Detector de placa de microcanais (MCP, do inglês micro channel plate).

(adaptação do manual do usuário do Q-TOF da Waters)

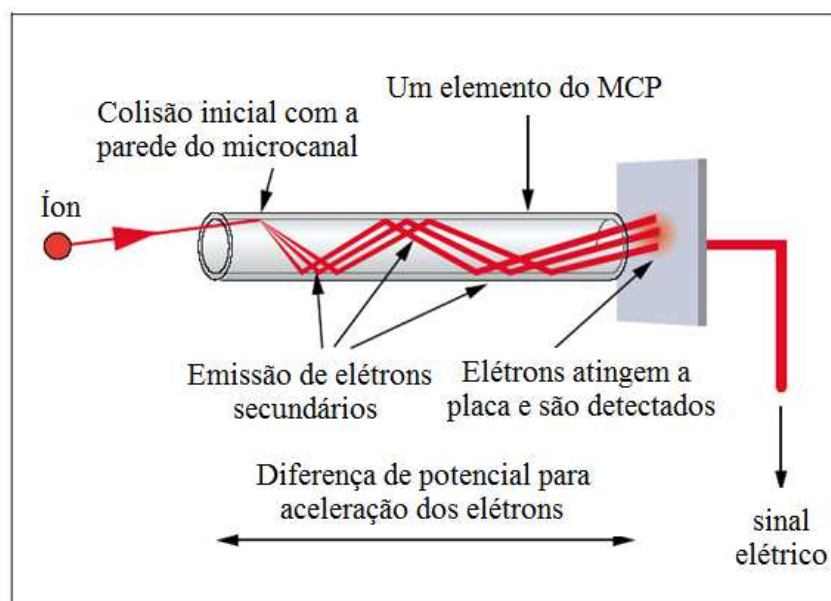


Figura 9 – Representação de um microcanal presente no detector do tipo MCP.

(adaptação do manual do usuário do Q-TOF da Waters)

## 2.2 Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas

A combinação da cromatografia líquida com a espectrometria de massas (LC-MS) permite a identificação inequívoca e quantificação de substâncias em concentração ao nível de traços e ultra-traços, tais como fármacos em matrizes biológicas, como sangue, fluidos corporais, tecidos, urina, além de alimentos, como mel, ovos, leite e produtos cárneos. A técnica é particularmente útil para confirmar a presença de substâncias controladas ou proibidas, o que requer limites de detecção mais baixos possíveis<sup>(14)</sup>. O acoplamento é especialmente vantajoso quando são analisadas matrizes complexas ou amostras com muitos analitos. A técnica LC-Q-TOF permite a separação prévia dos componentes de uma mistura, de forma que cada analito possa ser introduzido no espectrômetro e submetido à análise MS/MS sem que haja a perda de informações das demais substâncias de interesse que estiverem presentes na amostra. Para fins de elucidação estrutural de moléculas, o Q-TOF de alta resolução é bastante útil, pois fornece resultados com erros no valor de  $m/z$  inferior a 5 ppm para a análise MS. Para análise MS/MS, pode-se perder um pouco de exatidão, mas também é possível se obter erros inferiores a 5 ppm, dependendo do equipamento e da qualidade da curva de calibração<sup>(3)</sup>.

### 2.3 Índice de Deficiência de Hidrogênios

O índice de deficiência de hidrogênios (IDH) também é chamado de RDBE (do inglês, *rings double-bond equivalents*) ou DBE (do inglês, *double bonds equivalents*). O valor de RDBE indica o grau de instauração da molécula, ou a sua deficiência de hidrogênio. É um parâmetro bastante útil na determinação de estruturas de moléculas. O valor de RDBE nos informa o somatório do número total de anéis e número de ligações  $\pi$  presentes. De maneira simplificada, para cada insaturação ou anel presente na molécula soma-se uma unidade ao valor de RDBE, que pode ser calculado pela seguinte equação.

$$RDBE = C - \frac{H}{2} - \frac{X}{2} + \frac{N+P}{2} + 1 \quad (1)$$

Em que:

C = número de carbonos do composto;

H = número de hidrogênios do composto;

X = número de átomos de halogênio do composto;

N = número de átomos de nitrogênio do composto;

P = número de átomos de fósforo do composto.

Átomos divalentes como oxigênio e enxofre não contribuem para o valor de RDBE. Cabe salientar que a equação considera a valência mais comum do elemento, o que pode gerar divergência do valor verdadeiro RDBE com o valor calculado. Os elementos nitrogênio e fósforo podem assumir valência igual a três ou cinco e os átomos de enxofre podem ter valência dois, quatro ou seis. Para moléculas que contenham algum desses três átomos em diferentes combinações de valência, a utilização da fórmula para o cálculo do RDBE fica comprometida. Íons e espécies radicalares com número ímpar de elétrons conduzem a um valor de RDBE igual a  $n + 0,5$ , em que “n” é um número inteiro <sup>(15)</sup>.

### 2.4 Distribuição Isotópica

A maioria dos elementos químicos possui mais de um isótopo estável. O padrão de distribuição isotópica muitas vezes pode ser empregado como ferramenta para facilitar a elucidação da estrutura de uma molécula com composição desconhecida. No caso dos compostos orgânicos, os elementos constituintes mais comuns são o carbono,

hidrogênio, oxigênio, nitrogênio. Em proporção um pouco menor estão o enxofre, fósforo e halogênios. O quadro 3 apresenta as distribuições de massa e a abundância isotópica de alguns elementos químicos comuns em compostos orgânicos.

Quadro 3 – Informações sobre a composição isotópica de alguns elementos químicos<sup>(16)</sup>.

Elemento	Número de massa (A)	Intervalo das variações naturais (fração molar)	Melhor medida de uma fonte terrestre única (fração molar)	Composição isotópica representativa (fração molar)
<sup>1</sup> H	1	0,999816–0,999974	0,99984426	0,999885
<sup>2</sup> H	2	0,000026–0,000184	0,00015574	0,000115
<sup>12</sup> C	12	0,98853–0,99037	0,988922	0,9893
<sup>13</sup> C	13	0,00963–0,01147	0,011078	0,0107
<sup>14</sup> N	14	0,99579–0,99654	0,996337	0,99636
<sup>15</sup> N	15	0,00346–0,00421	0,003663	0,00364
<sup>16</sup> O	16	0,99738–0,99776	0,9976206	0,99757
<sup>17</sup> O	17	0,00037–0,00040	0,0003790	0,00038
<sup>18</sup> O	18	0,00188–0,00222	0,0020004	0,00205
<sup>31</sup> P	31	-----	1	1
<sup>32</sup> S	32	0,94454–0,95281	0,9504074	0,9499
<sup>33</sup> S	33	0,00730–0,00793	0,0074869	0,0075
<sup>34</sup> S	34	0,03976–0,04734	0,0419599	0,0425
<sup>36</sup> S	36	0,00013–0,00019	0,00014579	0,0001
<sup>35</sup> Cl	35	0,75644–0,75923	0,75771	0,7576
<sup>37</sup> Cl	37	0,24077–0,24356	0,24229	0,2424
<sup>79</sup> Br	79	-----	0,50686	0,5069
<sup>81</sup> Br	81	-----	0,49314	0,4931
Ca	40	0,96933–0,96947	0,96941	0,96941
Ca	42	0,00646–0,006648	0,00647	0,00647
Ca	43	0,00135–0,00135	0,00135	0,00135
Ca	44	0,02082–0,02092	0,02086	0,02086
Ca	46	0,00004–0,00004	0,00004	0,00004
Ca	48	0,00186–0,00188	0,00187	0,00187
Zn	64	-----	0,491704	0,4917
Zn	66	-----	0,27731	0,2773



Zn	67	-----	0,040401	0,0404
Zn	68	-----	0,184483	0,1845
Zn	70	-----	0,006106	0,0061

O padrão de distribuição isotópica do espectro de massas pode facilitar bastante a tarefa de concluir sobre a presença ou ausência de alguns átomos, como o cloro, bromo e enxofre em uma molécula com constituintes desconhecidos, pois possuem um padrão bem característico, conforme pode ser observado nas Figuras 10, 11, 12 e 13. Quando o espectro de massas MS de uma espécie monocarregada apresentar dois picos com intensidades semelhantes e com diferença de  $m/z$  de aproximadamente duas unidades, deve-se considerar a possibilidade de existir um átomo de bromo na sua constituição (Figura 10). À medida que aumentamos o número de átomos de bromo aparecem outros picos e a intensidade relativa é alterada, conforme pode ser visto na Figura 11, em que se apresenta o espectro de massas da espécie monocarregada  $\text{Br}_2$ . Da mesma forma, se essa mesma diferença de duas unidades de  $m/z$  estiver presente em uma espécie monocarregada, mas se o primeiro pico apresentar uma intensidade aproximadamente 3 vezes superior a do pico com  $m/z$  com duas unidades adicionais de massa, deve-se considerar a presença do cloro, conforme pode ser visto na Figura 12.

Em um espectro de massas de uma espécie monocarregada, a diferença de duas unidades entre dois picos também pode indicar a presença do átomo de enxofre. Nesse caso, a intensidade do pico com duas unidades adicionais de  $m/z$  é na ordem de 4% do seu correspondente. O espectro de massa teórico do enxofre é apresentado na Figura 13. Na Figura 14 é apresentado o espectro teórico de um composto  $[\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_3\text{S} + \text{H}]^+$  que contém o enxofre em sua constituição, onde se observa que o pico referente ao composto com um átomo  $^{34}\text{S}$  em sua constituição ( $m/z$  256,055) possui intensidade relativa de aproximadamente de 4,4%. Na Figura 15 é apresentado o espectro de massas teórico da espécie monocarregada  $\text{CH}_3\text{SH}$ . Pode-se observar que o pico em  $m/z$  48 Da é constituído por  $^{12}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$  e  $^{32}\text{S}$ . O pico próximo a 49 Da é constituído por  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$  e  $^{32}\text{S}$ . Já o pico próximo a 50 Da é constituído por  $^{12}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$  e  $^{34}\text{S}$ .

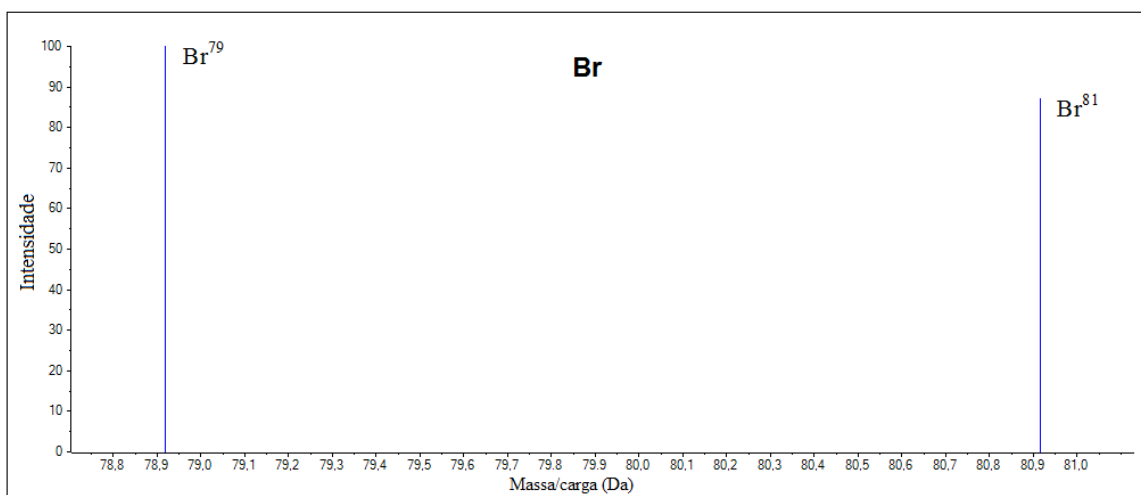


Figura 10 – Espectro teórico da espécie  $[\text{Br}]^+$  e a composição isotópica dos picos.

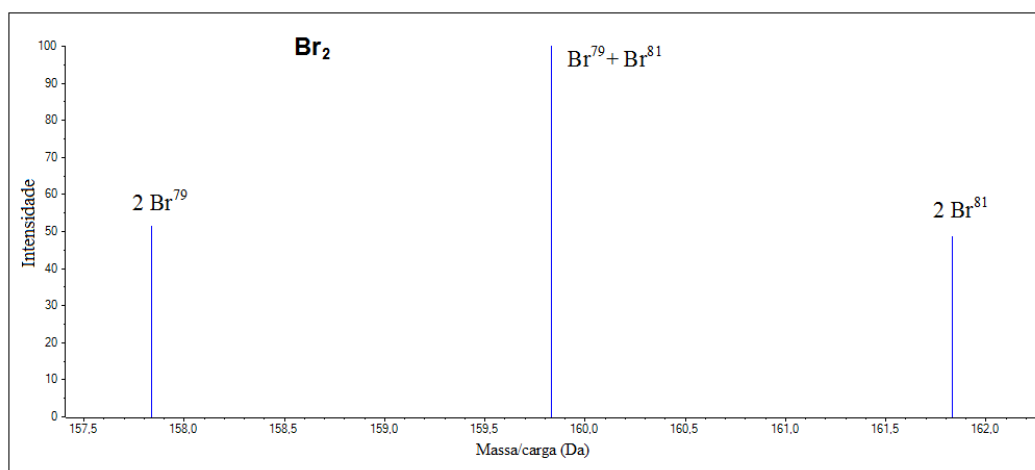


Figura 11 – Espectro teórico da espécie  $[\text{Br}_2]^+$  e a composição isotópica dos picos.

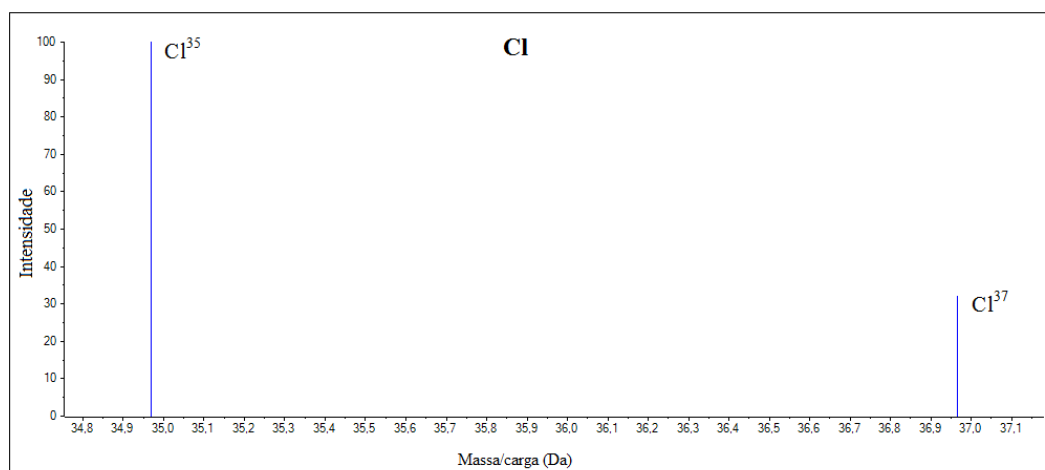


Figura 12 – Espectro teórico da espécie  $[\text{Cl}]^+$  e a composição isotópica dos picos.

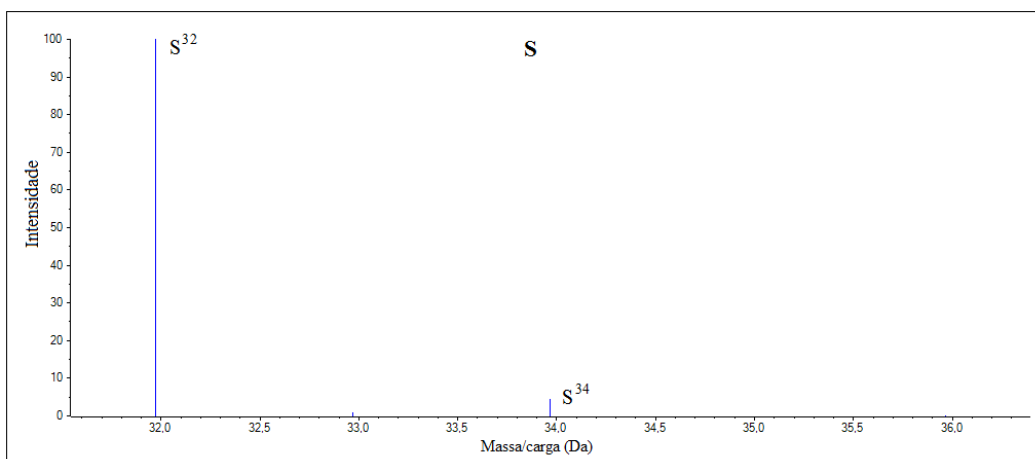


Figura 13 – Espectro teórico da espécie  $[S]^+$  e a composição isotópica dos picos.

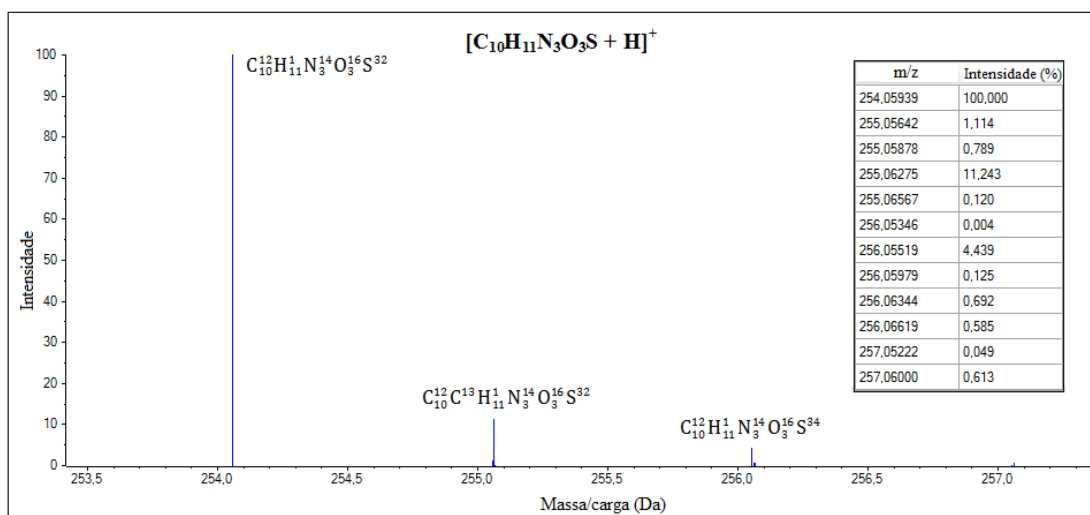


Figura 14 – Espectro teórico da espécie  $[C_{10}H_{11}N_3O_3S + H]^+$  com a composição isotópica dos picos e a sua intensidade relativa.

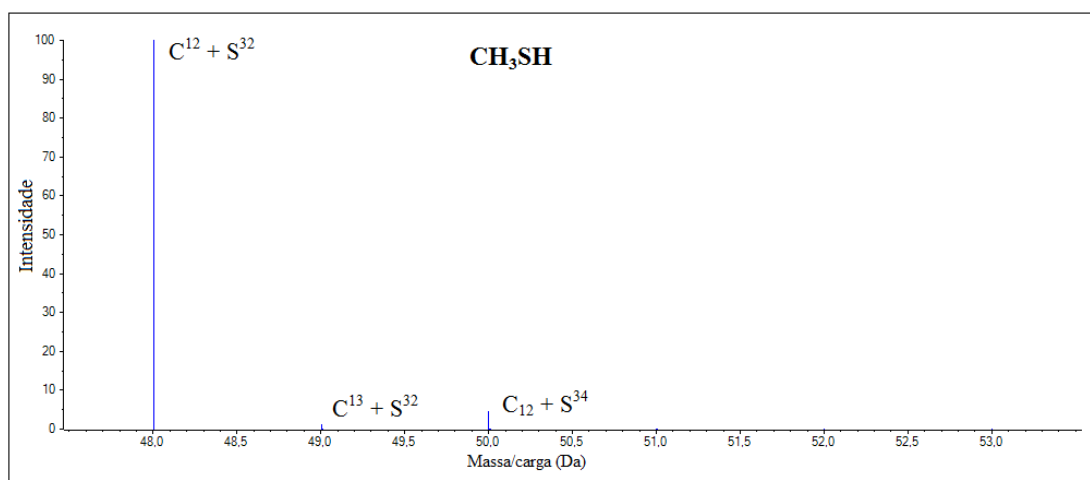


Figura 15 – Espectro teórico da espécie  $[CH_3SH]^+$  e a composição isotópica dos picos.

A intensidade relativa dos picos do espectro de massas de um composto podem fornecer uma estimativa do quantitativo de átomos de um determinado elemento. Nas Figuras 16 e 17, podemos observar que quando temos um aumento de dez para cinquenta no número de carbonos da molécula, temos um aumento significativo da intensidade relativa dos picos gerados pelas espécies com  $^{13}\text{C}$  em sua constituição. Conforme apresentado no Quadro 3, a abundância do  $^{13}\text{C}$  é um pouco superior a 1%. Já a do  $^{12}\text{C}$ , é próxima a 99%. Isso nos leva a concluir que um composto com apenas um átomo de carbono apresentará o pico das espécies que contém  $^{13}\text{C}$  com uma intensidade de um pouco mais de 1% daquela referente ao pico das espécies com átomo de  $^{12}\text{C}$ . À medida que aumenta o número de átomos de carbono, aumenta a probabilidade de encontrarmos na molécula átomos de  $^{13}\text{C}$ , o que resulta no aumento da intensidade do pico referente às espécies com esse isótopo em sua composição. Nas Figuras 16 e 17 são apresentados os espectros de massas teóricos de duas diferentes espécies monocarregadas. Podemos observar que a espécie  $\text{C}_{10}\text{H}_{22}$ , apresenta o pico referente à espécie monocarregada com um  $^{13}\text{C}$  em sua composição, com uma intensidade de um pouco mais de 10% daquela do composto com apenas  $^{12}\text{C}$  na sua composição. Já para o composto  $\text{C}_{50}\text{H}_{102}$ , a intensidade do pico das espécies monocarregadas com um  $^{13}\text{C}$  em sua composição é um pouco superior a 50% daquela das espécies nonocarregadas constituídas exclusivamente por  $^{12}\text{C}$ . Também podemos observar que o aumento do número de carbonos acarreta um aumento na probabilidade de encontrarmos moléculas com 2 ou mais átomos de  $^{13}\text{C}$  em sua composição.

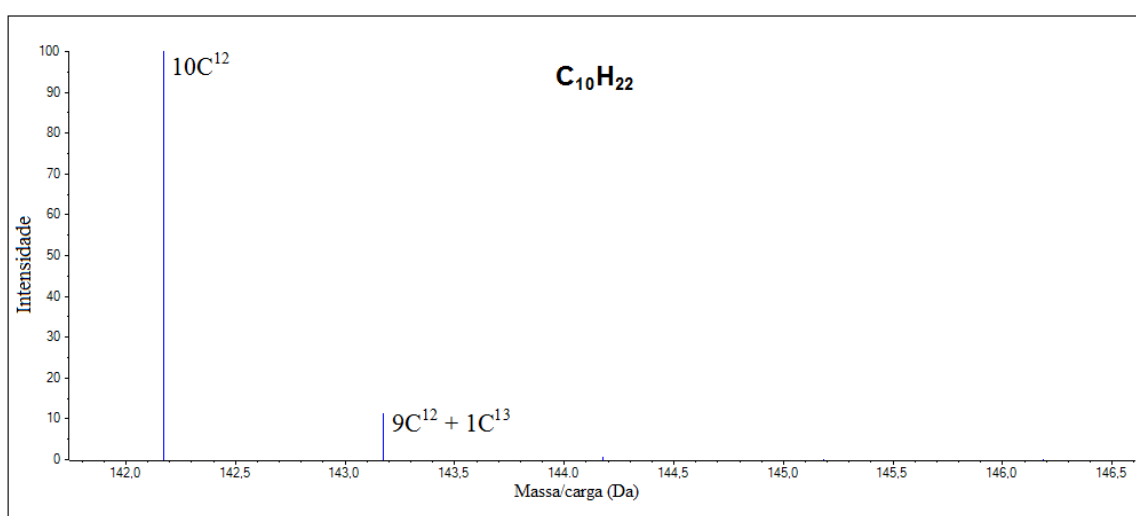


Figura 16 – Espectro teórico da espécie  $[\text{C}_{10}\text{H}_{22}]^+$  e a composição isotópica dos picos.

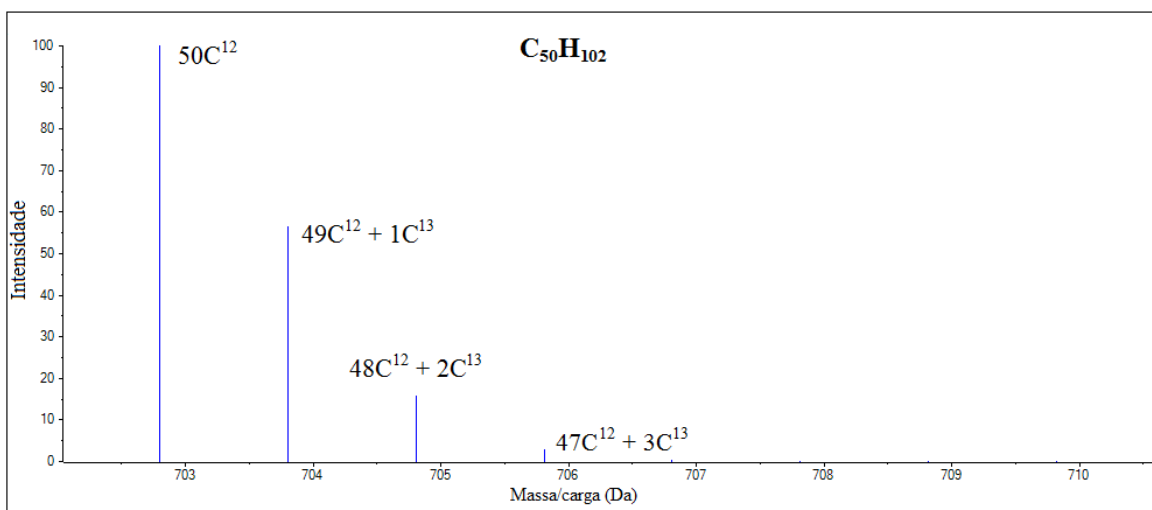


Figura 17 – Espectro teórico da espécie  $[C_{50}H_{102}]^+$  e a composição isotópica dos picos.

Quando a diferença de massa entre o pico do composto com apenas isótopos  $^{12}C$  e o pico com um  $^{13}C$  for de aproximadamente uma unidade de  $m/z$ , podemos concluir que os íons analisados pelo espectrômetro são monocarregados (conforme nas Figuras 16 e 17). Podemos ver na Figura 18 que essa diferença é de aproximadamente 0,5, valor este que indica que os íons gerados são dicarregados.

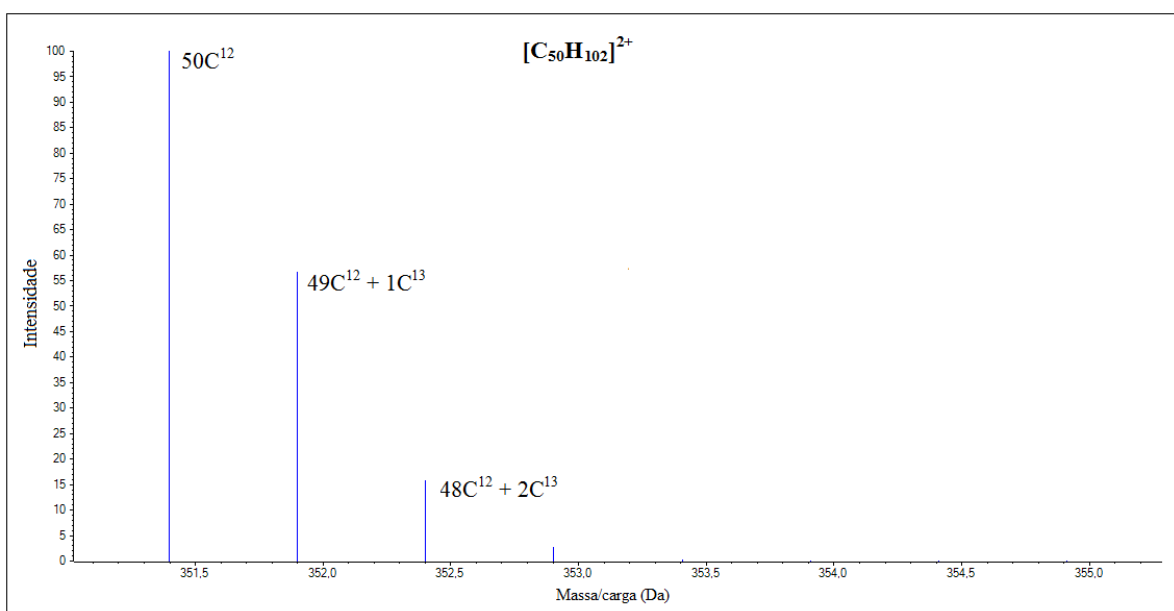


Figura 18 – Espectro teórico da espécie  $[C_{50}H_{102}]^{2+}$  e a composição isotópica dos picos.

Como a diferença de massa entre o  $^{13}\text{C}$  e  $^{12}\text{C}$  é de aproximadamente 1 Da, se a carga do íon for 1, teremos que da razão  $m/z$  dessa diferença resulta no valor de 1 ( $m/z = 1/1$ ). Se a carga for igual a dois, da razão  $m/z$  obteremos o valor de 0,5 ( $m/z = 1/2$ ). Para a carga igual a 3, a razão  $m/z$  resulta em 0,33 ( $m/z = 1/3$ ). Assim, pela diferença entre o valor de  $m/z$  da espécie constituída exclusivamente por  $^{12}\text{C}$  e o valor daquelas com um  $^{13}\text{C}$ , podemos inferir a carga dos íons. A carga do íon pode ser estimada pelo arredondamento do resultado da operação:

$$n = \frac{1}{\Delta m/z} \quad (2)$$

Em que:

$n$  = carga do íon;

$\Delta m/z$  = diferença de massa observada entre o pico da espécie com um  $^{13}\text{C}$  em sua composição e da espécie constituída exclusivamente por  $^{12}\text{C}$ .

## 2.5 Química Computacional

A chamada “Terceira Revolução Industrial” iniciada após a Segunda Guerra Mundial tem como característica marcante o acelerado desenvolvimento tecnológico que rapidamente é incorporado pela sociedade e se reflete em inovações que agregam a diferentes áreas. Nas últimas décadas, a Química, área do conhecimento historicamente experimental, também se beneficiou dos avanços na área da computação. O aprimoramento de hardwares e desenvolvimento de softwares agora possibilita a realização de experimentos *in silico*. Muitos dados que antes somente tínhamos acesso através de estudos empíricos agora podem ser obtidos de forma teórica.

Cálculos com moléculas isoladas fornecem informações sobre a estrutura e geometria mais estável da molécula, seus comprimentos e ângulos de ligação, frequências vibracionais, barreiras rotacionais, distribuição eletrônica, momento de dipolo, entre muitas outras propriedades. Em geral, os resultados obtidos pelos experimentos *in silico* para a obtenção dessas propriedades possuem uma exatidão comparável com os resultados obtidos pelas vias experimentais, especialmente para moléculas pequenas com até duas ou três dezenas de átomos. Em sistemas com um significativo número de moléculas, especialmente aqueles em que se consideram as

moléculas de solvente, é possível realizar o cálculo de propriedades termodinâmicas, como entalpia, energia livre, constante de equilíbrio e capacidade calorífica. Além disso, os cálculos computacionais podem fornecer dados sobre as estruturas do estado de transição em reações químicas, fornecendo importantes informações cinéticas.

Com o uso da computação gráfica é possível visualizar sistemas atômicos e moleculares em três dimensões e de forma interativa, pois possibilita de rotação e translação de átomos, moléculas, além da ampliação das imagens de regiões de interesse. A computação gráfica também permite visualizar a densidade eletrônica em torno da molécula, estruturação de conglomerados de átomos, íons e moléculas, além de informações de interação entre estruturas, tais como forças intra e intermoleculares<sup>(17)</sup>.

O tipo de sistema em estudo e as informações que se pretende obter são fundamentais na determinação de qual ferramenta da química computacional é mais adequada. Muitas vezes é necessário utilizar uma combinação de métodos para que seja possível alcançar bons resultados. Simulações de dinâmica molecular são baseadas nas leis da física clássica e são muito empregadas para se estudar sistemas com elevado número de átomos. Porém, como o método negligencia a representação explícita dos elétrons, sua aplicação é restrita ao estado fundamental. Além disso, a qualidade dos resultados obtidos é altamente dependente dos parâmetros utilizados, especialmente da superfície de potencial da molécula que é definida pelo campo de força utilizado. Por sua vez, os métodos *ab initio* são aqueles que se fundamentam e derivam diretamente dos princípios teóricos da mecânica quântica.

Nos métodos *ab initio*, o estado quântico de um sistema constituído de uma ou mais partículas é representado através de uma função de onda. A partir dela podem ser obtidas informações do sistema em estudo. Uma vez que a função de onda é conhecida para um determinado estado do sistema, então qualquer observável física pode, em princípio, ser determinada pela expressão:

$$\text{Observável} = \frac{\int \Psi^*(\text{operador})\Psi d\tau}{\int \Psi^* \Psi d\tau} \quad (3)$$

Em que “ $\Psi$ ” representa a função de onda. A integração em  $d\tau$  implica em integrar sobre todo o espaço. Já “ $\Psi^*$ ” é o complexo conjugado de  $\Psi$ ; ( $\Psi^*\Psi$ ). Existe um operador adequado para cada diferente observável, como energia, densidade de carga, momento de dipolo e constante de acoplamento hiperfino. Quando se trata da energia, utiliza-se

como operador o hamiltoniano  $H$ . A solução da equação de Schrödinger para um sistema fornece a função de onda que o descreve. A equação de Schrödinger é dada por:

$$H\Psi = E\Psi \quad (4)$$

Em que:

$H$  = Hamiltoniano que opera sobre uma função matemática;

$\Psi$  = é a função de onda que descreve o sistema;

$E$  = é a energia do sistema.

Exceto para o átomo de hidrogênio, não é possível encontrar a solução exata para a equação de Schrödinger associada a átomos ou molécula. Como estratégia, utilizam-se aproximações como a de Born-Oppenheimer, que consideram que o movimento do núcleo e elétrons ocorre separadamente, para se calcular a energia eletrônica a uma distância internuclear fixa e assim se obter a energia total pela adição do termo de repulsão núcleo-núcleo. A aproximação Hartree-Fock é amplamente empregada como o primeiro passo para o tratamento da equação de Schrödinger <sup>(18)</sup>. Quando aplicamos essa metodologia em um sistema de N-elétrons, a função de onda é descrita por um único determinante de Slater formado por um conjunto de spin-orbitais ( $\chi$ ) segundo a equação:

$$|\Psi_0\rangle = |\chi_1\chi_2 \dots \chi_a\chi_b \dots \chi_n\rangle \quad (5)$$

Em que “ $\Psi$ ” indica a função de onda e  $\chi$  indica os spin-orbitais

Conforme o princípio variacional, os spin-orbitais mais adequados são aqueles que minimizam a energia eletrônica do sistema. A energia é obtida segundo a equação:

$$E_0 = \langle \Psi_0 | H | \Psi_0 \rangle \quad (6)$$

Na qual “ $H$ ” representa o Hamiltoniano.

Com a introdução do operador de Fock, a equação de Hartree-Fock pode ser escrita como:

$$f|\chi_a\rangle = \varepsilon_a|\chi_a\rangle \quad (7)$$



Em que “ $f$ ” é o operador de Fock e  $\epsilon_a$  é a energia do spin-orbital  $\chi_a$ .

A equação de Hartree-Fock é resolvida através de um procedimento iterativo até se encontrar um valor auto-consistente. Encontra-se o “ $f$ ”, substitui-se na equação de HF, calcula-se o novo “ $f$ ” e se repete o ciclo até encontrar em dois ciclos sucessivos uma diferença numérica menor que um valor pré-estabelecido. O método Hartree-Fock acaba por resultar em valores de energia maiores que as reais. A essa diferença denominamos energia de correlação eletrônica, que pode ser tratada com o uso de DFT (do inglês, *Density Functional Theory*), como o funcional híbrido denominado B3LYP, empregado neste trabalho. O método utiliza o funcional de Becke com a inclusão de 3 parâmetros empíricos de ajuste e incorpora os funcionais de correlação de Lee, Yang e Parr<sup>(18)</sup>.

### **2.5.1 Cálculos *Ab Initio* como Ferramenta para Elucidação Estrutural**

A espectrometria de massas empregada como ferramenta para a elucidação estrutural de moléculas possui limitações. Nem sempre é possível determinar as diferenças entre isômeros, como no caso da localização de substituintes ao longo da cadeia principal de átomos. No caso específico da elucidação de produtos de transformação/degradação, as ferramentas da química computacional podem ser muito úteis para inferir a posição em que ocorreram alterações como hidroxilações, oxidações ou perda de átomos ou grupo de átomos.

A primeira tarefa para se iniciar uma simulação computacional é a construção das moléculas. Para cada possível posição do substituinte se elabora uma estrutura. Com a metodologia e parâmetros de simulação definidos, dá-se início ao processo de otimização das geometrias das moléculas para se buscar a conformação com menor energia que, conseqüentemente, corresponderá à estrutura mais provável de ser encontrada. Atenção especial deve ser dada ao nível de teoria que se irá empregar e à escolha da base que corresponde à representação dos átomos do sistema. O uso de uma base robusta é fundamental, pois a qualidade dos resultados obtidos é altamente dependente desse fator. Na escolha da metodologia que será empregada é essencial avaliar quais as informações que se pretende obter. Para que a simulação possa representar corretamente o fenômeno real, devemos considerar a sua representação mais completa possível.

As ferramentas computacionais também possuem suas limitações, pois normalmente não temos como considerar de maneira completa todas as variáveis relevantes de um sistema real. As simplificações são necessárias para se diminuir o custo computacional e para diminuir a complexidade da simulação, mas elas devem ser bem avaliadas para não comprometer a qualidade final dos resultados. Algumas vezes, a falta de conhecimento em relação a quais são todos os parâmetros realmente necessários para representar de maneira satisfatória o sistema que se pretende estudar também pode comprometer os resultados obtidos pela via computacional.

## 2.6 Fármacos como Contaminantes Emergentes

A indústria Química contemporânea disponibiliza uma infinidade de substâncias à sociedade. Nos primeiros dias de maio de 2015, os registros da *Chemical Abstracts Service*, divisão da *American Chemical Society*, indicam o registro de quase 97.000.000 de substâncias químicas orgânicas e inorgânicas. O número aumenta a um ritmo de aproximadamente 10 novas substâncias por minuto<sup>(19)</sup>. Muitas dessas substâncias são potencialmente tóxicas e podem gerar algum impacto negativo ao meio ambiente, especialmente à saúde humana. Os produtos provenientes do setor farmacêutico merecem especial atenção, pois são considerados contaminantes emergentes<sup>(20)</sup>. Essa classe de contaminantes são substâncias pouco estudadas em relação às suas implicações ambientais e são definidos como uma categoria de compostos não regulamentados que pode ser candidatos a uma futura regulação, dependendo dos resultados das investigações sobre as suas concentrações ambientais e os seus efeitos sobre a saúde humana e o meio ambiente<sup>(20)</sup>. Uma das principais características dessa classe de contaminantes é que não necessitam persistir no meio ambiente para causar efeitos negativos, haja vista que as suas taxas de transformação e/ou remoção são compensadas pela sua contínua introdução<sup>(21)</sup>. Para a maioria dos contaminantes emergentes, a incidência, os potenciais riscos e dados ecotoxicológicos não estão disponíveis, o que torna difícil a tarefa de prever seus efeitos sobre a biota. É importante ressaltar que muitos desses contaminantes estão onipresentes e tem sido detectados em efluentes de plantas de tratamento, em águas superficiais, subterrâneas e até em água tratada<sup>(2)</sup>. Segundo o *United States Geological Survey*, em 2002 foram detectados antibióticos em 48% dos rios e curso de águas americanos examinados<sup>(22)</sup>. Essa disseminação global de antibióticos no ambiente é um fator de pressão para a seleção

natural das cepas de bactérias mais resistentes e que certamente está contribuindo para o aumento da incidência de infecções bacterianas que não respondem aos tratamentos convencionais.

Dentre os medicamentos classificados como contaminantes emergentes, destacam-se, além dos antibióticos de uso humano e veterinário, os analgésicos, os anti-inflamatórios, os anticoncepcionais, os antissépticos, os reguladores de lipídios, os anti-epiléticos, os psicotrópicos, entre outros <sup>(20)</sup>.

Outra categoria de contaminantes emergentes são os chamados disruptores endócrinos (DE), também conhecidos pela sigla em inglês EDC, (do inglês, *endocrine disrupting chemicals*). Essas substâncias possuem a capacidade de promover alterações no sistema endócrino de animais e humanos. Desde o final da Segunda Guerra Mundial, e especialmente nos últimos 30 anos, os disruptores endócrinos se disseminaram nos meios aquáticos, resultando em um ambiente com potencial de interferir no sistema endócrino da biota exposta. Os efeitos dos DE dependem da sua concentração e da fase de desenvolvimento do organismo em que ocorre a exposição. Assim, embriões, fetos, neonatos, jovens e adultos podem reagir de diferentes maneiras a essa exposição. Outra característica importante da exposição aos DE nos estágios iniciais do desenvolvimento do organismo podem se manifestar apenas depois de atingida a maturidade do indivíduo afetado ou até na sua meia idade, embora a fase mais crítica seja a embrionária, fetal e o período neonatal <sup>(23)</sup>.

Já foram relacionados centenas de compostos DE, tais como, Pesticidas, herbicidas, fungicidas, inseticidas, nematicidas, metais pesados e outros produtos químicos, como plastificantes, dioxinas, bifenilploriclorados, bifenilpolibromados. Experimentos em laboratório demonstraram que a exposição de fetos aos DE podem causar severos distúrbios na diferenciação de órgãos, pois eles agem como hormônios agonistas ou antagonistas. Durante a gestação, os órgãos em desenvolvimento que possuem receptores para hormônios sexuais são especialmente sensíveis à exposição materna aos DE. Nos fetos do sexo masculino, os órgãos afetados incluem a próstata, vesícula seminal, epidídimos e testículos. Em fetos femininos, glândulas mamárias, útero, vagina, colo do útero e tubas uterinas. Em ambos os sexos a genitália externa, cérebro, esqueleto, tireóide, fígado, rins e sistema imunológico são alvo de esteroides com ação hormonal e, portanto, suscetíveis a ação de produtos químicos que agem como mimetizadores hormonais. A exposição aos DE é mais crítica nos primeiros estágios do desenvolvimento, apesar de estudos em animais mostrarem que a exposição

crônica de adultos aos DE com função estrogênica resulta em mudanças permanentes no cérebro e no aparelho reprodutor. Assim, existe a possibilidade que a exposição ambiental crônica de adultos aos estrogênios químicos após a maturidade, mesmo em baixo nível, pode ter efeito em humanos similar ao observado em animais de laboratório<sup>(23)</sup>. Os DE que contaminam o meio ambiente também induzem modificações epigenéticas, muitas delas relacionadas com a sexualidade humana. Estudos recentes indicam que essa exposição, especialmente durante a fase gestacional, é relevante para o entendimento de questões que envolvem a homossexualidade<sup>(24)</sup>.

A problemática envolvendo os contaminantes emergentes está ficando cada vez mais em evidência. O entendimento em relação às suas consequências demandam estudos que envolvem a sua identificação e quantificação. Nesse sentido, as técnicas de cromatografia gasosa e líquida, acopladas a espectrometria de massas (GC-MS ou GC MS/MS, LC-MS e LC-MS/MS) são importantes ferramentas para o monitoramento da presença e da concentração dos contaminantes emergentes em amostras ambientais. A expansão do uso destes compostos torna cada vez mais importante o desenvolvimento de técnicas analíticas adequadas para sua análise e de seus produtos de transformação e metabólitos.

## **2.7 Estudo de Produtos de Transformação, Degradação e Metabólitos**

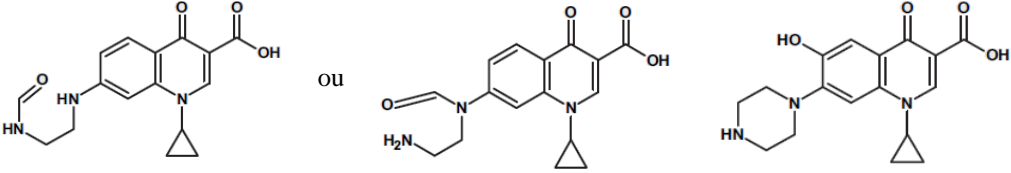
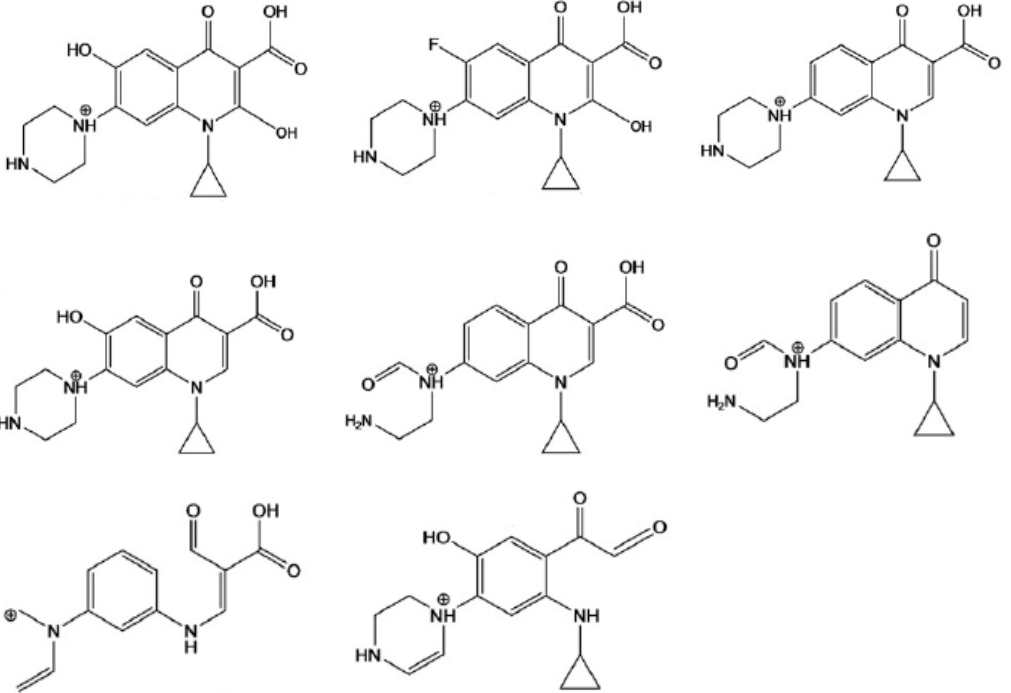
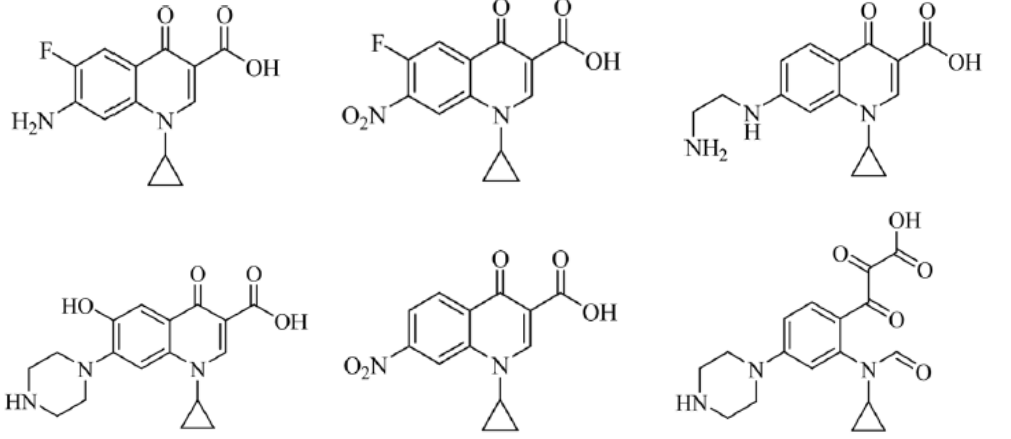
A identificação de compostos desconhecidos, como é o caso de produtos de transformação, degradação e metabólitos ainda não descritos, apresenta uma série de dificuldades adicionais em comparação às análises em que já se tem um alvo bem definido. Nos sistemas submetidos à fotólise, fotocátalise e biotransformação, podemos ter uma quantidade considerável de diferentes compostos sendo gerados. Por se tratarem de compostos distintos, eles podem possuir características químicas diferentes, entre elas a polaridade. Este fato pode afetar principalmente a extração e a eficiência da separação cromatográfica. A inexistência de padrões para os compostos que são desconhecidos *a priori* dificulta a otimização das análises<sup>(2)</sup>. Em vista das características acima citadas, as técnicas analíticas utilizadas nos estudos de produtos de transformação devem ter uma alta sensibilidade, proporcionar informações estruturais de forma mais abundante possível e não ter restrições quanto ao tipo e quantidade de compostos que podem ser analisados de forma simultânea<sup>(2)</sup>. A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução, com analisadores de massas no modo *tandem* satisfaz aos requisitos e é uma ferramenta muito importante na

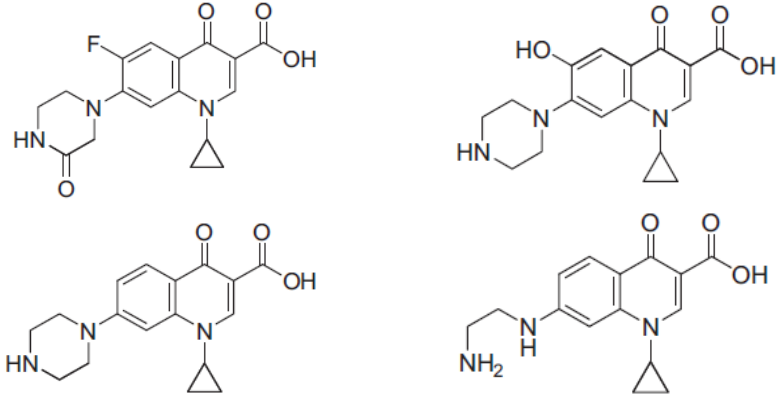
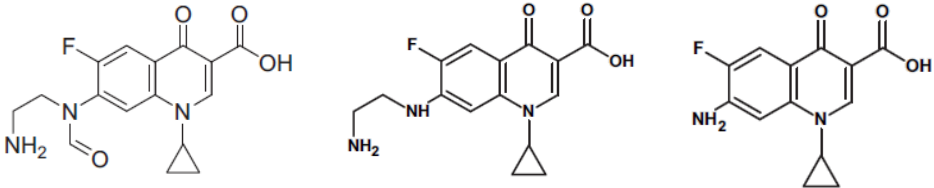
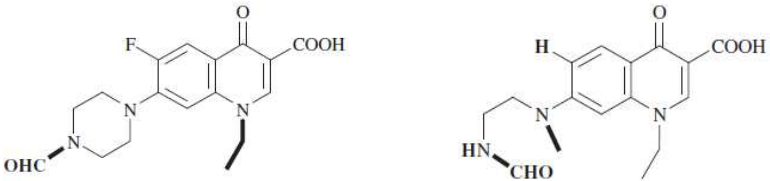
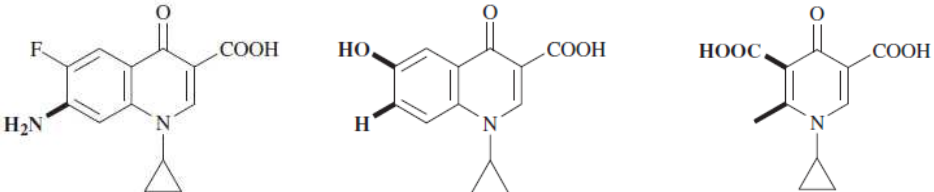
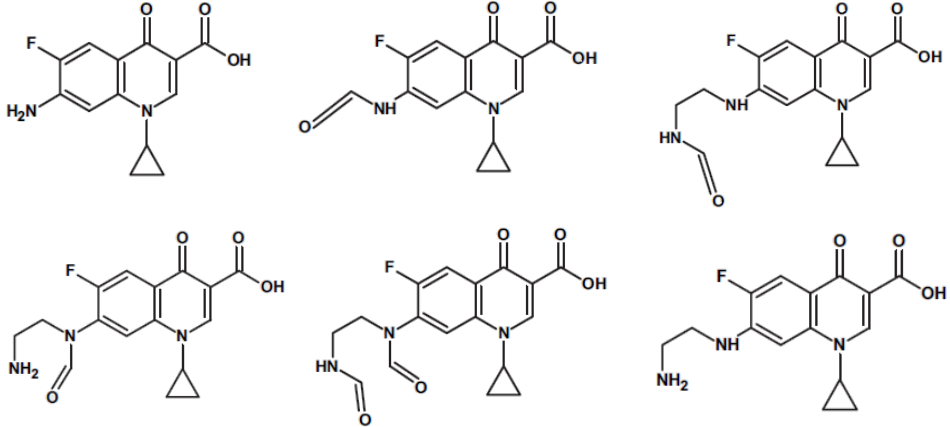
identificação de compostos desconhecidos. Apesar das dificuldades descritas, os produtos de transformação apresentam a vantagem de se originarem de uma estrutura comum que normalmente é conhecida. Assim, já se parte de uma composição elementar definida, informação essa, bastante valiosa na hora de interpretar os espectros de massas. A presença de certos átomos com isótopos característicos, como cloro, bromo e enxofre, ajuda consideravelmente na tarefa de definir a composição elementar de uma substância. A presença de fragmentos MS/MS comuns entre a molécula precursora e seus derivados sempre precisa ser levada em consideração. Destaca-se também a importância de avaliar as reações características que ocorrem na fotocatalise, fotólise e biotransformação. Elas normalmente ajudam a prever alguns potenciais produtos de transformação que podem ser gerados em cada sistema <sup>(2)</sup>. Apesar dessas vantagens, a determinação de compostos desconhecidos, nos sistemas onde são gerados produtos de transformação ou metabólitos de fármacos, ainda não está bem implementada <sup>(2)</sup>. Estudos focados nesta área são importantes em vista que, muitas vezes, os produtos de transformação, degradação ou metabolização podem ser mais tóxicos ou persistentes que os fármacos originais. Para se entender o comportamento dos fármacos no meio ambiente e dos subprodutos gerados ao longo dos processos de degradação dos mesmos, é preciso estudar os seus produtos de transformação, já que o desaparecimento do fármaco em si não significa necessariamente que ele foi eliminado, pois pode ter se transformado em outros compostos.

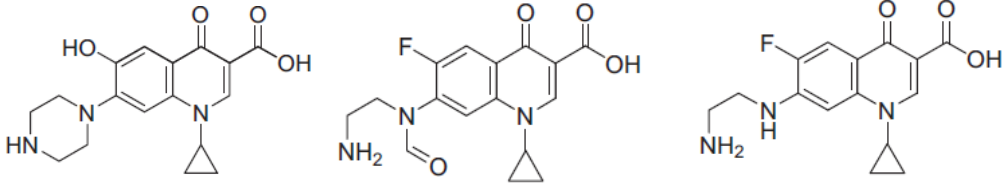
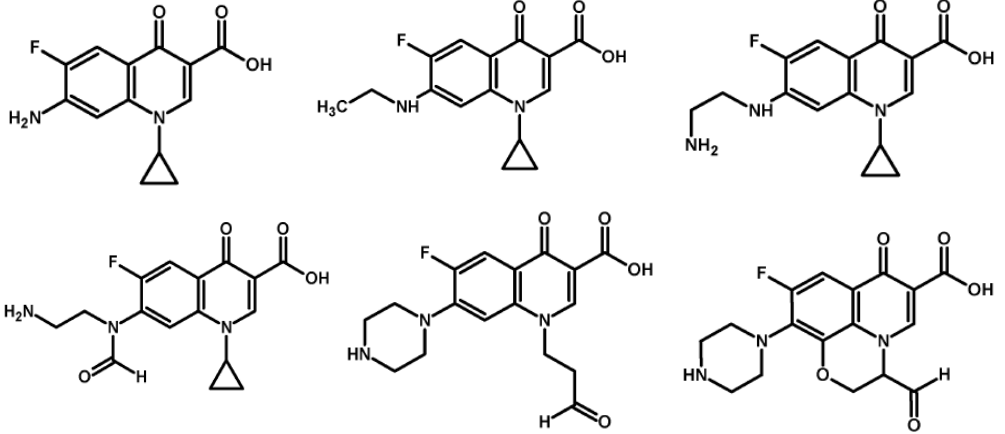
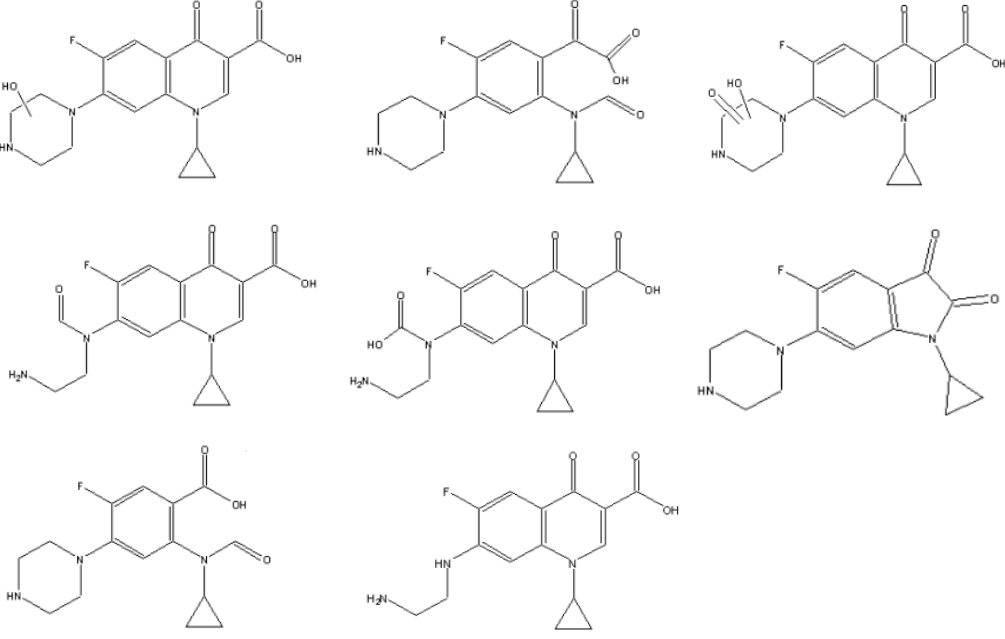
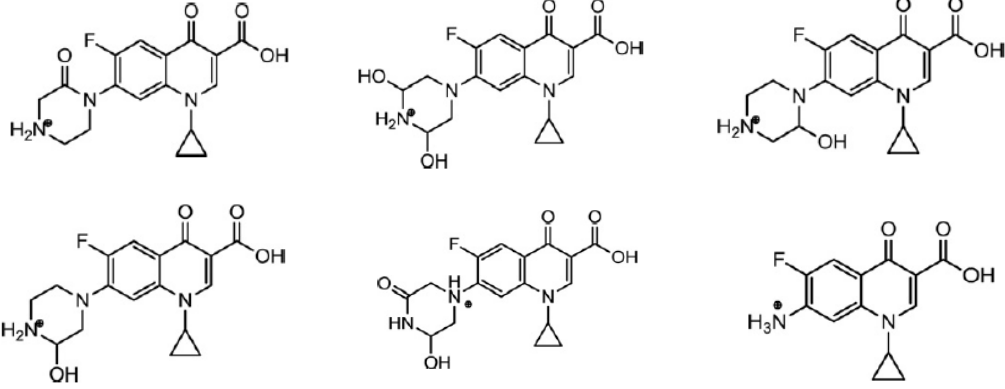
A literatura pertinente ao assunto revela um constante aumento nos estudos relacionados com produtos de transformação de fármacos. Já existem publicações com esse foco para diclofenaco, ibuprofeno, naproxeno, cetoprofeno, fenoprofeno, ácido salicílico, indometacina, clorotetraciclina, sulfonamidas, enalapril, atenolol, bezafibrato e cimetidina, entre outras <sup>(2)</sup>. Nos Quadros 4, 5, 6, 7 e 8 constam os produtos de transformação/degradação já publicados para os fármacos estudados neste trabalho.

O Quadro 4 mostra os produtos de transformação/degradação já publicados para o ciprofloxacino, referentes a sua fotólise, fotocatalise e processo de oxidação.

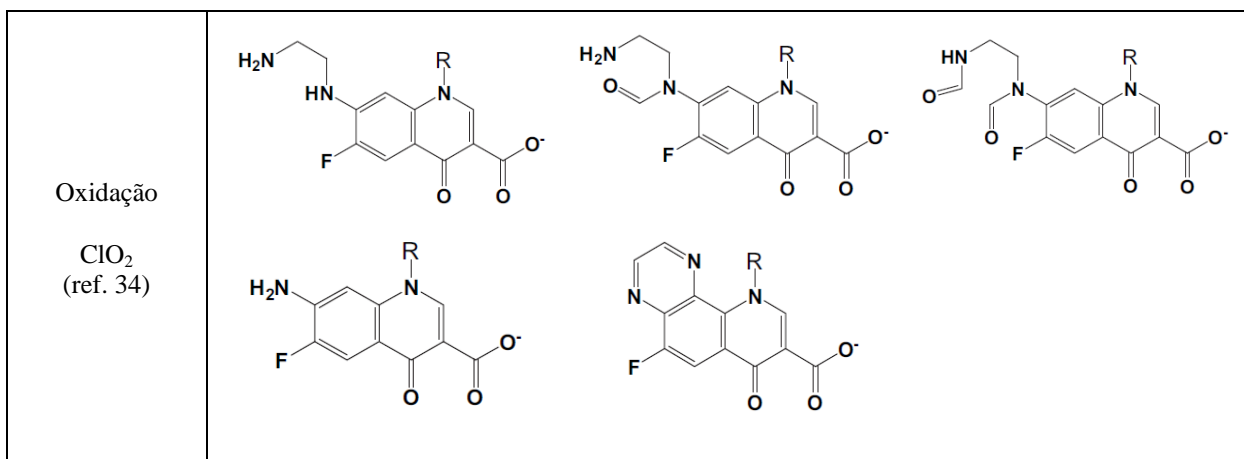
Quadro 4 – Produtos de transformação/degradação do ciprofloxacino segundo trabalhos já publicados.

Informações	Produtos de Transformação / Degradação
<p>Fotólise <math>\lambda &gt; 324</math> nm. (ref. 25)</p>	
<p>Fotólise <math>\lambda &gt; 254</math> nm. (ref. 26)</p>	
<p>Fotólise <math>\lambda &gt; 290</math> nm. (ref. 27)</p>	

<p>Fotólise</p> <p>Luz do sol natural (290–470 W m<sup>-2</sup> (Vis) e 20–31 W m<sup>-2</sup> (UV). (ref. 28)</p>	
<p>Fotólise</p> <p>Lâmpada de xenônio. (ref. 29)</p>	
<p>Fotólise</p> <p><math>\lambda = 300 \text{ nm}</math> a <math>800 \text{ nm}</math>. (ref. 30)</p>	<p>pH = 4: dois produtos de transformação/degradação:</p>  <p>pH = 8: três produtos de transformação/degradação:</p> 
<p>Fotocatálise</p> <p>UVA-TiO<sub>2</sub> e VIS-TiO<sub>2</sub> (ref. 25)</p>	

<p>Fotocatálise</p> <p>TiO<sub>2</sub> (ref. 28)</p>	
<p>Fotocatálise</p> <p>TiO<sub>2</sub> (ref. 31)</p>	
<p>Oxidação</p> <p>Ozonólise (ref. 32)</p>	
<p>Oxidação</p> <p>KMnO<sub>4</sub> em meio ácido. (ref. 33)</p>	



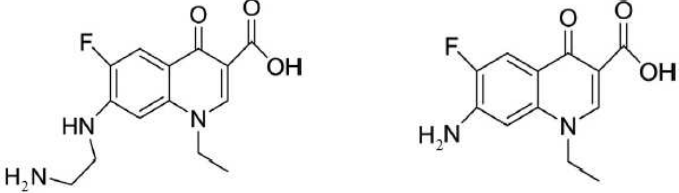
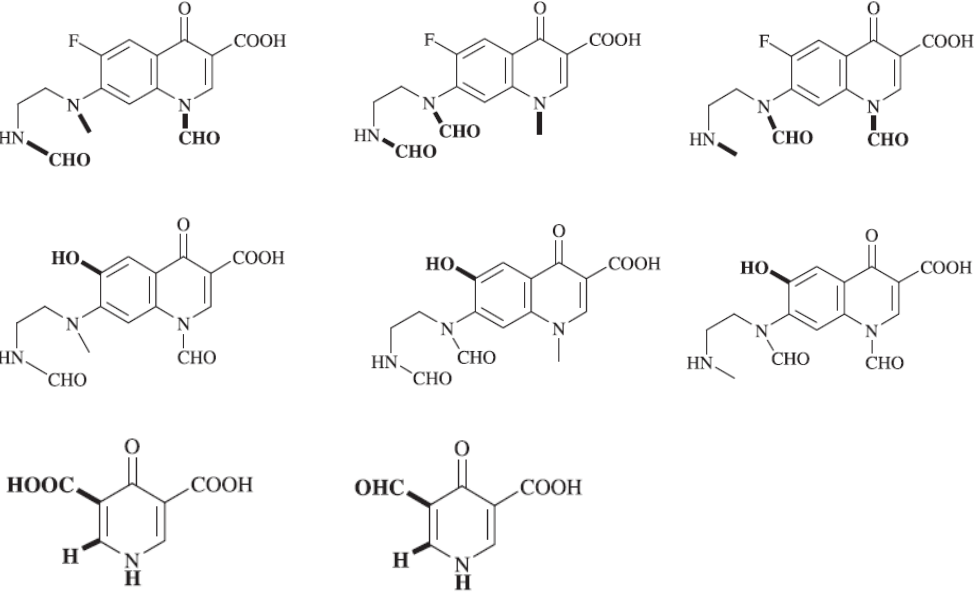
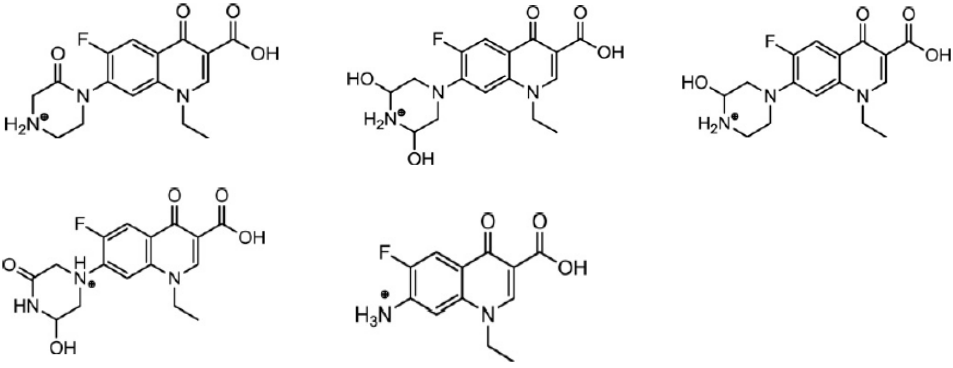
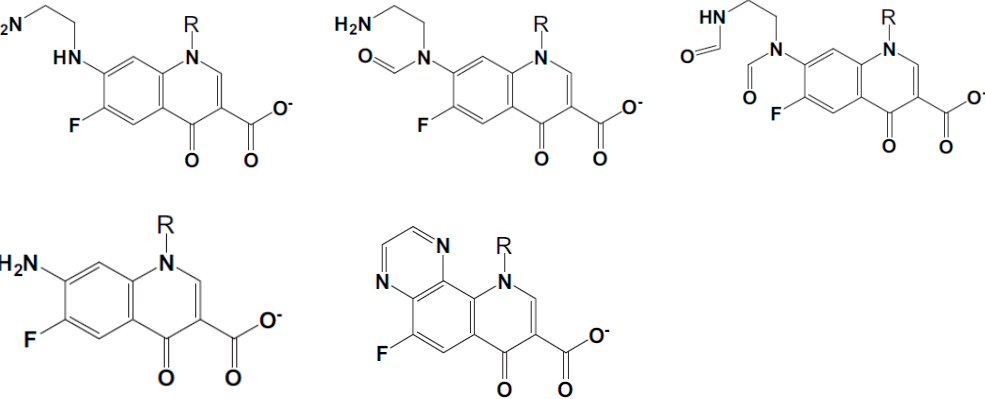


A literatura mostra que na fotólise e fotocatalise do ciprofloxiacino é comum que sejam gerados produtos de transformação/degradação a partir da abertura e/ou oxidação do anel piperazina, da hidroxilação do anel aromático e a da perda do átomo de flúor. Já no processo de oxidação do CFX, observa-se principalmente a abertura e a oxidação do anel piperazina.

No Quadro 5 são mostrados os produtos de transformação/degradação do norfloxacin já relatados na literatura.

Quadro 5 – Produtos de transformação/degradação do norfloxacin, segundo trabalhos já publicados.

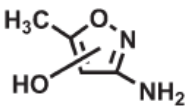
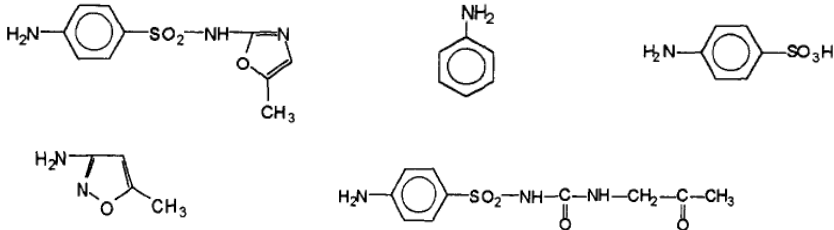
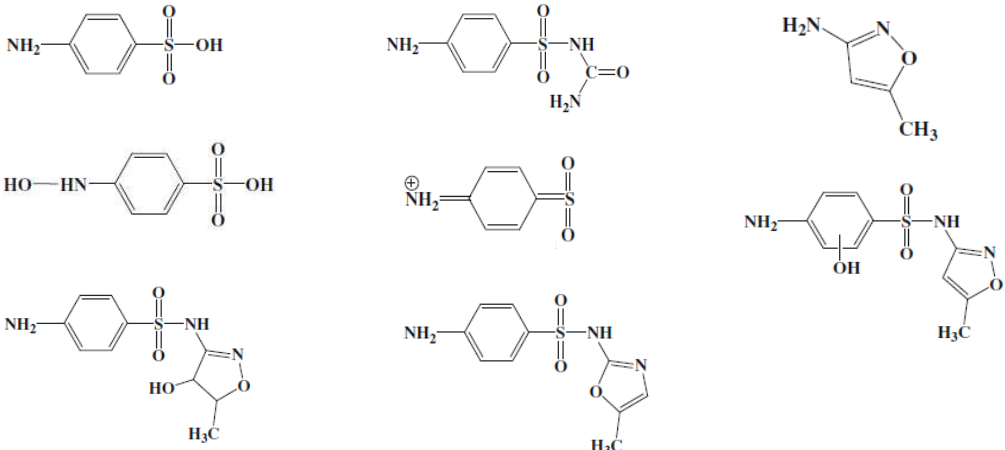
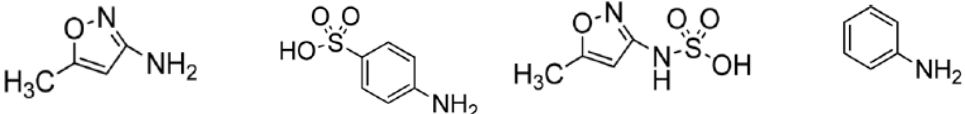
Informações	Produtos de Transformação / Degradação		
Fotólise  Lâmpada Philips 30 W 50% de emissão em 274 nm. Fotodegradação em pH ácido, neutro e alcalino. (ref. 35)	<p>pH ácido</p>	<p>pH ácido, neutro e alcalino</p>	<p>pH ácido e neutro</p>
	<p>pH ácido, neutro e alcalino</p>	<p>pH ácido, neutro e alcalino</p>	

<p>Fotólise</p> <p>Lâmpada de xenônio</p> <p>(ref. 29)</p>	
<p>Fotólise</p> <p><math>\lambda = 300-800</math> nm.</p> <p>(ref. 30)</p>	
<p>Oxidação</p> <p>KMnO<sub>4</sub> em meio ácido</p> <p>(ref. 33)</p>	
<p>Oxidação</p> <p>ClO<sub>2</sub></p> <p>(ref. 34)</p>	

A literatura traz que, assim como ocorre com o ciprofloxacino, na fotólise do norfloxacinó é comum que sejam gerados produtos de transformação/degradação a partir da abertura e/ou oxidação do anel piperazina, da hidroxilação do anel aromático e da perda do átomo de flúor. Também podem ser encontrados produtos de transformação/degradação originados a partir da oxidação da etila ligada ao nitrogênio<sup>(30)</sup>. Já no processo de oxidação do NFX, observa-se principalmente a abertura e a oxidação do anel piperazina.

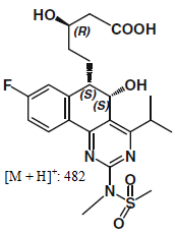
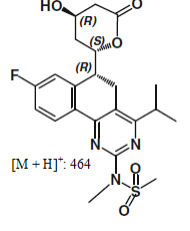
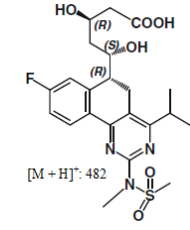
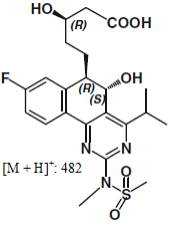
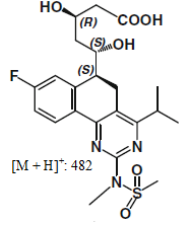
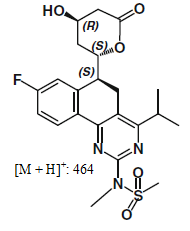
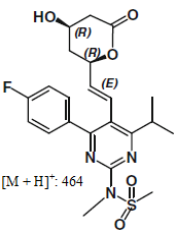
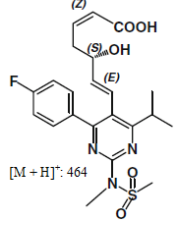
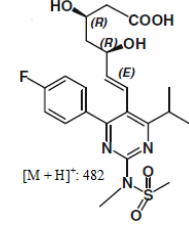
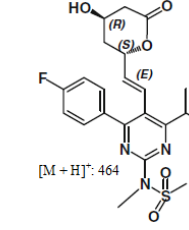
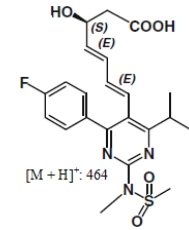
No Quadro 6 são mostrados os produtos de transformação/degradação do sulfametoxazol já relatados na literatura.

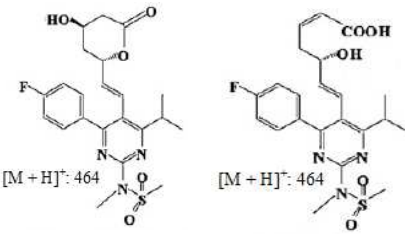
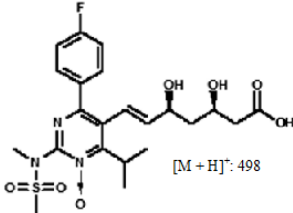
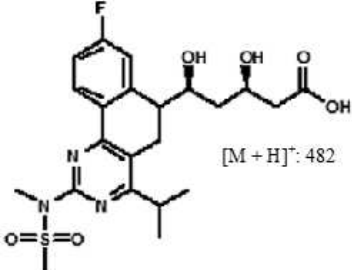
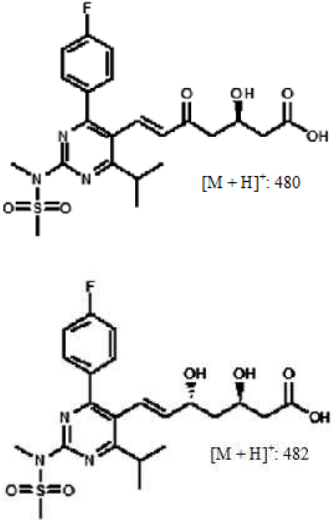
Quadro 6 – Produtos de transformação/degradação do sulfametoxazol segundo trabalhos já publicados.

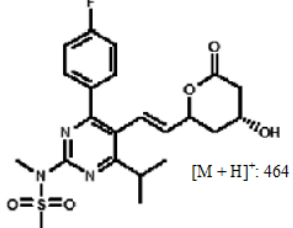
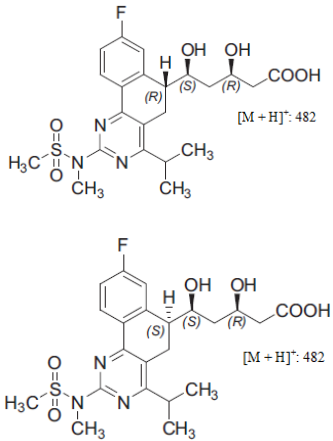
Informações	Produtos de Transformação / Degradação
Fotólise $\lambda > 290 \text{ nm}$ (ref. 36)	
Fotólise $\lambda > 290 \text{ nm}$ (ref. 37)	
Fotólise $\lambda > 290 \text{ nm} - 250 \text{ W m}^{-2}$ (ref. 38)	
Fotólise $\lambda \text{ entre } 265 \text{ e } 430 \text{ nm} - 76 \text{ W m}^{-2} \text{ e } 44,4 \text{ W m}^{-2}$	



Quadro 7 – Produtos de transformação/degradação da rosuvastatina segundo trabalhos já publicados.

Informações	Fotólise Direta	Hidrólise ácida
<p><b>Técnica analítica:</b> LC-MS/TOF, LC-MS<sup>n</sup>, on-line H/D exchange e LC-NMR.</p> <p><b>Informações adicionais:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- rosuvastatina é estável ao estresse térmico (50° C durante 21 dias);</li> <li>- estável à oxidação (com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 15%);</li> <li>- estável à hidrólise alcalina (NaOH 1M);</li> <li>- estável à hidrólise em meio pH = 7;</li> <li>- degradada pela radiação UV (lâmpada Osram L 18W/73 e Philips Trulite 18W/86).</li> </ul> <p><b>Referência (41)</b></p>	<p>8.500 lux e ~0.5 W/m<sup>2</sup> radiação UV.</p> <div style="display: flex; flex-wrap: wrap;"> <div style="width: 50%; text-align: center;">  <p>[M + H]<sup>+</sup>: 482</p> </div> <div style="width: 50%; text-align: center;">  <p>[M + H]<sup>+</sup>: 464</p> </div> <div style="width: 50%; text-align: center;">  <p>[M + H]<sup>+</sup>: 482</p> </div> <div style="width: 50%; text-align: center;">  <p>[M + H]<sup>+</sup>: 482</p> </div> <div style="width: 50%; text-align: center;">  <p>[M + H]<sup>+</sup>: 482</p> </div> <div style="width: 50%; text-align: center;">  <p>[M + H]<sup>+</sup>: 464</p> </div> </div>	<p>HCl 0,05 M</p> <div style="display: flex; flex-wrap: wrap;"> <div style="width: 50%; text-align: center;">  <p>[M + H]<sup>+</sup>: 464</p> </div> <div style="width: 50%; text-align: center;">  <p>[M + H]<sup>+</sup>: 464</p> </div> <div style="width: 50%; text-align: center;">  <p>[M + H]<sup>+</sup>: 482</p> </div> <div style="width: 50%; text-align: center;">  <p>[M + H]<sup>+</sup>: 464</p> </div> <div style="width: 50%; text-align: center;">  <p>[M + H]<sup>+</sup>: 464</p> </div> </div>

<p><b>Técnica analítica:</b> LC-MS HDE (hydrogen / deuterium exchange-mass spectrometry)</p> <p><b>Informações adicionais:</b> - reportou dois produtos de transformação da hidrólise ácida.</p> <p><b>Referência</b> (42)</p>	<p>-----</p>	
<p><b>Técnica analítica:</b> LC-UV-MS (íon trap MS – baixa resolução)</p> <p><b>Informações adicionais:</b> - degradação da RST por UV, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, calor, hidrólise ácida e alcalina; - 11 TPS reportados e 5 sugestões de estruturas apresentadas; - oxidação: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 5%, a 80° C por 15 min levou à degradação de 10% da RST. Dois TPs com estrutura sugerida. O m/z 464 é o mesmo da hidrólise ácida. O m/z: 498 corresponde ao:</p>  <p>- degradação térmica em T ambiente por 180 min resultou em degradação de 3% da RST; - hidrólise alcalina: 0,05 M de NaOH com aquecimento por uma hora a 80° C, RST demonstrou ser estável;</p>	<p>Distância entre lâmpada (UV) e amostra de 5 cm. RST em pó e em solução. 20 min, 60 % de degradação. Após 70 min, 100% de degradação. Dois principais TPS com m/z 482 - Minoritários 514, 482, 480 (2x) e 478.</p> 	<p>0,05 M HCl - degradação de 5% da RST (180 min e T ambiente). Com 0,1 M HCl e aquecimento por 15 min a 80° C, degradação de 30 % da RST.</p> 

<p>- estresse térmico: 80° C por uma hora degradação de ~6% da RST;</p> <p><b>Referência (43)</b></p>		
<p><b>Técnicas analíticas:</b> Infravermelho, RMN e LC MS.</p> <p><b>Informações adicionais:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- investigação da fotoestabilidade da RST;</li> <li>- fotodegradação com RST em solução e sólida;</li> <li>- reportou dois TPs de fotodegradação (ref. 44)</li> </ul> <p><b>Referência (44)</b></p>	<p>UV 366 nm por 72 h e UV 254 nm por 48 h (potência não informada – amostra a 20 cm da lâmpada).</p> 	<p>-----</p>
<p><b>Técnica analítica:</b> HPLC UV VIS</p> <p><b>Informações adicionais:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- avaliação da estabilidade física e química da RST para o medicamento sólido;</li> <li>- parâmetros avaliados: degradação térmica, fotodegradação, hidrólise e estresse oxidativo;</li> <li>- RST estável à oxidação e hidrólise alcalina;</li> </ul>	<p>RST no estado sólido é estável à fotodegradação UV 254 nm por 12 horas (potência não informada).</p>	<p>A RST é sensível à hidrólise ácida.</p>

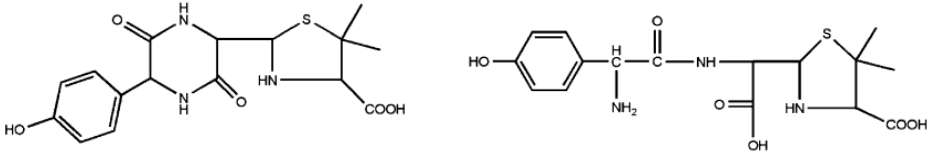
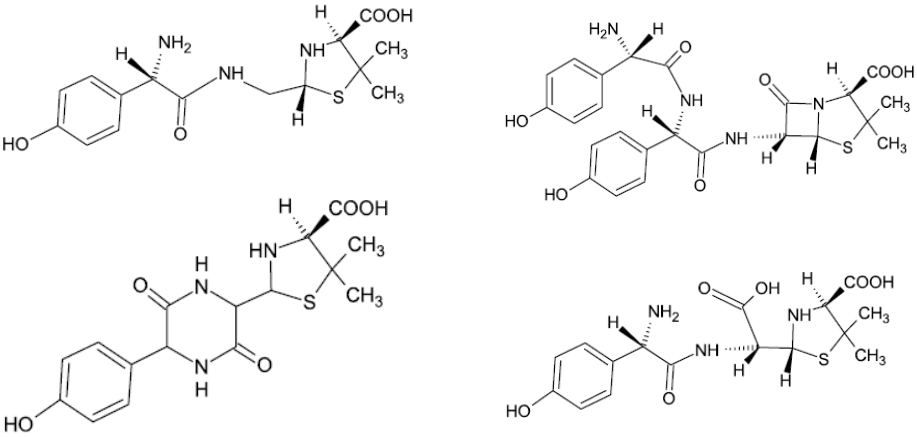
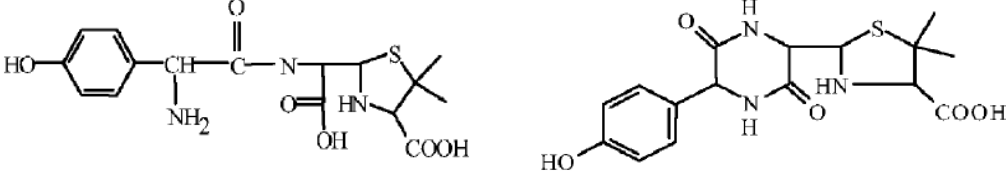
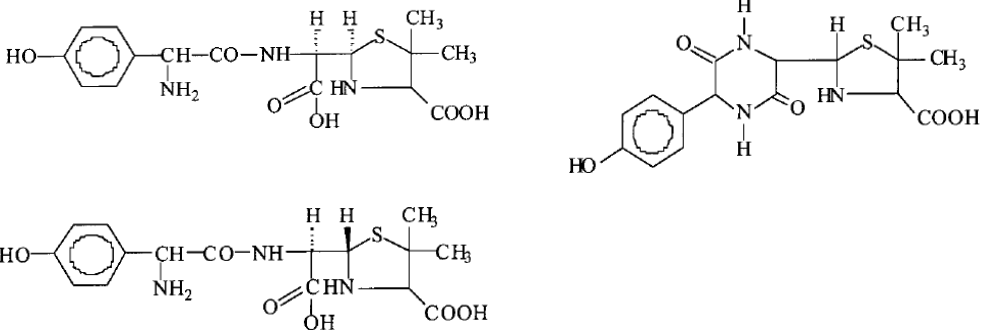
<p>- pequeno percentual de degradação na degradação térmica (ar seco a 105° C por 24 h);</p> <p>- a estrutura dos TPs não foi avaliada. Apenas a extensão da degradação da RST.</p> <p><b>Referência (45)</b></p>		
<p><b>Técnica analítica:</b> HPLC UV-VIS</p> <p><b>Informações adicionais:</b></p> <p>- determinação da concentração da RST na presença de produtos de degradação;</p> <p>- NaOH 1 M: 10 a 12 % (RST (ar aquecido a 80° C durante 20 h);</p> <p>- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5%: degradação de 20 a 25% RST (ar aquecido a 80° C durante 20 h);</p> <p>- degradação térmica: 4 a 5% (100° C por 24 h);</p> <p>- autoclavagem: degradação de 3 a 5% (121° C, 15 PSI de pressão, 20 min);</p> <p>- Não foram avaliados os produtos de transformação. (ref. 46)</p> <p><b>Referência (46)</b></p>	<p>Fotodegradação: decomposição de 25 a 28% da RST (1,2 x 10<sup>9</sup> lux/h)</p>	<p>hidrólise ácida: pH 1,5 (HCl): degradação entre 50 e 55% da RST (ar aquecido a 80° C durante 20 h);</p> <p>pH 6,8: degradação de 4 a 5% RST (ar aquecido a 80° C durante 20 h).</p>

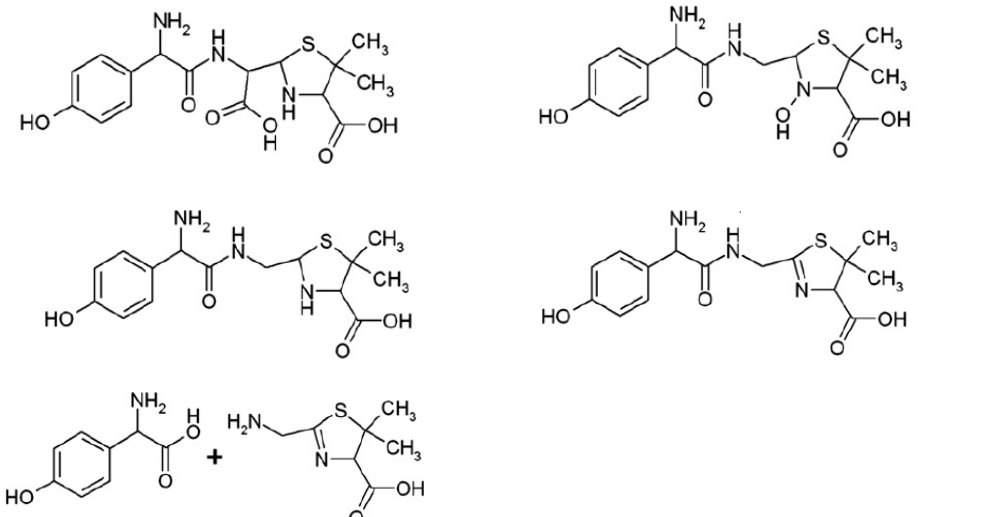
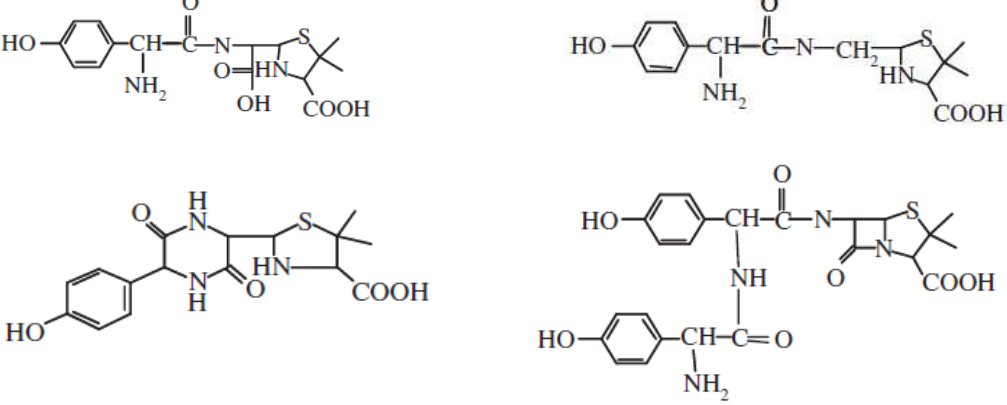
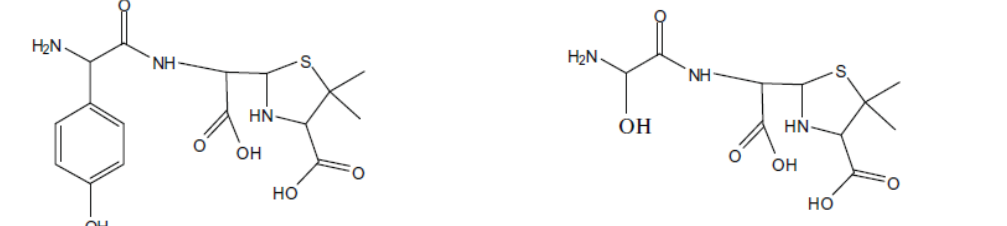


A literatura mostra que na fotólise da Rosuvastatina ocorre principalmente a formação de um novo anel condensado aos dois outros já existentes. Na hidrólise ácida é comum a condensação do grupo funcional ácido carboxílico e um grupo álcool, formando uma lactona de seis membros.

No Quadro 8 são mostrados os produtos de transformação/degradação e metabólitos da amoxicilina já reportados pela literatura.

Quadro 8 – Produtos de transformação/degradação e metabólitos da amoxicilina segundo trabalhos publicados.

Informações	Produtos de Transformação / Degradação e Metabólitos
Metabólitos em leite bovino (ref. 47)	
Estresse ácido HCl 0,1 M T = 25oC - 1h (ref. 48)	
Metabólitos em tecidos de suínos (rim, fígado, gordura e músculo). (ref. 49)	
Metabólitos em tecidos de suínos: músculo, rim, fígado e gordura (ref. 50)	

<p>Oxidação em água com descarga elétrica (ref. 51)</p>	
<p>Metabólitos em sangue venoso de suínos. (ref. 52)</p>	
<p>Biodegradação em águas residuais. (ref. 53)</p>	

Os dois principais metabólitos da amoxicilina encontrados em leite bovino e em tecidos e sangue suíno são o ácido amoxicilóico e amoxicilina dicetopiperazina<sup>(47, 49, 50, 52)</sup>. Em estresse ácido, oxidação em água e biodegradação, os produtos de transformação/degradação mais comuns são gerados a partir da abertura do anel *b*-lactâmico, acompanhada de mudanças estruturais variadas.

Conforme citado anteriormente, existem inúmeros trabalhos de produtos de transformação/degradação para fármacos em geral. Porém, ainda não está estabelecida uma metodologia genérica que possa ser aplicada no estudo de produtos de transformação/degradação (e metabólitos), através de cromatografia líquida acoplada a

espectrometria de massas. Além disso, ainda não estão disponíveis estudos mais aprofundados dos produtos de fotocatalise da rosuvastatina na presença do ZnO. Em relação à amoxicilina, não há trabalhos que investiguem mais detalhadamente as dificuldades e particularidades envolvidas na quantificação da amoxicilina em leite, através da espectrometria de Massas.

## 2.8 Fotodegradação

Os fármacos e seus metabólitos que são lançados no meio ambiente aquático estão suscetíveis a sofrer processos bióticos e abióticos de degradação. As transformações abióticas ocorrem principalmente por hidrólise e fotólise. Muitos fármacos têm suas moléculas projetadas para a via de administração oral, o que exige que eles apresentem resistência à hidrólise. Isso torna a fotólise, tanto a direta quanto a indireta, o principal mecanismo de degradação desses compostos nas águas superficiais, especialmente aqueles que possuem baixa biodegradabilidade <sup>(2)</sup>

A fotólise direta se dá pela absorção direta da radiação solar. Na fotólise indireta, outros compostos, normalmente naturais, presentes no meio, tais como nitratos matéria orgânica disponível, sob o efeito da radiação solar acabam por gerar espécies reativas que irão promover as transformações dos fármacos. Entre os principais componentes da matéria orgânica disponível estão os ácidos húmicos. Eles possuem características de heteropolímeros e a sua composição é bastante diversa. Possuem em suas estruturas núcleos aromáticos com condensação variável, além de núcleos de natureza predominantemente alifática. Uma característica importante das substâncias húmicas é sua capacidade de induzir transformações em compostos orgânicos, contribuindo para sua degradação. O processo ocorre quando são produzidas espécies reativas pela radiação ultravioleta proveniente do sol. Os fótons produzem espécies reativas, tais como radicais hidroxila ( $\bullet\text{OH}$ ), oxigênio atômico, ânions superóxido, elétrons solvatados e peróxidos, entre outros. A matéria orgânica disponível, principalmente os ácidos húmicos, é ativada pelas espécies reativas, o que a habilita a reagir com os contaminantes presentes no meio aquático. Esse processo indireto concorre com a fotólise direta na degradação dos contaminantes presentes <sup>(2)</sup>.

A fotocatalise pode ser um eficiente processo de tratamento de contaminantes orgânicos em água. Mediante a fotocatalise são gerados radicais hidroxila, cujo potencial de ionização é de 2,8 V. Esse valor é superior ao de outros oxidantes

tradicionais como cloro, (1,36 V), peróxido de hidrogênio (1,78 V) e ozônio (2,07 V). Os radicais hidroxila são capazes de oxidar compostos orgânicos, principalmente por adição eletrofílica em ligações duplas e abstração de hidrogênio, que acaba por gerar radicais orgânicos que por sua vez reagem com oxigênio <sup>(2)</sup>. No caso do ZnO, que foi empregado neste trabalho, estudos mostram que o mesmo pode ser reutilizado sem qualquer tratamento sem perda de sua capacidade catalítica ao longo de cinco ciclos de fotocatalise <sup>(54, 55)</sup>.

## **2.9 Agentes Antimicrobianos**

Segundo a Resolução RDC número 20, de 05 de maio 2011, os agentes antimicrobianos são substâncias que previnem a proliferação de agentes infecciosos ou micro-organismos, ou que os eliminam para prevenir a disseminação de infecções. Os medicamentos antimicrobianos são classificados em antibacterianos, antifúngicos, antiprotozoários, anti-helmínticos e antivirais. Antibacterianos são divididos em antibióticos, sintetizados por fungos, e quimioterápicos, estes produzidos em laboratório. Os primeiros ainda predominam, mas frequentemente são manipulados quimicamente (semi-sintéticos). A denominação de antibióticos prevalece na prática clínica diária, independentemente da origem natural ou sintética <sup>(56)</sup>.

Os benefícios dos antibióticos à saúde humana são incontestáveis. Estimativas indicam que eles são responsáveis por um acréscimo na nossa expectativa de vida entre 2 e 10 anos <sup>(57)</sup>.

O termo “antibiótico” foi introduzido por Waksman em 1942 e foi definido como uma substância química produzida por micro-organismos que podem inibir o crescimento ou até mesmo destruir outros micro-organismos <sup>(58)</sup>. Apesar da concepção original do termo, hoje, muitos antibióticos são sintéticos ou semi-sintéticos. Essas substâncias são empregadas em pequenas doses e inibem o crescimento e/ou inviabilizam a sobrevivência de micro-organismos sem afetar significativamente o hospedeiro. As principais classes de antibióticos são: penicilinas, sulfonamidas, tetraciclina, quinolonas, aminoglicosídeos, ansamicinas, cefalosporinas, glicopeptídeos, macrolídeos, entre outros <sup>(58)</sup>.

Estima-se que nos Estados Unidos, 51 toneladas de antibióticos são consumidas diariamente, sendo 80% em atividades relacionadas à criação de animais <sup>(59)</sup>. Boa parte do consumo é proveniente do uso abusivo, que é estimulado por fatores como: relativo

baixo custo do produto, a ineficácia da regulamentação e a escassa fiscalização do setor, a falta de conhecimento da sociedade, além de questões de natureza moral e ética, como a ganância, tanto dos agentes de mercado de antibióticos quanto dos criadores de animais.

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA<sup>(60)</sup>, dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) apontam que mais de 50% das prescrições de antibióticos no mundo são inadequadas. Só no Brasil, o comércio de antibiótico movimentou em 2009 cerca de R\$ 1,6 bilhões, segundo relatório do instituto IMS Health. O relatório indica ainda que 40% dos medicamentos consumidos no Brasil são antibióticos.

Os antibióticos podem ser bactericidas ou bacteriostáticos. Os bactericidas têm efeito letal sobre bactérias, enquanto que os bacteriostáticos inibem o seu metabolismo e a sua multiplicação.

## **2.10 Resistência a Antibióticos**

A resistência a antibióticos adquirida por micro-organismos, especialmente bactérias, constitui preocupação mundial, sendo objeto das mais atuais publicações sobre antimicrobianos. Os antibióticos são medicamentos que influenciam não apenas o paciente em tratamento, mas todo o ecossistema onde ele está inserido<sup>(56)</sup>. O contínuo uso de antimicrobianos tem contribuído com o aumento da resistência de várias bactérias a antimicrobianos comuns.

O uso de antibióticos na medicina humana, tanto hospitalar quanto ambulatorial, é fortemente influenciado por fatores culturais e econômicos. A prevalência das infecções e o conseqüente consumo dos medicamentos para tratá-las acarretam muitos erros de prescrição, relacionados à incerteza diagnóstica e desconhecimento farmacológico. Há problemas de indicação, seleção e prescrição de antibióticos. Há ainda o uso de antibióticos como medicamentos sintomáticos. É comum o não reconhecimento de que antimicrobianos são medicamentos específicos e, portanto, eficazes apenas para determinados agentes infecciosos<sup>(56)</sup>.

Em relação ao uso veterinário, inúmeros estudos na União Européia<sup>(61)</sup> apontam a existência de uma evidente relação entre o uso de antibióticos como fator de crescimento na criação de animais com a propagação e transferência de genes de resistência de micro-organismos associados a esses animais para micro-organismos

patógenos que infectam os seres humanos. Mesmo baixas doses de antibióticos utilizados para fins não terapêuticos promovem seleção de espécies resistentes a esses compostos. Os estudos apontam que a resistência a antibióticos usados em seres humanos é determinada pelo mesmo mecanismo que aquele que surge quando usado em animais. Sabe-se também que os genes de resistência se disseminam via cadeia alimentar para a microbiota intestinal dos humanos <sup>(61)</sup>. Face ao risco de efeitos adversos e de aumento da resistência, somente se justifica a antibioticoterapia quando feita apropriadamente. Tanto na atenção clínica individual quanto em saúde pública é necessário atentar para boas práticas de seleção e prescrições de antibióticos. Além disso, especialmente para o uso veterinário, é importante que se estabeleça um arcabouço jurídico sólido, além de mecanismos de fiscalização e punição eficazes que coíbam o uso abusivo e de má-fé. Outras ações imprescindíveis estão relacionadas com a ampliação do saneamento básico relacionado com o correto tratamento das águas residuais dos centros urbanos e dos efluentes oriundos da criação de animais.

Segundo relatório de janeiro de 2008 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária <sup>(62)</sup>, os *Enterococcus* resistentes a antibióticos encontram-se amplamente distribuídos nos alimentos. Eles já foram detectados em carnes e produtos derivados, leites e derivados, dentre outros tipos de alimentos destinados ao consumo humano. O relatório indica resultados de estudos que apontam para a ligação entre antibióticos utilizados em animais de produção e a presença de *Enterococcus* resistentes a antibióticos em humanos, sendo esta transmissão ocorrida via cadeia alimentar, mostrando que a presença destes micro-organismos nos alimentos podem carrear ao homem potenciais fatores de virulência que podem comprometer a sua saúde <sup>(62)</sup>.

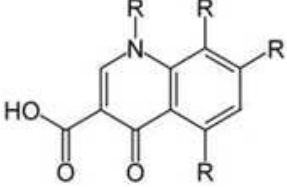
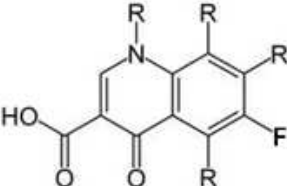
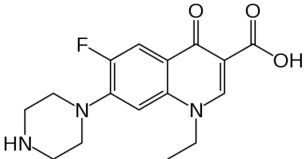
A resistência microbiana pode ser classificada como natural ou intrínseca, e adquirida. A resistência natural decorre de uma propriedade comum aos microrganismos da espécie, tal qual a que ocorre com os bastonetes Gram-negativos (*Escherichia coli*, *Proteus*) resistentes à penicilina G. Essas bactérias sintetizam enzimas que clivam esse antibiótico, denominadas beta-lactamases, e possuem, além disso, envoltórios que dificultam o acesso da penicilina ao seu alvo molecular. A resistência adquirida é resultante da aquisição de mecanismos normalmente ausentes nas bactérias da espécie em questão. A maioria dos *Staphylococcus aureus* isolados não apresentavam, a princípio, resistência à penicilina G. Porém, já nos primeiros anos de uso desse antibacteriano, foram detectadas linhagens resistentes <sup>(62)</sup>.

As bactérias podem apresentar resistência em função de três principais mecanismos: a inativação enzimática da molécula do antibiótico; a alteração do alvo celular deste agente e a redução do antibiótico em nível intracelular <sup>(63)</sup>. A inativação enzimática decorre da ação de enzimas bacterianas sobre o princípio ativo do antimicrobiano, como ocorre em *S. aureus* produtores de enzimas beta-lactamases (penicilinase e cefaloporinase) que hidrolisam o anel beta-lactâmico de penicilinas e cefalosporinas. O segundo mecanismo de resistência consiste em alterar a estrutura da molécula-alvo da molécula do antimicrobiano. Como exemplo, citam-se os *enterococcus* resistentes à vancomicina que substituem o resíduo de alanina por lactato, reduzindo a afinidade da vancomicina pelo seu alvo bacteriano. Por último, bactérias podem apresentar resistência quando possuem mecanismos para reduzir a concentração intracelular do antimicrobiano, como as bombas de efluxo. Este mecanismo é utilizado por estafilococos resistentes a antibióticos macrolídios, como a eritromicina <sup>(64)</sup>.

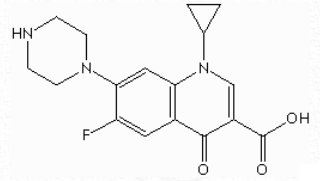
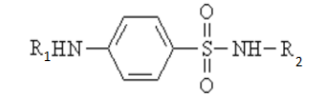
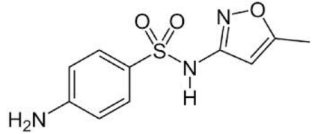
## **2.11 Fármacos Abordados no Presente Trabalho**

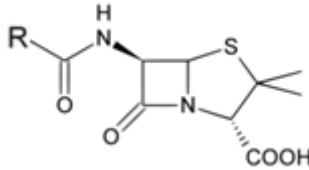
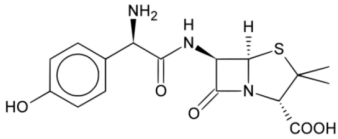
Cinco diferentes medicamentos foram abordados neste trabalho: uma estatina e quatro antibióticos. O Quadro 9 apresenta um resumo de informações em relação a esses compostos.

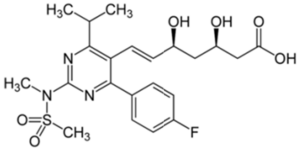
Quadro 9 – Resumo dos compostos abordados no presente trabalho

Classe/ Medicamento	Informações Gerais	Estrutura
<b>Quinolonas</b>	Ativas contra bactérias Gram-negativas. As espécies de <i>Pseudomonas</i> e as bactérias Gram-positivas, incluindo estafilococos e enterococos, não são sensíveis a elas. Atuam intracelularmente inibindo a subunidade A da enzima DNA-girase, essencial para a síntese do DNA bacteriano. Os micro-organismos não desenvolvem resistência a elas rapidamente. Há resistência cruzada entre elas <sup>(56)</sup> .	
<b>Fluoroquinolonas</b>	<p>Relacionadas ao ácido nalidíxico, uma quinolona com atividade antibacteriana, sintetizada e patenteada em 1962 por Lescher e colaboradores <sup>(56, 65)</sup>.</p> <p>A presença do grupo piperazínico confere-lhes atividade antipseudomonas, ao passo que o átomo de flúor faz aumentar a potência contra micro-organismos Gram-negativos em geral e ampliar o seu espectro de ação para incluir os Gram-positivos.</p> <p>Atuam intracelularmente inibindo a subunidade A da enzima DNA-girase, essencial para a síntese do DNA bacteriano, pela estabilização do complexo formado entre DNA e topoisomerases <sup>(65)</sup>.</p> <p>A resistência às fluoroquinolonas é devida, principalmente a mecanismo de bombeamento para fora da célula. Mecanismo menos comum de resistência incluem mutações via enzimas topoisomerase, que reduzem a sua afinidade com o agente bactericida. Também ocorre a alteração dos poros na camada externa da membrana de organismos gram-negativos que limitam o acesso do bactericida <sup>(65)</sup>.</p>	
<b>Norfloxacin</b> (C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> F) [M+H] <sup>+</sup> = 320,14050 Da	<p>É um ácido-quinolino-carboxílico de administração oral com ação antibacteriana. Possui largo espectro de atividade antibacteriana contra patógenos aeróbios Gram-positivos e Gram-negativos. O átomo de flúor na posição 6 proporciona potência superior contra organismos Gram-negativos, e o núcleo piperazínico na posição 7 é responsável pela atividade antipseudomonas. O norfloxacin inibe a síntese de ácido desoxirribonucléico bacteriano. Essa fluoroquinolona atinge altas concentrações apenas na urina, por isso seu maior uso é no</p>	



	tratamento de infecções do trato urinário <sup>(56)</sup> .	
<p><b>Ciprofloxacino</b> (C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>F) [M+H]<sup>+</sup> = 332.14050 Da.</p>	<p>Possui amplo espectro, boa biodisponibilidade, boa penetração tecidual, meia-vida relativa longa, segurança e menor indução de resistência bacteriana em comparação aos agentes mais recentemente introduzidos no mercado <sup>(57)</sup>. O Ciprofloxacino deve ser reservado ao tratamento de infecções causadas por bactérias Gram negativas multirresistentes, incluindo <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, pois apresenta as menores concentrações inibitórias contra bacilos Gram negativos. Sua atividade é limitada contra <i>Staphylococcus aureus</i> e pneumococos e é praticamente nula contra estreptococos em geral. Estudos ambientais mostram que produtos de transformação provenientes da fotólise do ciprofloxacino possuem potencial genotóxico, pois apresentam a capacidade de causar a clivagem do DNA <sup>(27)</sup>.</p> <p>O uso abusivo determina crescente resistência. O mecanismo de ação do ciprofloxacino decorre do bloqueio da função da DNA-girase, prejudicando o metabolismo bacteriano <sup>(56)</sup>.</p>	
<p><b>Sulfonamidas</b></p>	<p>São pós cristalinos brancos, geralmente pouco solúveis em água, mas seus sais sódicos são hidrossolúveis. Foram os primeiros agentes quimioterápicos eficazes usados no homem para profilaxia e cura de infecções bacterianas. Constituíam a principal terapêutica antibacteriana antes do advento da penicilina <sup>(56)</sup>.</p> <p>São ativas contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bem como contra determinados protozoários e alguns fungos <sup>(56)</sup>.</p> <p>As sulfonamidas não possuem a propriedade de matar as células bacterianas. Apenas previnem o crescimento celular e sua multiplicação, por isso são bacteriostáticos <sup>(65)</sup>.</p>	
<p><b>Sulfametoxazol</b> (C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S) [M+H]<sup>+</sup> = 254,05939 Da</p>	<p>Pertence à classe de quimioterápicos denominados sulfonamidas, sendo sua estrutura molecular básica o <i>p</i>-aminobenzenossulfonamida. Possui atividade contra bactérias e protozoários <sup>(56)</sup>. O sulfametoxazol é metabolizado no corpo humano, sofrendo hidroxilação e N4 acetilação, sendo excretado via urina. Aproximadamente 50% da dose administrada é excretada na forma do metabólito inativo N4-acetilsulfametoxazol. Porém, existem grandes evidências da retransformação do N4-acetilsulfametoxazol para sua forma ativa durante o processo biológico do tratamento de efluentes <sup>(66)</sup>.</p>	

	<p>Os produtos de transformação da fotólise do sulfametoxazol apresentam grande estabilidade, o que pode causar um impacto ambiental significativo quando essa substância sofre fotodegradação em condições naturais <sup>(38)</sup>. Os resultados de ensaios de toxicidade obtidos com <i>D. magna</i> durante a fotólise do sulfametoxazol por 30 h demonstraram um aumento na toxicidade, o que leva a conclusão que ocorre a formação de produtos tóxicos durante a sua fotólise <sup>(38)</sup>.</p>	
<p><b>Penicilinas</b></p>	<p>São derivadas do ácido 6-aminopenicilânico. Por terem o anel beta-lactâmicos (fundido com o anel tiazolidínico), são conhecidas também, junto com as cefalosporinas, como antibióticos beta-lactâmicos. O anel beta-lactâmico é muito tenso, o que explica a sua alta reatividade. São inativadas por hidrólise e pelas enzimas acilases e beta-lactamases. O anel beta-lactâmico intacto é essencial para a atividade biológica, ao passo que a cadeia lateral determina o espectro antibacteriano, a sensibilidade a ácidos e beta-lactamases e as propriedades farmacocinéticas <sup>(56)</sup>.</p> <p>A resistência a penicilinas pode ser originada de várias formas e pode estar relacionada com fatores como tipo de barreira física (parede celular), presença de enzimas <math>\beta</math>-lactamases, altos níveis de produção de enzima transpeptidase, afinidade da enzima transpeptidase com a penicilina, processos de transporte das penicilinas para fora da membrana, mutação e transferência genética <sup>(56, 65)</sup>.</p>	
<p><b>Amoxicilina</b> (C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S) [M+H]<sup>+</sup> = 366,1118 Da</p>	<p>É uma aminopenicilina semi-sintética do grupo dos <math>\beta</math>-lactâmico. É um dos mais importantes antibióticos dessa classe e possui amplo espectro de atividade, tanto contra micro-organismos Gram-positivos quanto Gram-negativos, agindo através da inibição da biossíntese do mucopeptídeo das paredes das células das bactérias<sup>(56)</sup>.</p> <p>É muito empregada para uso veterinário e humano, especialmente no tratamento e prevenção de infecções bacterianas respiratórias, gastrointestinal, do trato urinário e de pele <sup>(67)</sup>.</p> <p>A amoxicilina, assim como outros <math>\beta</math>-lactâmicos, possui estabilidade um tanto limitada, em vista da presença de anel de 4 membros em sua estrutura. Possui ponto isoelétrico de 4,8. Ela é sensível a meio com de pH muito ácido. É termolábil e instável em álcool e isomeriza em ambiente ácido, o que requer que sejam adotados certos cuidados e precauções durante as análises dessa substância <sup>(14)</sup>. Aproximadamente 50% a 70% da Amoxicilina</p>	

	<p>são excretados inalterados na urina nas primeiras 6 a 8 horas após a administração de uma dose padrão. A Amoxicilina também é parcialmente eliminada pela urina como ácido penicilóico inativo, em quantidades de aproximadamente 20% da dose inicial. Atravessa a barreira placentária e é excretada no leite <sup>(56)</sup>.</p> <p>A utilização de amoxicilina na pecuária pode resultar na presença de resíduos em derivados de origem animal. Esses resíduos podem provocar alergia ou hipersensibilidade a essas substâncias, além de aumentar a resistência de micro-organismos, como <i>helicobacterpylori</i> a penicilinas. A União Européia estabeleceu o limite máximo para resíduos de produtos medicinais veterinários em alimentos de origem animal. O uso de amoxicilina é proibido em animais utilizados na produção de ovos para consumo humano. Para outros casos, o uso é permitido, desde que respeitadas certas restrições. Para tecidos animais, o limite máximo de resíduos é de 50 µg kg<sup>-1</sup>. Para leite, o limite é de 4 µg kg<sup>-1</sup> <sup>(68)</sup>.</p>	
<p><b>Estatinas</b></p>	<p>São medicamentos que inibem a enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase. Elas revolucionaram o tratamento da hipercolesterolemia e são os agentes de redução plasmática de colesterol mais eficiente. Os estudos mostram que esses compostos reduzem o progresso de aterosclerose e podem induzir a sua regressão, diminuindo as suas complicações e a mortalidade <sup>(69)</sup>. As estatinas podem ser classificadas segundo critérios de suas propriedades físico-químicas, de como são obtidas, do seu metabolismo no fígado e da sua atividade específica <sup>(69)</sup>.</p>	<p>-----</p>
<p><b>Rosuvastatina</b> (C<sub>22</sub>H<sub>28</sub>N<sub>3</sub>SO<sub>6</sub>F) [M+H]<sup>+</sup>= 482,17556 Da</p>	<p>A rosuvastatina (ácido ((3R,5S,6E)-7-[4-(4-fluorfenil)-2-(N-metil metano sulfonamida)-6-(propan-2-il)pirimidin-5-il]-3,5-di hidroxihex-6-ênico) é um fármaco do grupo das estatinas e é utilizado no tratamento da hipercolesterolemia e condições relacionadas, o que a torna um importante medicamento nas terapias de prevenção das doenças cardiovasculares.</p> <p>Assim como outras estatinas, a rosuvastatina (RST) atua como inibidor competitivo da <i>HMG-CoAredutase</i> reduzindo a produção endógena do colesterol <sup>(69)</sup>. O consumo de estatinas, especialmente da RST, tem aumentado ao longo dos últimos anos <sup>(70)</sup>. Como consequência, tem se tornado um contaminante ambiental relevante. Na Noruega, o uso de estatinas em 1996 foi de 20 doses diárias definidas (DDD) para cada 1000</p>	 <p>The image shows the chemical structure of Rosuvastatin. It features a central pyrimidine ring system. One nitrogen atom is substituted with a methyl group (H<sub>3</sub>C) and a methanesulfonyl group (-SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). The other nitrogen atom is substituted with a methyl group (H<sub>3</sub>C) and a propan-2-yl group (-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). The 2-position of the pyrimidine ring is substituted with a 4-fluorophenyl group (-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>F). The 5-position of the pyrimidine ring is substituted with a 3,5-dihydroxyhex-6-enoic acid side chain (-CH=CH-CH(OH)-CH(OH)-CH<sub>2</sub>-COOH).</p>

	<p>habitantes. Em 2004, alcançou a marca de aproximadamente 110 <sup>(70)</sup>. De acordo com o IMS Health, a rosuvastatina foi o terceiro medicamento mais vendido nos Estados Unidos em 2012. Na Europa, as estatinas foram encontradas em 36% das amostras de efluentes analisadas, na concentração máxima de 979 ng L<sup>-1</sup> <sup>(71)</sup>.</p> <p>Estudos de toxicidade <i>in silico</i> através do uso das ferramentas denominadas de TOPKAT e DEREK mostraram que a rosuvastatina e os seus subprodutos da degradação são potencialmente carcinogênicos devido a presença de derivados de pirimidina <sup>(41)</sup>. Adicionalmente, estudos da toxicidade da rosuvastatina relacionados com mexilhão <i>Lampsilis siliquoidea</i> demonstraram que a taxa de alimentação diminui e a quantidade de tempo que mexilhões sub-adultos gastam com suas válvulas fechadas aumentam, quando submetidas a altas exposições a rosuvastatina <sup>(72)</sup>. Por essas razões, o desenvolvimento de um efetivo tratamento de efluentes que possuam essas substâncias é necessário para avaliar e prevenir um potencial impacto negativo ao meio ambiente.</p>	
--	---	--

Conforme citado anteriormente, pretende-se com este trabalho estabelecer uma metodologia que possa ser aplicada no estudo dos produtos de transformação/degradação de fármacos de uso humano e veterinário, através da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. A metodologia também irá contemplar a utilização da química computacional como ferramenta auxiliar para elucidação estrutural das moléculas e será aplicada na determinação dos produtos de transformação/degradação originados da fotocatalise da rosuvastatina na presença de ZnO, além dos produtos de transformação/degradação da fotólise direta do ciprofloxacino, norfloxacino e sulfametoxazol. Também será conduzido um estudo em relação à análise da amoxicilina por LC-MS/MS, especialmente voltado à quantificação da AMX em leite bovino.

### **3. PARTE EXPERIMENTAL**

As análises relatadas no presente trabalho foram realizadas em cromatógrafo a líquido da marca Agilent Technologies, modelo 1260 Infinity, acoplado a um espectrômetro de massas ABSCIEX TripleTOF 5600. Após as análises por LC-Q-TOF-MS/MS, os dados obtidos foram tratados com o software PeakView, versão 1.2.0.3 da AB SCIEX. A estimativa de quantificação da rosuvastatina foi realizada através do software MultiQuant versão 2.1.1 da AB SCIEX. Para a quantificação da amoxicilina transferida para o leite bovino foi utilizado um espectrômetro de massas em modo MRM (triplo-quadrupolo em modo tandem API 5000, marca Applied Biosystems) acoplado a um cromatógrafo a líquido (1100 Series, marca Agilent Technologies). Todos os instrumentos são de propriedade do Laboratório Nacional de Agropecuária instalado em Porto Alegre RS (Lanagro-RS).

As propostas dos produtos de transformação (TPs) foram elaboradas com base na seguinte estratégia resumida: (i) na massa exata encontrada no modo de análise MS, sempre se levando em consideração o erro máximo de massa de 5 ppm; (ii) na análise da distribuição isotópica obtida pelo espectro MS de cada composto, tanto para se avaliar a presença de heteroátomos, quanto para se estimar o número aproximado de átomos de carbono pela razão de intensidade do sinal do composto formado exclusivamente por átomos de  $^{12}\text{C}$  e aquele em que estava presente um átomo de  $^{13}\text{C}$ ; (iii) nos valores de RDBE para confirmar o número de insaturações presentes na

molécula; (iv) na análise estrutural da molécula de origem para avaliar se a estrutura proposta para o produto de transformação era condizente com o composto que o originou; (v) nos fragmentos gerados nos experimentos no modo MS/MS para avaliar se as perdas neutras e fragmentos CID gerados faziam sentido. Em alguns compostos foram conduzidos estudos computacionais para auxiliar na determinação da estrutura dos mesmos. A estratégia é apresentada de forma mais detalhada no capítulo 4.

### 3.1 Experimentos de Fotocatálise da Rosuvastatina

Todas as amostras utilizadas para a identificação dos produtos de degradação da Rosuvastatina foram cedidos por Tiele Caprioli Machado, com autorização de sua orientadora, Profa. Marla Azário Lansarin, e fez parte de sua dissertação de mestrado<sup>(73)</sup>. Resumidamente, foi utilizado a rosuvastatina na forma de sal de cálcio (99,3% de pureza) adquirida da Johnson Pharmacy e óxido de zinco fornecido pela Merck (99% de pureza), com área específica de  $5 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ . Para ajuste do pH em 7,0 foi utilizado ácido sulfúrico e hidróxido de sódio. Os experimentos de fotocatalise foram realizados em tubos de vidro borossilicato de capacidade de 300 mL. A radiação ultravioleta foi gerada por uma lâmpada de vapor de mercúrio modificada (Philips HPL-N 125 W) com emissão UV-A em 365 nm. A radiação incidente na amostra foi  $5,4 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$  e foi determinada no início de cada experimento com um radiômetro (Cole-Parmer Instrument, Radiometer 9811) colocado sobre o tubo de vidro. Os ensaios de degradação foram realizados em dois estágios. No primeiro, foi estabelecido o equilíbrio de adsorção-dessorção da rosuvastatina na superfície do catalisador. Essa etapa foi realizada no escuro durante 60 minutos. O segundo estágio se refere à reação de fotocatalise com ZnO sob luz UV. Durante esse segundo estágio, as amostras foram coletadas nos intervalos pré-estabelecidos de 0, 5, 30, 60, 120, 180, 240 e 300 minutos e congeladas até o momento da análise.

Os experimentos de fotodegradação foram realizados em água desmineralizada e a concentração inicial empregada para o fármaco foi de  $26,33 \text{ mg L}^{-1}$ . Essa concentração é bem superior àquela encontrada nos cursos de água contaminados por essa substância. O emprego de um valor relativamente elevado foi escolhido para tornar possível o monitoramento do processo de degradação por um tempo maior (240 minutos) e para garantir que os produtos de transformação estivessem presentes em uma concentração adequada para as análises. O fotocatalisador foi utilizado na “dose” fixa de  $550 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ .

Cabe ressaltar que informações adicionais em relação ao catalisador não estão disponíveis em virtude de pedido de registro de patente.

### **3.2 Experimentos de Fotólise do Sulfametoxazol, Ciprofloxacino e Norfloxacino**

Os experimentos de fotólise foram realizados com soluções de NFX, CPX e SMX em água destilada e em uma concentração inicial de  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  dos compostos. Frascos de vidro borossilicato com capacidade de 2000 mL foram utilizados como reator. A fotólise foi realizada com uma lâmpada de vapor de mercúrio com potência de 150 W e com agitação constante. A intensidade da radiação foi mantida constante durante todo o experimento e as amostras foram iluminadas lateralmente. A temperatura foi monitorada durante todo o processo e não ultrapassou os  $35^\circ \text{C}$ .

### **3.3 Experimento com Amoxicilina**

O experimento com animais foi conduzido por equipe do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e foi previamente autorizado pela Comissão de Ética de Uso Animal do Lanagro RS.

Em um bovino leiteiro sadio e de raça indefinida, com 400 kg, de propriedade da Fepagro (Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária) foi administrado por via intramuscular o medicamento de uso veterinário Bactosina® na dose de 1 mL para cada 20 kg. Após 24 horas, foi feita uma segunda aplicação na mesma dose. O medicamento é a base de amoxicilina trihidratada na concentração de  $172,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , que equivale a  $150 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de amoxicilina. Antes da aplicação do medicamento foi feita uma coleta de leite para servir como “branco”. Após a primeira aplicação foi realizada a coleta de leite em intervalos intercalados a cada 8 h e 16 h, até um tempo de 104 horas consecutivas. As amostras foram colhidas em triplicata e guardadas em nitrogênio líquido até o momento da análise.

O preparo das amostras foi conduzido segundo o protocolo utilizado pelo Laboratório Nacional de Agropecuária (LANAGRO-RS) do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento nas suas análises realizadas para o monitoramento de resíduos de medicamentos em leite:

- 2 mL de cada amostra de leite foram transferidos para tubos de centrifuga de 50 mL;

- adicionou-se 4 mL de acetonitrila em alíquotas de 2 mL , 1 mL e 1 mL, com agitação manual de cerca de 10 segundos entre uma adição e outra;
- os tubos foram colocados em um agitador de bancada por 10 minutos, com posterior centrifugação refrigerada (-5°C) durante 10 minutos e 3000 rpm (3189 g);
- 4 mL do sobrenadante foram transferidos para tubos *falcon* com capacidade para 50 mL, contendo 100 mg de C18 *bulk*;
- agitação em vórtex por aproximadamente 15 segundos, seguida de centrifugação sob refrigeração (-5°C) por 10 minutos a 3000 rpm (3189 g);
- o sobrenadante foi transferido para tubos de polipropileno de 15 mL e as amostras foram refrigeradas por 20 minutos em freezer a -18 °C, com posterior centrifugação sob refrigeração por 10 minutos (-5°C) a 4000 rpm (5670 g);
- o sobrenadante foi transferido para tubos *falcon* de 50 mL e as amostras foram evaporadas com fluxo de nitrogênio e em banho termostático a 45°C até a redução do volume para aproximadamente 0,5 mL;
- após a transferência para *vial* com capacidade de 1,5 mL, o volume da amostra foi ajustado com água ultrapura para 1mL.

Também foram preparadas amostras para a curva de calibração com 10 pontos e amostras fortificadas com o analito para a determinação do fator de recuperação.

As tentativas de identificação dos metabólitos presentes no leite foram conduzidas mediante análise por LC-Q-TOF-MS. A quantificação foi realizada com um espectrômetro híbrido triplo-quadrupolo.

### **3.4 Condições para Análise por Cromatografia a Líquido Acoplada à Espectrometria de Massas**

Para as análises cromatográficas utilizou-se acetonitrila (grau HPLC) da Merck (Darmstadt, Alemanha), ácido fórmico J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, EUA) água dionizada ultra pura (resistividade <18.2 MΩ cm) obtida através de sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). As análises cromatográficas para a identificação dos produtos de transformação e metabólitos foram realizadas em cromatógrafo líquido marca Agilent Technologies 1260 Infinity acoplado a um espectrômetro de massas ABSCIEX TripleTOF 5600. As análises cromatográficas destinadas à quantificação da Amoxicilina foram realizadas em cromatógrafo a Líquido marca Agilent 1100 Series acoplado a um espectrômetro de massas API 5000 da Applied Biosystems.



A separação cromatográfica das amostras de ciprofloxacino, norfloxacino e sulfametoxazol foram realizadas através de coluna Zorbax SB-C18 da Agilent ( $4,6 \times 15 \text{ mm} \times 3,5 \text{ }\mu\text{m}$ ). Para separação da rosuvastatina e para a amoxicilina utilizou-se uma coluna C18 Symmetry da Waters ( $4,6 \times 75 \text{ mm} \times 3,5 \text{ }\mu\text{m}$ ), mantida à temperatura de  $40^\circ\text{C}$  durante as análises. Para as análises de sulfametoxazol, ciprofloxacino e norfloxacino, o volume de amostra foi  $20 \text{ }\mu\text{L}$  e a vazão da fase móvel,  $500 \text{ }\mu\text{L}/\text{min}$ . Para as análises de rosuvastatina e amoxicilina o volume injetado foi de  $10 \text{ }\mu\text{L}$  e a vazão da fase móvel para a análise da rosuvastatina foi de  $300 \text{ }\mu\text{L}/\text{min}$  e para a amoxicilina foi  $200 \text{ }\mu\text{L}/\text{min}$ .

As primeiras análises de todos os fármacos foram realizadas em um tempo total de análise cromatográfica entre 15 e 20 minutos (dados não apresentados para o sulfametoxazol, ciprofloxacino e norfloxacino), tempo recomendado nos métodos oficiais do Lanagro/RS para a quantificação, por exemplo, de resíduos de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos em leite. Esse tempo acabou se mostrando insuficiente para uma separação cromatográfica adequada à identificação dos potenciais produtos de transformação do sulfametoxazol, ciprofloxacino e norfloxacino em modo MS. Assim, foram realizadas novas análises com um tempo total de 68 minutos. Para a rosuvastatina, o tempo de 20 minutos se mostrou suficiente. Para a quantificação da amoxicilina, o tempo de análise foi de 18 minutos. As análises em que se buscava a identificação dos metabólitos transferidos ao leite não foram refeitas pelos motivos que serão discutidos mais adiante.

Nos Quadros 10, 11 e 12 são apresentadas as condições do gradiente para a separação cromatográfica.

Quadro 10 – Gradiente da fase móvel para análise das amostras de sulfametoxazol, ciprofloxacino e norfloxacino.

<b>Tempo (min)</b>	<b>A (%)</b>	<b>B (%)</b>
0	90	10
50	5	95
63	5	95
68	90	10

Fase A: água com 0,1% de ácido fórmico

Fase B: acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico

Quadro 11 Gradiente da fase móvel para análise das amostras de amoxicilina.

<b>Tempo (min)</b>	<b>A (%)</b>	<b>B (%)</b>
0	95	5

5	95	5
8	5	95
13	95	95
18	95	5

Fase A: água com 0,1% de ácido fórmico

Fase B: acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico

Quadro 12 Gradiente da fase móvel para análise das amostras de rosuvastatina.

<b>Tempo (min)</b>	<b>A (%)</b>	<b>B (%)</b>
0	98	2
1	98	2
15	10	90
17	10	90
20	98	2

Fase A: água com 0,1% de ácido fórmico

Fase B: acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico

No Quadro 13 são citadas as condições de operação do Espectrômetro de Massas Q- TOF ABSCIEX TripleTOF 5600 e no Quadro 14, as utilizadas para o triplo-quadrupolo API 5000.

Quadro 13 – Condições de operação do espectrômetro de massas em modo MS com critério IDA da Análise ESI(+) para os antibióticos e para rosuvastatina.

<b>Parâmetro</b>	<b>MS*</b>	<b>MS/MS*</b>	<b>MS**</b>	<b>MS/MS**</b>
Ionização	ESI +	ESI +	ESI +	ESI +
Faixa de m/z (Da)	100 – 1000	100 – 1000	100 – 1000	100 – 1000
Tempo de acumulação (s)	0,5000	0,1000	0,5000	0,1000
Energia de colisão (eV)	10	35 ± 15	10	35 ± 15
GS1 (psi)	55	55	50	50
GS2 (psi)	55	55	50	50
CUR (psi)	25	25	15	15
Temperatura da fonte de ionização (°C)	700	700	400	400
Voltagem do cone (V)	4500	4500	4500	4500

(\*) condições para o sulfametoxazol, norfloxacino e ciprofloxacino

(\*\*) condições para rosuvastatina e amoxicilina

Quadro 14 – Condições de operação no espectrômetro API 5000 para quantificação da amoxicilina.

<b>Parâmetro</b>	<b>Valor</b>
Íon monitorado MS (Da)	366,1

Ion quantificador (Da)	114,0
Íon qualificador (Da)	207,9
Energia de colisão (eV)	20
GS1 (psi)	50
GS2 (psi)	50
CUR (psi)	20
Temperatura da fonte de ionização (°C)	400
Voltagem do cone (V)	5500

Para algumas das amostras de rosuvastatina, além das análises em modo MS com critério IDA, foram conduzidas análises em modo *Product ion Scan*. Os parâmetros que divergem do Quadro 13 são: faixa de massa para o modo MS: 100 a 1000 Da e modo MS/MS 50 a 500 Da. Além disso, foram realizados dois experimentos distintos: um com energia de colisão (MS/MS) fixa em 30 eV e outro, com 47 eV.

### 3.5 Parâmetros Computacionais.

Para alguns produtos de transformação (rosuvastatina e sulfametoxazol) foram conduzidos cálculos computacionais para auxiliar a tarefa de elucidação da estrutura de alguns produtos de transformação em que não foi possível estabelecer a posição da hidroxila através da análise dos espectros MS/MS. Assim, foram construídas formas isoméricas e conduzidos cálculos teóricos para avaliar a geometria e energia de cada estrutura proposta. Os cálculos foram conduzidos com otimização irrestrita completa, aplicando-se a teoria do funcional de densidade (DFT, do inglês, *Density Functional Theory*) ao nível B3LYP. Todos os átomos foram representados pelo conjunto de bases 6-311G++ (d,p). Todos os cálculos foram realizados com o programa Gaussian 09, utilizando-se procedimentos e parâmetros padrão.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Estabelecimento da Metodologia da Identificação dos Produtos de Transformação por LC-Q-TOF-MS/MS

Apresenta-se a seguir a proposta de metodologia para a identificação de produtos de transformação/degradação de fármacos, gerados a partir de processos oxidativos

avançados. Na sequência, essa metodologia é aplicada na identificação de produtos de transformação/degradação da rosuvastatina, sulfametoxazol, ciprofloxacino e norfloxacino. Outros estudos relacionados com produtos de transformação/degradação em sistemas similares aos aqui apresentados podem ser conduzido conforme a metodologia a seguir descrita, realizando-se as eventuais adequações necessárias para atender a particularidades de cada sistema.

Durante os experimentos de fotólise, fotocátalise ou transferência de medicamentos e resíduos para um determinado fluído, devem ser coletadas amostras em intervalos que permitam um acompanhamento adequado das mudanças no sistema. Para processos lentos, o intervalo pode ser de horas ou dias. Para reações rápidas, minutos ou segundos. Como exemplo, cita-se o caso do experimento de fotocátalise da rosuvastatina realizado neste trabalho. Foram coletadas amostras em tempo de reação igual a zero, 5, 15, 30, 60, 120, 180, 240 e 300 minutos. Salienta-se que as amostras coletadas devem ser armazenadas em condições que garantam a preservação da sua integridade e da sua composição original.

Antes de se realizar as análises para obtenção dos dados definitivos que serão utilizados na identificação e eventual quantificação dos compostos, devem ser estabelecidas as condições de operação dos instrumentos utilizados. Em relação à cromatografia, devem ser conduzidos estudos e experimentos para definição dos parâmetros de análise, como: tipo coluna, tempo de eluição, fase móvel, gradientes, vazão, temperatura, quantidade de amostra injetada e demais parâmetros relevantes para que se tenha uma separação adequada dos analitos. Os parâmetros do espectrômetro de massas devem ser otimizados de acordo com o modo de análise e das informações que se pretende obter. No caso de um equipamento com fonte de ionização ESI, normalmente se considera: modo de análise (se negativo ou se positivo), temperatura da fonte de ionização, vazão dos gases, diferença de potencial no cone, faixa de massas que se pretende analisar e energia de colisão. Um dos parâmetros mais críticos, que depende das características estruturais dos analitos, é a energia de colisão. Na verdade, essa é a energia com a qual o íon é acelerado antes de ingressar na câmara de colisão (normalmente um quadrupolo ou hexapolo) para colidir com as moléculas do gás inerte rarefeito e gerar os fragmentos chamados de filhos (no caso da análise MS/MS). Para moléculas que não sejam muito diferentes entre si, especialmente em relação aos grupos funcionais, normalmente, quanto maior a massa das moléculas maior a energia de colisão necessária para se obter um espectro MS/MS com uma boa relação entre as

intensidades do íon pseudomolecular e a dos seus fragmentos. Moléculas mais instáveis e com muitos heteroátomos, fragmentam-se mais facilmente, o que implica na necessidade de se realizar a análise com energia de colisão mais branda. Cabe ressaltar que, apesar da unidade de energia de colisão normalmente ser expressa em elétron-Volt (eV), para uma mesma molécula, um dado espectrômetro de massas pode apresentar um valor de energia de colisão ótimo completamente diferente de outro, pois características específicas do projeto de cada equipamento influenciam nesse parâmetro. Dessa forma, muitas vezes se faz necessário realizar algumas análises para se otimizar esse parâmetro, mesmo que o valor da energia já esteja relatado na literatura, exceto quando se tratar de equipamentos idênticos.

Muitos equipamentos permitem uma programação da energia em função da massa dos íons. Para isso, constrói-se uma tabela com as faixas de massa e a energia de colisão correspondente. Isso permite analisar amostras com mistura de compostos com grandes diferenças de massa, haja vista que o equipamento altera automaticamente os valores da energia de colisão com base nas massas das substâncias que estão sendo fragmentadas.

No processo de otimização dos parâmetros acima discutidos já se obtém importantes informações que serão úteis no estudo dos produtos de transformação, como o tempo de retenção, o padrão de fragmentação por CID, áreas e intensidades dos picos.

A etapa seguinte envolve a análise das amostras coletadas em diferentes tempos de reação. É recomendável inicialmente realizar para cada amostra uma análise em modo *full scan* com uma ampla faixa de  $m/z$ . O limite inferior deve ser tal que inclua os menores TPs (produtos de transformação) possíveis de serem encontrados. O limite superior da faixa de  $m/z$  deve ser tal que contemple eventuais adutos. Também se faz necessário avaliar a possibilidade de formação de dímeros, trímeros e, em algumas situações, oligômeros.

Uma alternativa que nos fornece algumas informações adicionais é realizar a análise fornecendo ao *software* do equipamento algum critério para que, além dos valores de massa do modo *full scan*, seja realizada uma análise MS/MS com base em algum critério pré-estabelecido. Um dos critérios mais utilizados é baseado na intensidade do pico cromatográfico. Ele possibilita que o equipamento realize, por exemplo, a análise MS/MS dos picos mais intensos das espécies que eluem da coluna cromatográfica. Esse critério normalmente é chamado de DDA (do inglês, *data-dependent analysis*). Nessa programação, o espectrômetro realiza uma varredura (*full*

*scan*) de todos os íons compreendidos na faixa de massas previamente estabelecida e registra os valores de  $m/z$  e da intensidade. Baseado nesse resultado, será realizada por um breve instante a análise MS/MS do íon mais intenso (caso seja esse o critério escolhido). Ato contínuo, o equipamento realiza a análise do segundo íon mais intenso, e assim sucessivamente até fragmentar o *n-ésimo* íon mais intenso. O valor de “*n*” é estabelecido pelo usuário e tipicamente costuma ser de 1 a 5. Após realizar as “*n*” análises MS/MS, o equipamento realiza uma nova varredura (*full scan*)  $m/z$  dos íons que estão eluindo da coluna para, assim, determinar quais são os novos íons mais intensos e recomeçar o ciclo de fragmentações MS/MS. É importante salientar que quanto maior o número de íons que se define para realizar a análise MS/MS em cada ciclo de varredura, maior é o tempo que o equipamento fica registrando os valores correspondentes aos fragmentos MS/MS. Assim, deve-se evitar ciclos que demorem mais do que 1 ou 2 segundos entre uma varredura *full scan* e outra, caso contrário podem ser perdidas informações de algum composto que elua da coluna cromatográfica durante o período que o equipamento fica registrando apenas os dados das análises MS/MS dos íons que foram elencados como os mais intensos no último ciclo *full scan* realizado.

De posse dos cromatogramas das análises em modo *full scan* de cada amostra nos diferentes tempos de reação, deve-se realizar um minucioso estudo para se buscar quais os picos que apareceram, desapareceram ou tiveram alguma mudança significativa na sua intensidade com o aumento do tempo de reação. O trabalho pode ser realizado manualmente, mas existem softwares específicos para essa finalidade que facilitam muito o trabalho. A amostra com tempo de reação igual a zero é tomada como referência. Quando a comparamos com outra que foi coletada após um certo tempo de reação, o aparecimento de algum pico que não estava presente na amostra de referência indica que este será um candidato a produto de transformação que precisa ser avaliado. A concentração de alguns produtos de transformação pode ser muito baixa, o que resulta em uma resposta muito sutil no cromatograma total de íons. Devido a isso, pode ser difícil ou impossível a detecção visual do pico referente a algum produto de transformação. Para contornar essa dificuldade, podemos obter cromatogramas de íons extraídos. Para tanto, utiliza-se o *software* de tratamento de dados do espectrômetro para gerar um cromatograma constituído apenas pelos íons com  $m/z$  que buscamos. Essa ferramenta é particularmente útil quando queremos verificar a existência ou não de produtos de transformação esperados.

Outra alternativa para encontrarmos produtos de transformação em baixas concentrações é extrair diretamente dos dados das análises MS/MS informações sobre fragmentos específicos. Para tanto, deve-se analisar o espectro MS/MS da substância antes da reação de degradação (padrão) e procurar por fragmentos característicos que também poderiam ser encontrados nos espectros MS/MS dos produtos de transformação. Então, utilizam-se os dados das análises das amostras que foram submetidas às reações de degradação para se executar uma busca dos fragmentos de interesse (extração de íons MS/MS). Informa-se ao *software* os valores das massas desses fragmentos e ele retorna todas as moléculas que os contenham. Para que isso seja possível, é necessário que as análises MS/MS tenham sido realizadas nas amostras com os produtos de transformação. O emprego de algum critério DDA nas análises abre essa possibilidade.

Em reações de degradação como a fotólise, a intensidade dos picos dos produtos de transformação em função do tempo de reação normalmente apresenta um comportamento bastante previsível. A intensidade normalmente aumenta até atingir um máximo para depois diminuir com o aumento do tempo de reação. Isso ocorre em vista de questões cinéticas. No início da reação, a concentração da substância intacta é elevada. Com o avanço da reação, ela é consumida e os produtos de transformação são formados. Porém, à medida que esse produto de transformação é formado, ele também fica suscetível à degradação.

O valor de  $m/z$  dos possíveis candidatos a produto de transformação/degradação obtidos na etapa anterior é utilizado para uma nova análise no espectrômetro de massa, agora no modo *product ion scan*. Para cada amostra coletada em diferentes tempos de reação (da fotólise, fotocátalise...) se deve informar a lista de todos os candidatos a produto de transformação para que seja realizada a fragmentação dos mesmos (análise MS/MS). A faixa de massas a ser analisada no MS/MS deve contemplar os valores mais baixos possíveis (como por exemplo, 40 ou 50 daltons se o equipamento for um Q-TOF) para que fique registrado o máximo de informação possível. Os fragmentos com baixa massa muitas vezes são fundamentais para a elucidação da estrutura da molécula. Em relação ao limite superior da massa da análise MS/MS, não faz sentido que ele seja muito superior ao do íon em determinação se ele for monocarregado, exceto em raras circunstâncias que se formem clusters de fragmentos. Para íons dicarregados ou policarregados, para se estabelecer o limite superior deve ser considerada a massa total da espécie, e não a sua razão  $m/z$ , pois é bastante comum se formarem fragmentos com

valor de  $m/z$  superior ao do íon original, haja vista que pode ocorrer a perda de parte da carga do íon sem que haja uma perda proporcional da sua massa.

Mesmo que na primeira análise já se tenha obtido o espectro de fragmentação pelo critério DDA, o experimento *product ion scan* (MS/MS) deve ser conduzido, pois os resultados obtidos costumam ser de melhor qualidade quando especificamos explicitamente quais íons queremos fragmentar. Essa nova análise é especialmente importante para a quantificação, pois quando se utiliza critérios DDA, podemos perder informação caso o equipamento esteja fragmentando algum outro íon qualquer durante a eluição do íon de interesse.

Com os resultados da análise MS/MS para cada produto de transformação em potencial já é possível quantificá-los com a utilização de softwares que integrem as áreas dos picos, mas pode ser mais conveniente realizar essa operação após a identificação dos produtos de transformação para se evitar a perda de tempo com moléculas que não venham a se confirmar como produtos de transformação.

Através dos valores de massa exata obtidos na análise MS é possível determinar as fórmulas moleculares possíveis com um erro de 5 ppm ou menor. Com base no RDBE, na estrutura original do composto e na distribuição isotópica já se pode propor algumas estruturas. Também é muito importante levar em consideração as reações mais prováveis no processo de degradação empregado. Devem-se considerar as hidroxilações simples ou múltiplas, oxidações, hidroxilações seguidas de eliminação de água, pois elas são muito comuns nos processos de fotólise e fotocatalise. As hidroxilações ocorrem preferencialmente em ligações duplas, tanto aromáticas quanto alifáticas. Um aumento de massa de 15,9949 u sem alteração no valor de RDBE pode indicar a substituição de um hidrogênio de carbono insaturado por uma hidroxila. Uma variação de 34,0055 u, acompanhada de uma diminuição de RDBE em uma unidade, indica a adição de duas hidroxilas em uma ligação dupla. A variação de 31,9898 u.m.a sem alteração no valor de RDBE indica a substituição de dois hidrogênios por duas hidroxilas. Oxidações também são comuns, o que leva ao aparecimento do grupo carbonila. Quando isso ocorre em carbono saturado de cadeia aberta, há o aumento de uma unidade do RDBE e o aumento de massa de 13,9793 u. A oxidação pode ocorrer com a abertura de anéis alifáticos. Se a sua ruptura ocorrer pela quebra de ligação sigma entre dois carbonos, o valor de RDBE permanece inalterado e ocorre um aumento de massa em 18,0106 u, caso ocorra o aparecimento de apenas uma carbonila. Se ocorrer a formação de duas carbonilas, o valor de RDBE aumenta em uma unidade e a massa sofre um acréscimo de



31,9898 u. É importante considerar as alterações de massa apresentadas pelos TPs em relação ao composto original. Com base no valor da massa exata dessa diferença é possível definir quais os grupos de átomos que foram acrescentados ou perdidos pela molécula.

A análise dos fragmentos MS/MS é fundamental para a elucidação das estruturas dos TPs formados que são desconhecidos. Além disso, contribui para confirmar ou refutar as estruturas já suspeitas para os TPs. Na interpretação dos espectros MS/MS é importante levar em consideração as perdas de fragmentos neutros e clivagens mais comuns na fragmentação gerada no processo CID. Perdas de água são extremamente comuns em moléculas com hidroxila. Perdas de amônia ocorrem em compostos nitrogenados, especialmente com o grupo amina. A perda de CO é comum em compostos carbonílicos. Compostos com carboxilas podem apresentar fragmentos gerados a partir de perda neutra de moléculas de água, CO e CO<sub>2</sub>. Também são bastante comuns as perdas de metila, especialmente quando esse grupo for um substituinte de uma cadeia carbônica longa. O local exato em que as clivagens das ligações irão ocorrer durante a fragmentação CID não é fácil de prever, pois o mecanismo ainda não é totalmente compreendido, mas, em alguma medida, depende da localização da carga no íon, de fatores inerentes ao choque com o gás inerte, do estado de transição do íon após o choque, da energia de ativação necessária para romper as ligações e da estabilidade dos compostos formados. As ligações entre o carbono e o nitrogênio do grupo amida devem ser consideradas como um local de ruptura em potencial. Esse é o ponto mais comum de clivagem de peptídeos e proteínas por fragmentação.

A metodologia que está sendo proposta neste trabalho para a elucidação da estrutura de produtos de degradação/transformação de fármacos está representada de forma esquemática na Figura 19.

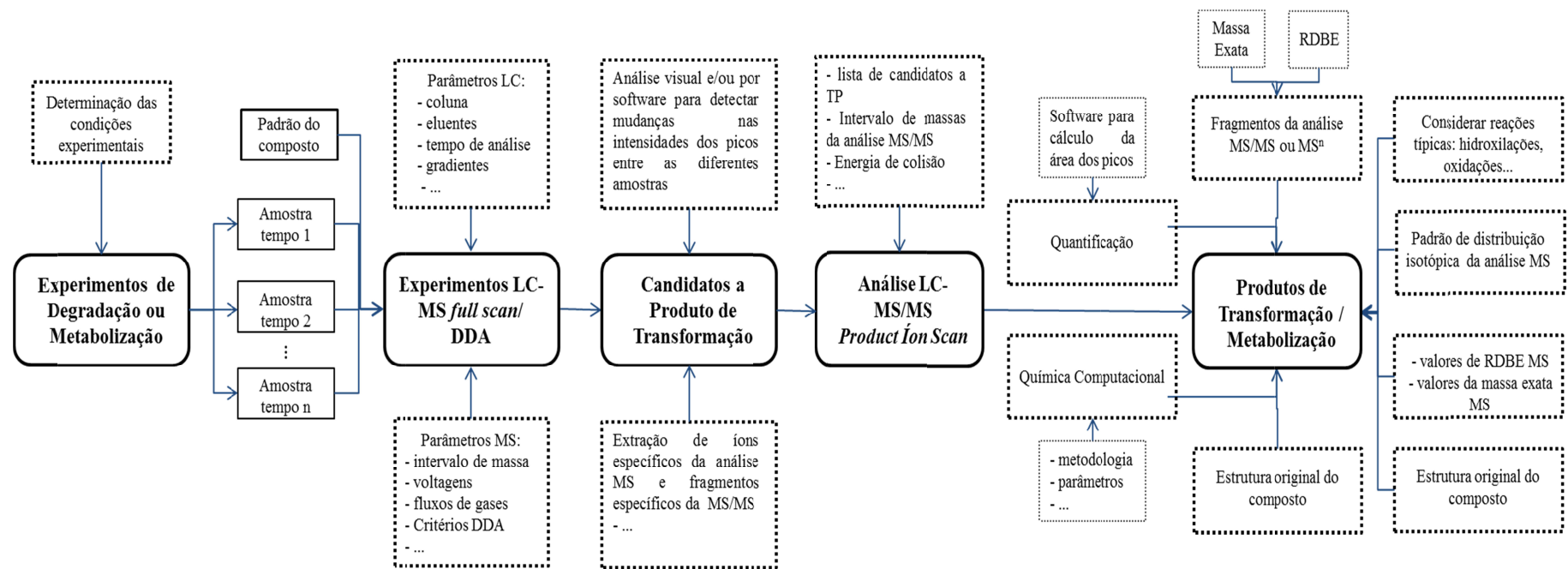


Figura 19 – Representação esquemática do processo de elucidação da estrutura de produtos de transformação.

Ressalta-se que nem sempre é possível elucidar as estruturas dos TPs apenas com a estratégia da Figura 19. Definir a posição em que ocorreu uma hidroxilação em um anel aromático, por exemplo, pode ser impossível apenas com a análise do padrão de fragmentação da molécula, pois nem sempre o espectro MS/MS possui os fragmentos necessários para chegar a essa conclusão. Quando isso ocorre, as ferramentas da química computacional podem ser úteis. Porém, em muitos casos, a confirmação da estrutura de uma molécula exige o emprego de outras técnicas, como a ressonância magnética nuclear.

#### 4.2 Análise do Padrão de Rosuvastatina

A rosuvastatina, apresentada na Figura 20, possui fórmula molecular (M):  $C_{22}H_{28}N_3SO_6F$ . A sua massa teórica  $[M + H]^+$  do íon formado a partir da incorporação de um próton é de aproximadamente  $482,1756 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . A massa do íon  $[M+H]^+$  encontrada no experimento foi de  $482,1754 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

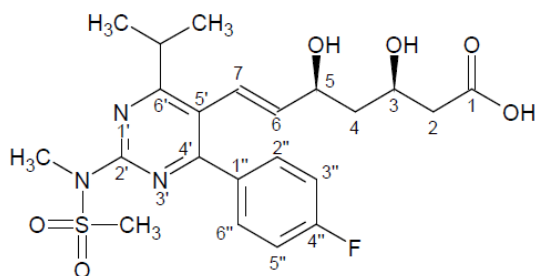


Figura 20 – Fórmula estrutural da rosuvastatina. (A numeração dos átomos segue a recomendação da IUPAC, mas os índices (‘ e ‘’) foram utilizados para facilitar a discussão).

A Figura 21 mostra o pico cromatográfico referente ao padrão de rosuvastatina (A), o seu espectro de massas (B) em que consta o pico referente ao valor  $m/z$  de 482,1754 daltons, que corresponde ao íon  $[M+H]^+$ , em que M corresponde à molécula de rosuvastatina, e o espectro MS/MS (C) da espécie  $(M+H)^+$ . A análise foi realizada com critério DDA para a fragmentação MS/MS do pico mais intenso.

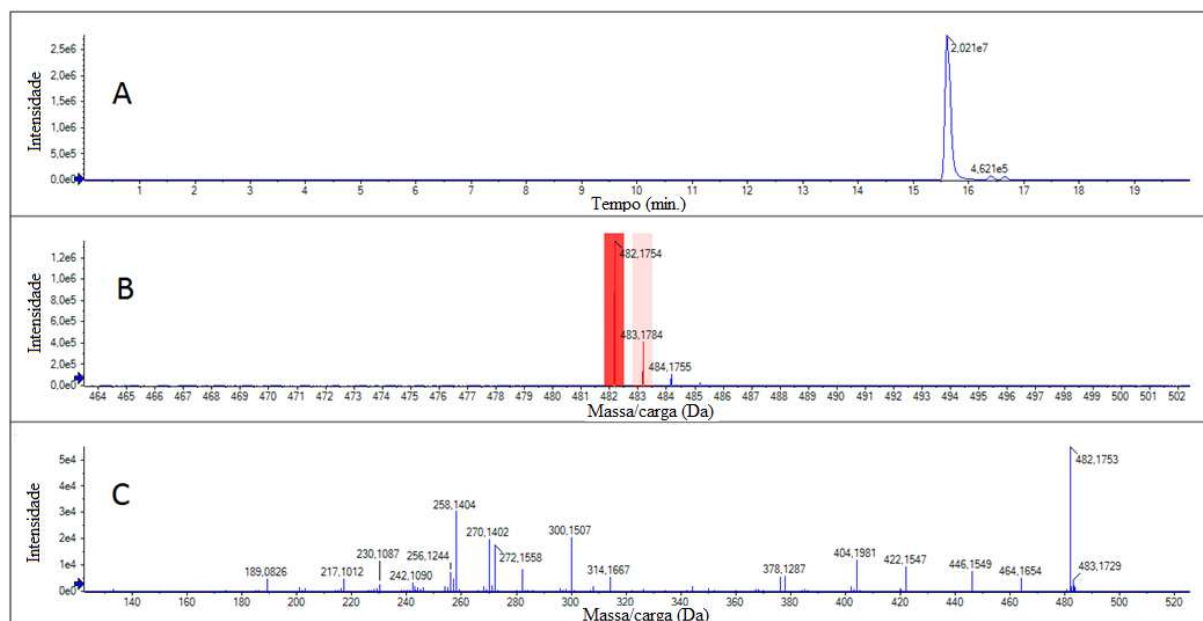


Figura 21 – Dados obtidos para a solução padrão aquosa de rosuvastatina na concentração de  $26,33 \text{ mg L}^{-1}$  A) Cromatograma do padrão de rosuvastatina; B) espectro MS do padrão de rosuvastatina e C) espectro MS/MS do padrão de rosuvastatina.

A fragmentação da rosuvastatina, no sistema utilizado gerou grande quantidade de picos. Isso pode ser atribuído ao fato de que se trata de uma molécula grande com inúmeros grupos funcionais, o que pode aumentar a variedade de fragmentos gerados no processo CID.

Para a interpretação do espectro MS/MS da rosuvastatina foram consideradas as possíveis perdas neutras, como múltiplas moléculas de água, tendo em vista a presença de hidroxilas na molécula. A perda de grupos  $\text{CH}_3\text{COOH}$  e  $\text{CH}_2\text{SO}_2$  também foi observada. Na Figura 22 são mostrados os resultados da análise  $\text{MS}^2$  (fragmentação CID) da rosuvastatina protonada e as sugestões de estruturas para os principais compostos referentes aos picos do espectro de fragmentação. As massas exatas dos fragmentos e os valores de RDBE foram fundamentais para a elaboração das propostas das estruturas apresentadas. O Quadro 22 apresenta os valores das massas exatas, RDBE, erros de massa e a fórmula molecular para os principais picos do espectro MS/MS da rosuvastatina.

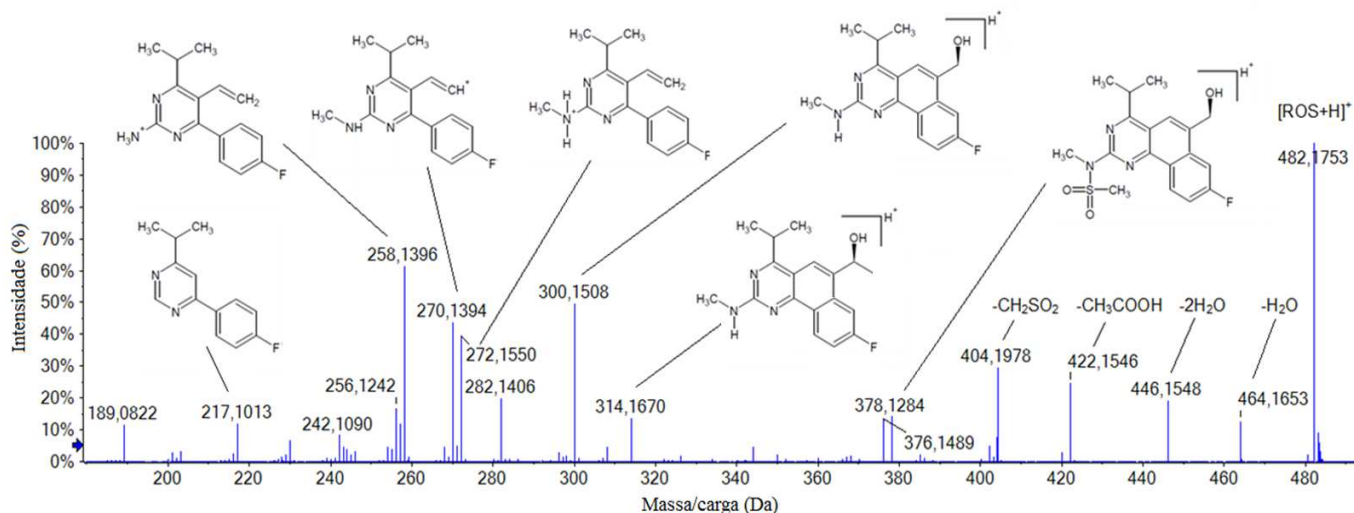


Figura 22 – Sugestão dos principais fragmentos na análise MS/MS da rosuvastatina protonada  $[M + H]^+$ .

O espectro de fragmentação na região com  $m/z$  menor do que 180 daltons foi omitido em vista de não apresentar picos com intensidade significativa. Salienta-se que o núcleo da molécula formado pelos dois anéis aromáticos permaneceu intacto na fragmentação CID com energia de colisão de até 50 eV. Isso já era esperado tendo em vista a alta estabilidade dessa região da molécula frente à fragmentação CID.

#### 4.3 Identificação dos Produtos de Transformação da Rosuvastatina

A identificação dos produtos de transformação da RST foi conduzida de acordo com o procedimento esquematizado na Figura 19.

Conforme descrito anteriormente, foi preparado uma solução de rosuvastatina (sal de cálcio) na concentração de  $26,33 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . A solução foi colocada na presença do catalisador e deixada em repouso por 60 minutos no escuro. Após esse tempo, uma alíquota foi retirada e o restante da solução foi submetido ao processo de fotocatalise pela ativação da fonte de radiação. Nos tempos pré-estabelecidos foram retiradas alíquotas para o monitoramento do avanço do processo de degradação. O Quadro 15 apresenta o tempo de fotocatalise com óxido de zinco a que foi submetido cada alíquota e a nomenclatura que será adotada para cada uma ao longo da discussão dos resultados.

Quadro 15 – Amostras de rosuvastatina estudadas e tempo de fotocatalise a que foram submetidas.

Amostra	Características da Amostra
RST <sub>padrão</sub>	Rosuvastatina padrão na concentração $26,33 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , em

	solução aquosa
$t_0$	Rosuvastatina 26,33 mg·L <sup>-1</sup> em contato com o catalisador por 60 min no escuro
$t_{5min}$	5 minutos de fotocatalise
$t_{15min}$	15 minutos de fotocatalise
$t_{30min}$	30 minutos de fotocatalise
$t_{60min}$	60 minutos de fotocatalise
$t_{120min}$	120 minutos de fotocatalise
$t_{180min}$	180 minutos de fotocatalise
$t_{240min}$	240 minutos de fotocatalise
$t_{300min}$	300 minutos de fotocatalise

As amostras foram armazenadas refrigeradas a aproximadamente -18°C até o momento das análises por LC-MS/MS. Os cromatogramas obtidos foram comparados entre si. A Figura 23 apresenta a sobreposição dos cromatogramas do padrão de rosuvastatina e das alíquotas retiradas ao longo do processo.

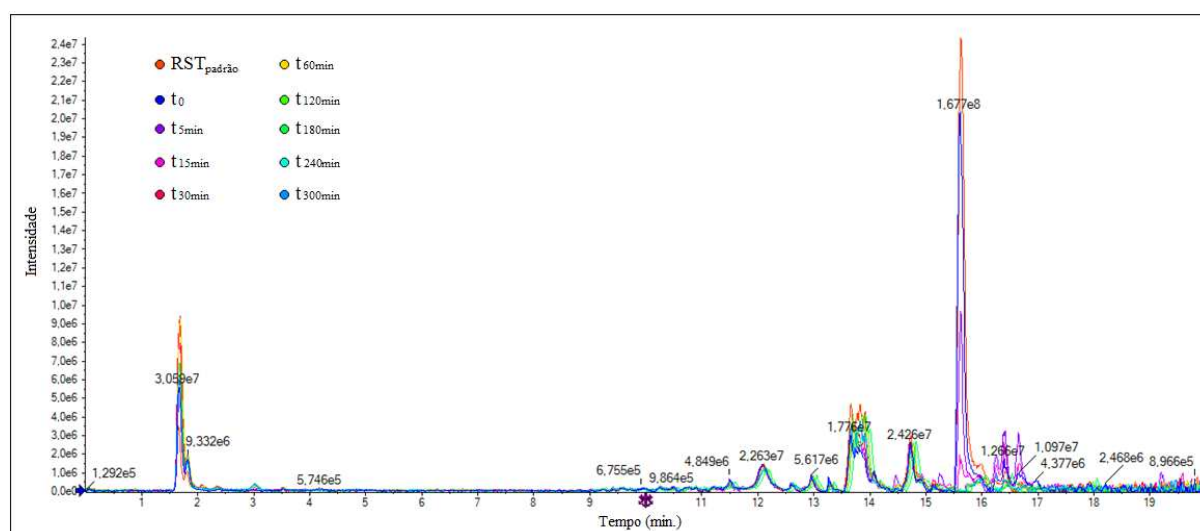


Figura 23 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos na análise das dez amostras de rosuvastatina submetidas a diferentes tempos de fotocatalise.

A partir da análise dos cromatogramas mostrados na Figura 23 é possível observar que o perfil geral dos cromatogramas é bastante similar. As principais mudanças ocorrem especialmente nas intensidades dos picos. Uma série de picos apresenta baixo tempo de retenção, entre 1,6 e 4 minutos. Outra série de picos pode ser observada em tempos de retenção maior, a partir de 9 minutos, até 20 minutos. Cada um dos picos foi ampliado para que pudesse ser avaliado o seu comportamento ao longo do tempo de reação. Atenção especial foi dada aos picos relacionados a constituintes que não estavam presentes na amostra do padrão da rosuvastatina e aqueles que tiveram uma variação significativa nos diferentes

experimentos. Podemos observar que a rosuvastatina elui entre os tempos de retenção 15 e 16 minutos. A Figura 24 mostra a ampliação da região dos cromatogramas referente à rosuvastatina que não sofreu decomposição.

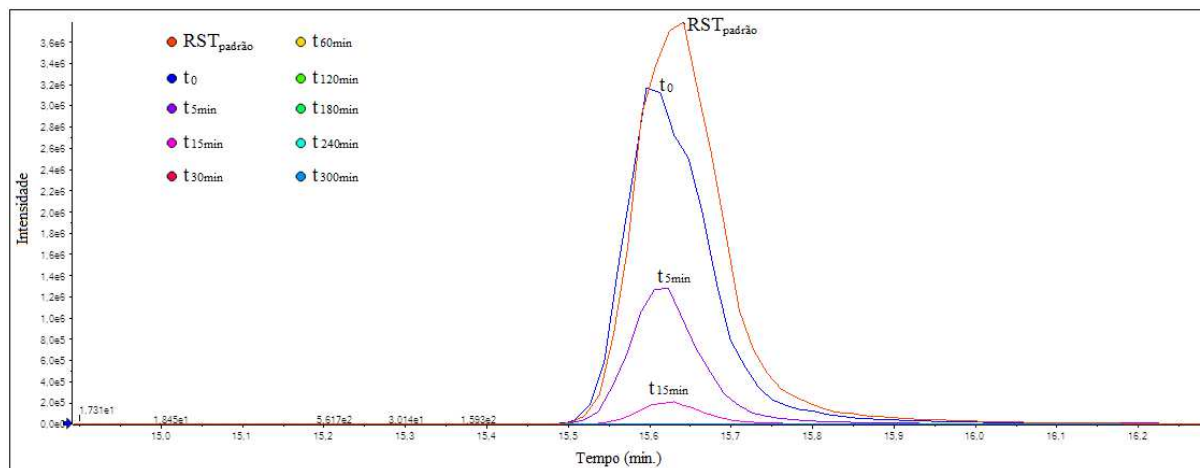


Figura 24 – Ampliação dos cromatogramas da rosuvastatina não decomposta.

Com o passar da reação, houve uma diminuição da concentração da rosuvastatina. Esse comportamento demonstra que o processo de fotocatalise ocorre nas condições estabelecidas para o experimento. Também é possível observar que a RST na presença do catalisador durante uma hora no escuro também reagiu, mas a uma taxa muito menor do que na presença da fonte de radiação. No Quadro 16 contam as áreas dos picos e a concentração da rosuvastatina nas diferentes amostras. Os resultados foram obtidos mediante o *software* MultiQuant.

Quadro 16 – Áreas relativas dos picos correspondentes à rosuvastatina protonada (íon  $[M+H]^+$ ).

Amostra	Área	Concentração relativa da RST (%)
RST <sub>padrão</sub>	$4,88 \times 10^7$	100
t <sub>0</sub>	$3,78 \times 10^7$	77,46
t <sub>5min</sub>	$1,39 \times 10^7$	28,48
t <sub>15min</sub>	$2,17 \times 10^6$	4,45
t <sub>30min</sub>	$5,50 \times 10^4$	0,11
t <sub>60min</sub>	$3,71 \times 10^4$	0,08
t <sub>120min</sub>	$1,18 \times 10^4$	0,02
t <sub>180min</sub>	$5,88 \times 10^3$	0,01
t <sub>240min</sub>	~ 0	0
t <sub>300min</sub>	~ 0	0

Os dados mostram que a maior parte da rosuvastatina foi degradada nos primeiros 15 minutos de fotocatalise. Esse fato indica que o sistema utilizado para a degradação da RST é eficaz na redução da sua concentração em meio aquoso. Porém, isso não significa necessariamente que o sistema empregado seja adequado, por exemplo, ao tratamento de um efluente, haja vista que os produtos de transformação podem apresentar uma toxicidade maior do que aquela apresentada pela rosuvastatina, além do fato que um efluente normalmente possui uma grande variedade de outras moléculas orgânicas.

Após a identificação dos picos que correspondiam a potenciais produtos de transformação, passou-se a analisar os dados de massas exatas de cada composto, o padrão de distribuição isotópica, os valores de RDBE e os espectros obtidos nos experimentos MS/MS. Também foi levado em consideração a estrutura da rosuvastatina, pois é de se esperar que os produtos de transformação mantenham similaridades estruturais com a mesma.

Dezessete diferentes compostos foram identificadas no processo de fotocatalise da rosuvastatina na presença do ZnO. Para facilitar a discussão, eles serão separados em duas categorias distintas: os que possuem átomo de zinco em sua composição (sete compostos) serão denominados apenas de *produtos* (P). Os demais dez produtos que não possuem átomos de zinco em sua composição serão denominados como *produtos de transformação* (TPs).

#### 4.3.1 Identificação dos Produtos com Zinco

Sete diferentes compostos com zinco foram identificados, o que indica que o ZnO em alguma medida também reagiu, em vez de atuar apenas como catalisador. As estruturas para esses sete compostos são apresentadas no Quadro 17.

Quadro 17 – Produtos formados pela reação com o ZnO.

Produto	Tempo Retenção (min)	Massa encontrada [M + H] <sup>+</sup>	Composto sugerido (íon)	Massa teórica (u)	Erro (ppm)	RDBE
P1	1,7	105,9630	ZnC <sub>2</sub> H <sub>4</sub> N	105,9630	0,0	2
P2	1,7	130,9579	ZnC <sub>3</sub> H <sub>3</sub> N <sub>2</sub>	130,9582	-2,3	4
P3	1,7	149,9527	ZnC <sub>3</sub> H <sub>3</sub> NO <sub>2</sub>	149,9528	-0,7	3
P4	1,7	190,9787	ZnC <sub>5</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	190,9793	-3,1	4
P5	1,7	238,8840	CaZnC <sub>3</sub> H <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	238,8842	-0,8	3
P6	1,7	279,9101	CaZnC <sub>5</sub> H <sub>6</sub> NO <sub>6</sub>	279,9107	-2,1	4
P7	1,7	303,8772	Zn <sub>2</sub> C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> NO <sub>6</sub>	303,8773	-0,3	4



O tempo de retenção para os sete produtos citados no Quadro 17 é de aproximadamente 1,7 minutos. O pico centrado em 1,82 minutos não se confirmou de interesse para os objetivos deste trabalho. A Figura 25 apresenta os cromatogramas sobrepostos das dez alíquotas, uma correspondente ao padrão de rosuvastatina e nove, às amostras submetidas a diferentes tempos de fotocatalise, referente ao tempo de retenção que as substâncias propostas eluem.

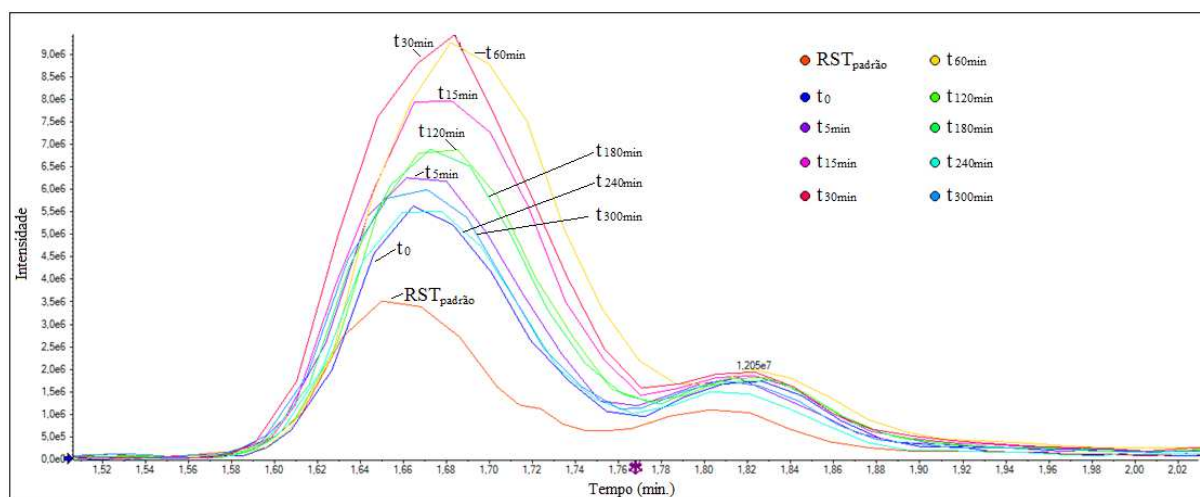


Figura 25 – Cromatogramas sobrepostos com ampliação na região com  $t_R$  entre 1,5 e 2,0 minutos.

Podemos observar que a amostra com o padrão da rosuvastatina já apresentou picos na região em questão. Após a análise dos compostos que correspondem a esse pico, verificou-se que ele é originado por alguma impureza bastante hidrossolúvel presente no padrão de RST, mas que não corresponde a qualquer um dos sete produtos com zinco aqui propostos.

A Figura 26 apresenta o espectro de massas (MS) acumulado dos compostos que eluem no tempo entre 1,6 e 1,75 minutos.

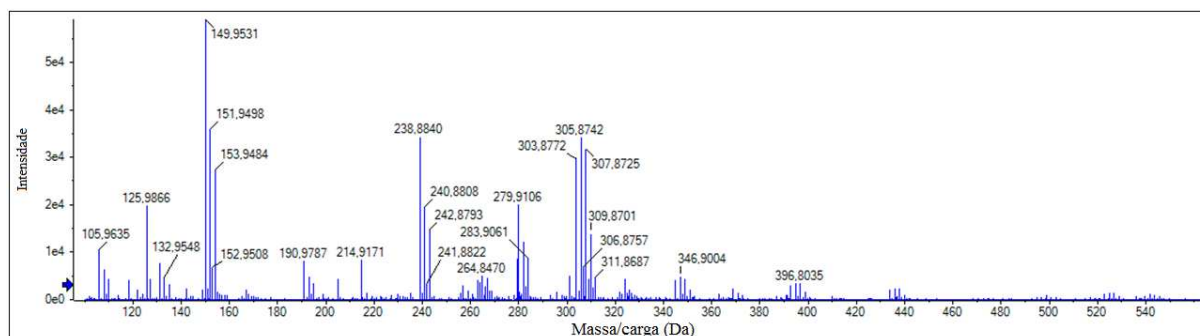


Figura 26 – Espectro de massas MS dos produtos (P) da rosuvastatina com  $t_R \sim 1,7$  min.

No espectro de massas da Figura 26, podemos observar a existência de uma quantidade enorme de picos MS distribuídos em agrupamentos mais ou menos bem definidos. A análise mais detalhada de cada um desses agrupamentos mostrou que os mesmos não eram constituídos por diferentes compostos com massas próximas. Em vez disso, os diferentes picos de cada agrupamento são provenientes de um único composto. A multiplicidade de picos é resultado da distribuição isotópica. Verificou-se que o perfil dos picos era compatível com o do átomo de zinco. Com base nessa informação e nos valores das massas exatas, elaborou-se o Quadro 18, citando-se as possíveis composições das substâncias em questão.

Quadro 18 – Composições possíveis para os produtos (P) da RST para o  $t_R \sim 1,7$  min.

Produto	Tempo Retenção (min)	Massa encontrada [M + H] <sup>+</sup> ou [M+Na] <sup>+</sup>	Composto sugerido (íon)	Massa teórica (u)	Erro (ppm)	RDBE
P1	1,68	105,9630	ZnC <sub>2</sub> H <sub>4</sub> N	105,9630	0,0	2
P2	1,68	130,9579	ZnC <sub>3</sub> H <sub>3</sub> N <sub>2</sub>	130,9582	-2,3	4
P3	1,68	149,9527	ZnC <sub>3</sub> H <sub>3</sub> NO <sub>2</sub>	149,9528	-0,7	3
P4	1,68	190,9787	ZnC <sub>5</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	190,9793	-3,1	4
P5	1,68	238,8840	CaZnC <sub>3</sub> H <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	238,8842	-0,8	3
			ou NaZnC <sub>3</sub> HN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	238,8840	0,0	4
P6	1,68	279,9101	CaZnC <sub>5</sub> H <sub>6</sub> NO <sub>6</sub>	279,9107	-2,1	4
			ou CaZnC <sub>6</sub> H <sub>6</sub> NO <sub>2</sub> FS	279,9093	2,9	4
			ou Na <sub>2</sub> ZnC <sub>5</sub> H <sub>4</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	279,9106	-1,8	5
P7	1,68	303,8772	Zn <sub>2</sub> C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> NO <sub>6</sub>	303,8773	-0,3	4
			ou NaZn <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	303,8775	-1,0	5,5
			ou CaZn <sub>2</sub> C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> NF	303,8766	2,0	6
			ou Zn <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> FS	303,8759	4,3	4

A composição isotópica do zinco está apresentada no Quadro 19 <sup>(74)</sup>.

Quadro 19 – Composição isotópica do átomo de zinco <sup>(74)</sup>.

isótopo	Abundância relativa
Zn <sup>64</sup>	0,4917
Zn <sup>66</sup>	0,2773
Zn <sup>67</sup>	0,0404
Zn <sup>68</sup>	0,1845

Zn <sup>70</sup>	0,0061
------------------	--------

Os espectros teóricos do cátion Zn<sup>+</sup> e [Zn<sub>2</sub>]<sup>+</sup> e as suas intensidades relativas estão apresentados nas Figuras 27 e 28.

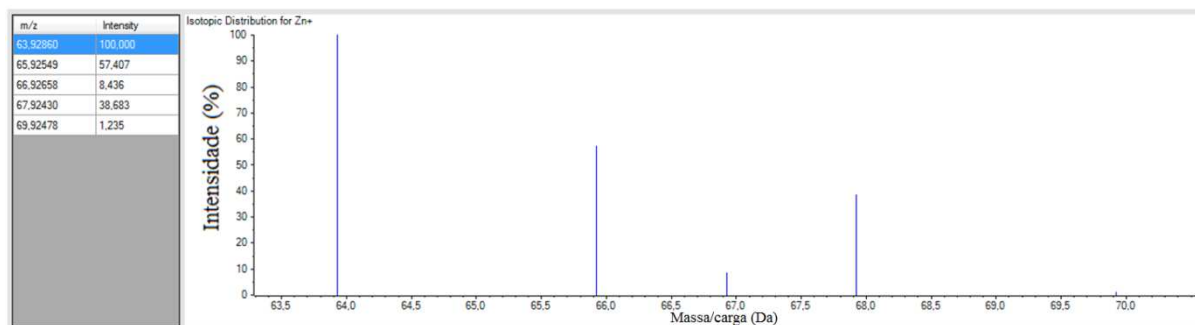


Figura 27 – Distribuição isotópica do Zn<sup>+</sup> (fonte: adaptação do original obtido pelo *software* PeakView).

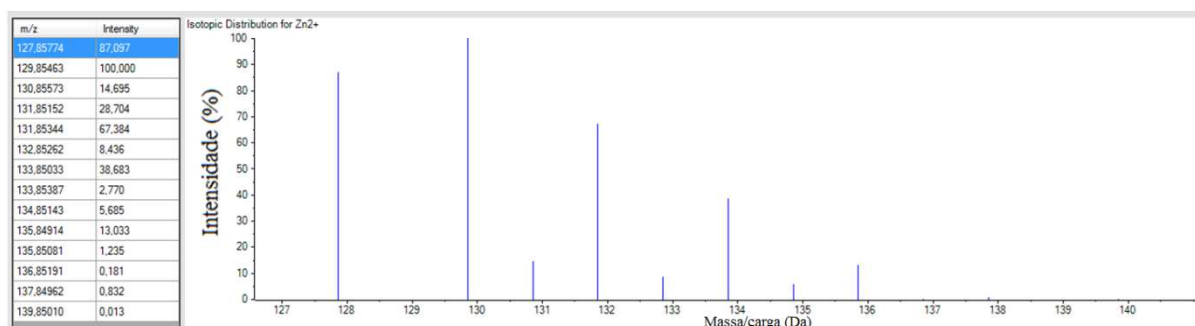


Figura 28 – Distribuição isotópica do [Zn<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (fonte: adaptação do original obtido pelo *software* PeakView).

O perfil de distribuição isotópica do zinco é bem característico, o que auxilia na determinação da sua presença na composição da molécula, bem como do seu quantitativo.

O padrão de distribuição isotópica para os íons com *m/z* de 105,9630 – 130,9579 - 149,9527 - 190,9787 - 238,8840 e 279,9101 daltons mostra que os mesmos apresentam um átomo de zinco em sua composição. O composto com *m/z* 303,8772 apresenta dois átomos de zinco em sua composição.

O espectro de massas teórico para o composto ZnC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>N (*m/z* = 105,9630), mostrado na Figura 29, apresenta uma similaridade muito grande com o espectro experimental do composto com mesmo *m/z* que elui no tempo de retenção de aproximadamente 1,7 minutos, apresentado na Figura 30. Associando a informação do perfil de distribuição isotópica com os

valores de massa exata, temos evidências suficientes para sustentar que o composto em questão é o  $\text{ZnC}_2\text{H}_4\text{N}$ .

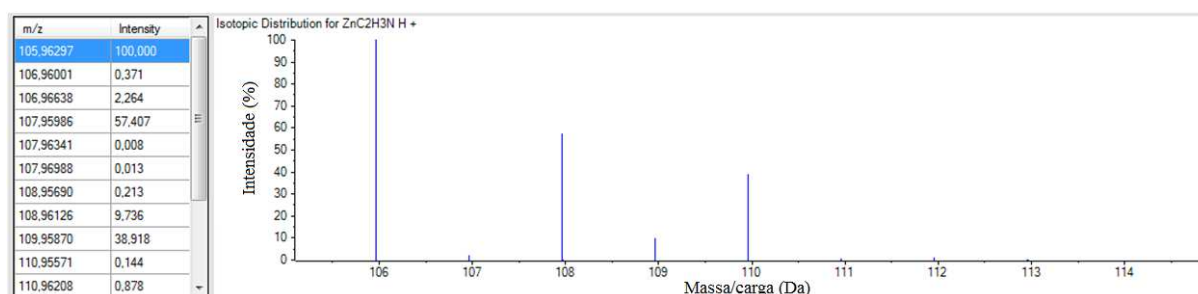


Figura 29 – Espectro de massas teórico de um composto  $\text{ZnC}_2\text{H}_4\text{N}$  (fonte adaptação do original obtido pelo software PeakView).

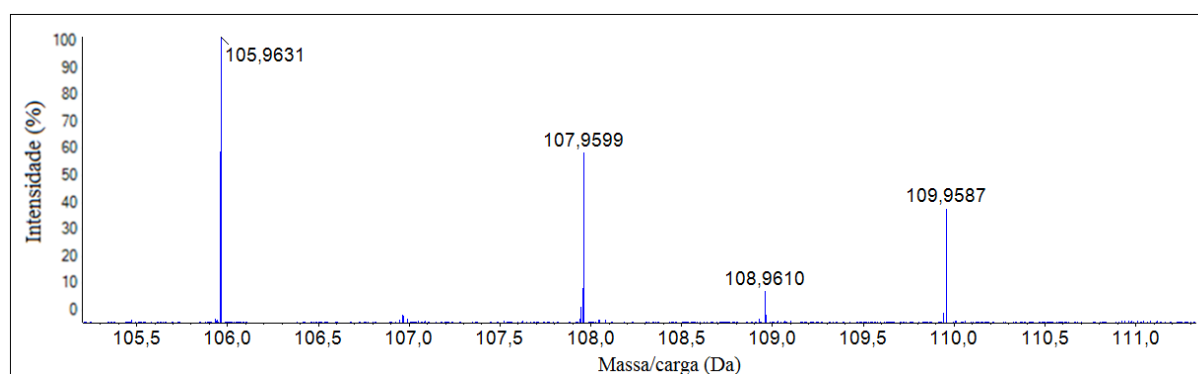


Figura 30 – Espectro de massas da região entre 105 e 111 daltons, referente ao pico cromatográfico com tempo de retenção 1,7 min da amostra  $t_{15\text{min}}$ .

A mesma estratégia utilizada para a elucidação do produto 1 (P1) foi aplicada para a determinação dos compostos P2, P3, P4, P5 e P6 apresentados no Quadro 17. A intensidade relativa dos picos para o composto com  $m/z$  de 238,8840 Da indica que se trata do  $\text{CaZnC}_3\text{H}_3\text{O}_6$ . Já para o composto com  $m/z$  279,9101 Da, a análise das intensidades relativas dos picos indica o favorecimento do íon  $\text{CaZnC}_5\text{H}_6\text{NO}_6$ . O átomo de cálcio estava presente na solução, pois se utilizou rosuvastatina na forma de sal de cálcio nos experimentos de fotocatalise.

O espectro teórico do composto  $\text{Zn}_2\text{C}_5\text{H}_6\text{NO}_6$ , apresentado na Figura 31, apresenta alta similaridade com o espectro obtido na região de  $m/z$  de aproximadamente 300 daltons do pico referente ao tempo de retenção de 1,7 minutos (Figura 32), tanto em relação à massa quanto à intensidade.

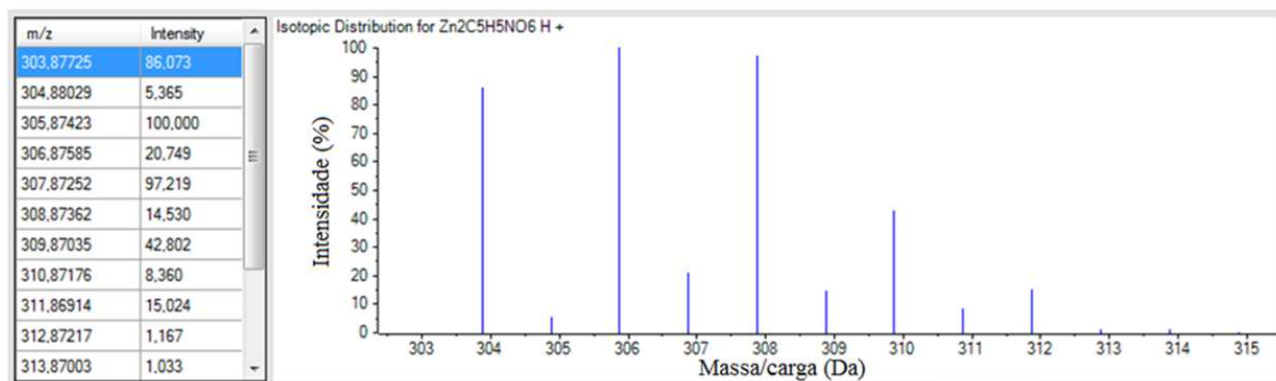


Figura 31 – Espectro de massas teórico do composto  $Zn_2C_5H_6NO_6$  . (fonte adaptação do original obtido pelo software PeakView).

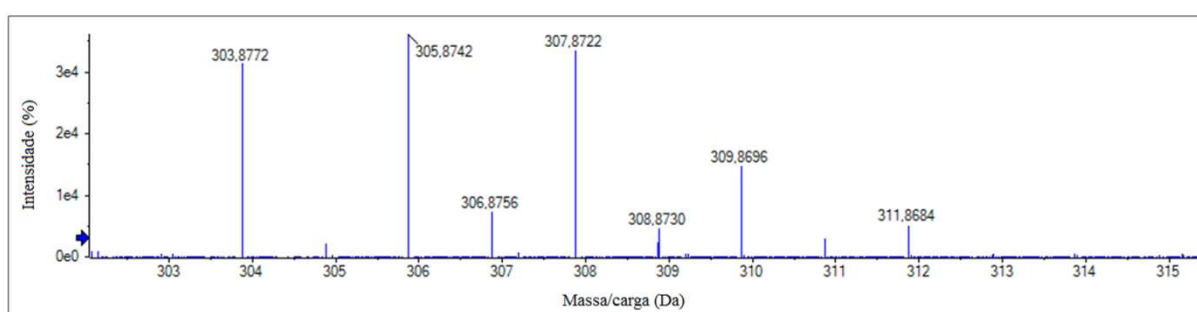


Figura 32 – Espectro de massas experimental da região com  $m/z$  de ~ 300 daltons, obtido a partir do pico cromatográfico referente ao tempo de retenção de 1,7 minutos.

A razão entre as intensidades dos picos  $C^{13}/C^{12}$  é outra informação que pode ser relevante para definir qual das quatro estruturas apresentadas no Quadro 18 corresponde ao composto com massa de 303,87 daltons (P7). O resultado obtido a partir dessa avaliação nos dá uma estimativa do número de carbonos presentes no composto. O Quadro 20 apresenta os valores de  $C^{13}/C^{12}$  obtidos a partir do espectro teórico para os quatro possíveis compostos.

Quadro 20 – Razão entre a intensidade dos picos com  $m/z$  de 304,8803 e 303,8772 daltons dos espectros teóricos.

Composto	Razão das intensidades dos picos $^{13}C/^{12}C$ (304,8803/303,8772)
$Zn_2C_5H_6NO_6$	0,0623
$NaZn_2C_6H_5N_2O_3$	0,0759
$CaZn_2C_8H_7NF$	0,093
$Zn_2C_6H_7NO_2FS$	0,0799

A razão para as intensidades dos picos com  $m/z$  304,88 e 303,87 ( $^{13}C/^{12}C$ ) na análise experimental foi de 0,066, o que sugere a estrutura  $Zn_2C_5H_6NO_6$ . Associando essa informação

com o padrão de distribuição isotópica e com os dados de massa exata, temos razões suficientes para concluir que o composto  $Zn_2C_5H_6NO$  está presente nas amostras após o processo de fotocatalise.

Os inúmeros picos observados na Figura 26 também poderiam corresponder a moléculas com composição atômica diferente. Porém, os dados obtidos a partir dos experimentos MS/MS reforçam a tese de que eles se originam de um único composto com diferentes isótopos em sua constituição. A Figura 33 apresenta os espectros de fragmentação dos picos 303,87 - 305,87 - 307,87 e 311,87 daltons. Podemos observar o mesmo padrão de fragmentação nos quatro espectros. A diferença entre as massas é devida aos diferentes isótopos que constituem as moléculas.

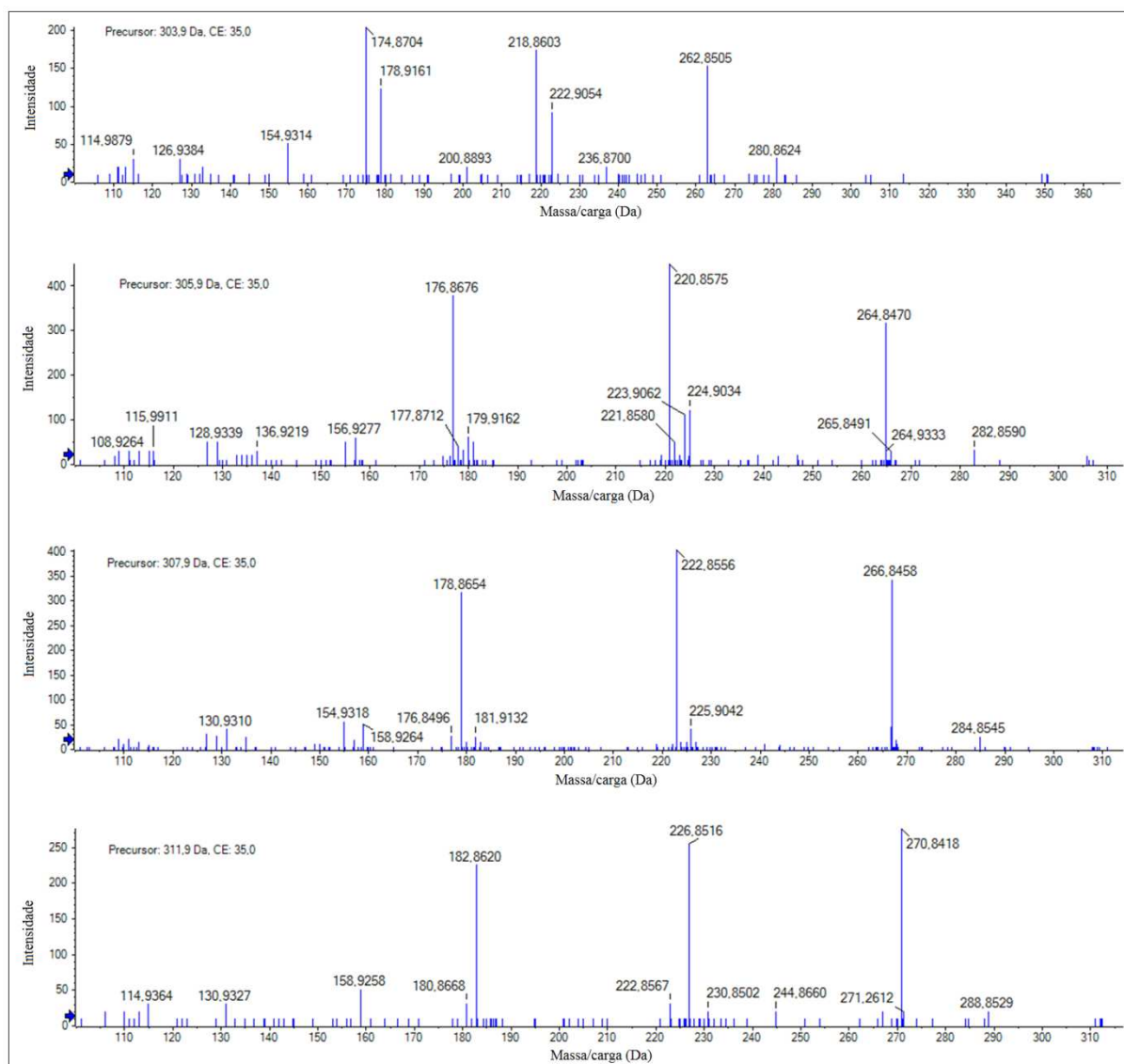


Figura 33 – Espectro MS/MS experimental para o pico correspondentes aos  $m/z$  de 303,87 - 305,87 - 307,87 e 311,87 daltons.

A formação dos sete produtos contendo zinco em sua constituição ocorre mesmo na ausência de luz, durante o período de 60 minutos em que a rosuvastatina esteve em contato com o catalizador no escuro. Para fins de exemplificação, no Quadro 21 são apresentadas as áreas dos picos referentes ao P1 e ao P7 ao longo do tempo.

Quadro 21 – Áreas relativas dos picos referentes aos íons com  $m/z$  105,96 e 303,87 daltons.

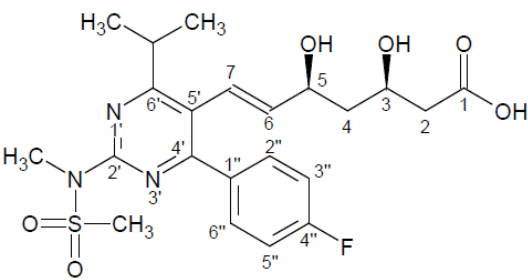
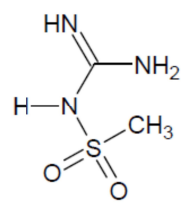
Amostra	Área do pico 105,96	Área pico 303,87
RST <sub>padrão</sub>	ND (não detectado)	ND
$t_0$	$1,38 \times 10^5$	$1,00 \times 10^5$
$t_{5\text{min}}$	$2,37 \times 10^5$	$2,94 \times 10^5$
$t_{15\text{min}}$	$4,23 \times 10^5$	$7,79 \times 10^5$
$t_{30\text{min}}$	$5,06 \times 10^5$	$9,97 \times 10^5$
$t_{60\text{min}}$	$5,20 \times 10^5$	$1,01 \times 10^6$
$t_{120\text{min}}$	$2,62 \times 10^5$	$3,47 \times 10^5$
$t_{180\text{min}}$	$2,61 \times 10^5$	$3,48 \times 10^5$
$t_{240\text{min}}$	$2,10 \times 10^5$	$2,28 \times 10^5$
$t_{300\text{min}}$	$2,06 \times 10^5$	$2,24 \times 10^5$

Conforme citado anteriormente, a formação dos compostos se dá mesmo na ausência de luz. A concentração máxima (baseada apenas nas áreas) do P1 e P7 ocorre no tempo de 60 minutos quando, então, começa a diminuir. No tempo de 300 minutos de fotocatalise eles atingem concentrações equivalentes àquelas encontradas nos primeiros minutos após a ativação da fonte de luz. Por esse motivo esses sete compostos foram tratados de forma isolada aos outros dez compostos.

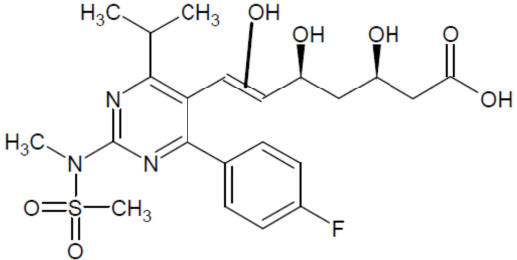
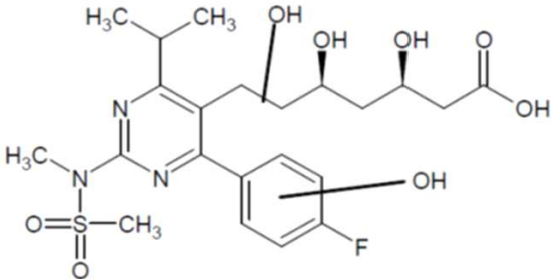
#### 4.3.2 Identificação dos Produtos de Transformação da Rosuvastatina por Fotocatálise

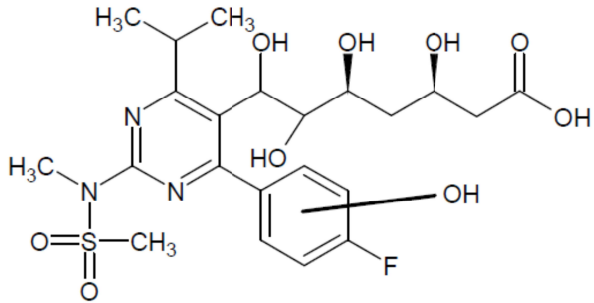
Dez produtos de transformação mais importantes foram identificados com o uso da estratégia de identificação proposta neste trabalho e esquematizada na Figura 19. O Quadro 22 apresenta um resumo onde consta a estrutura do composto e demais informações relevantes do padrão de rosuvastatina e dos seus produtos de transformação. A seguir, será discutido em detalhes o processo de identificação de alguns dos compostos, porém, não de todos eles, pois a metodologia empregada foi similar.

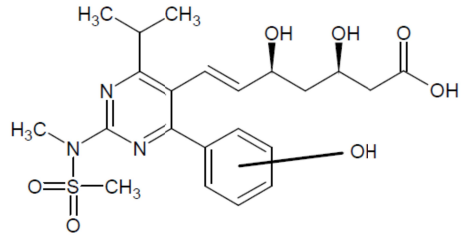
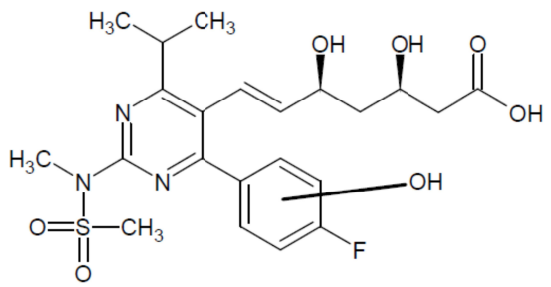
Quadro 22 – Valores de massa exata determinados por LC-QTOF-MS/MS da rosuvastatina e os produtos de transformação gerados por fotocatalíse.

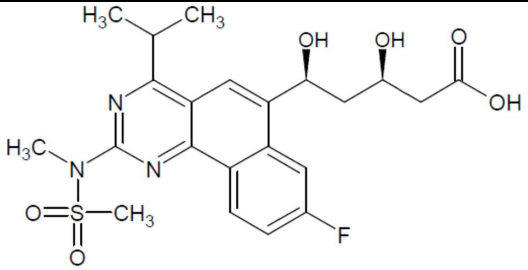
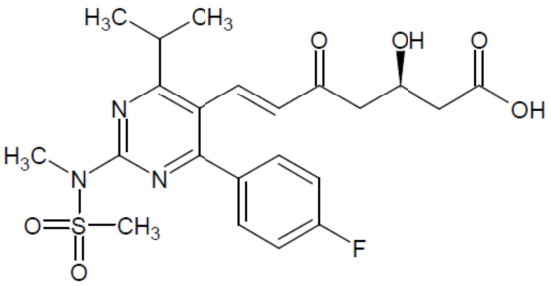
Estrutura	t <sub>R</sub> (min)	Fórmula (Íon) [M+H] <sup>+</sup>	Massa Experimental	Massa Calculada	Erro (ppm)	RDBe
<b>RST</b>	15,7	C <sub>22</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> FS	482,1754	482,1756	-0,4	10
 <p>Nota: a numeração dos átomos na estrutura segue a recomendação da IUPAC. Os índices ( ' e '' ) foram atribuídos pelo autor para facilitar as discussões.</p>	C <sub>22</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> SO <sub>5</sub> F	464,1653	464,1650	0,6	11	
	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> SO <sub>4</sub> F	446,1548	446,1544	0,9	12	
	C <sub>20</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> FS	422,1546	422,1544	0,5	10	
	C <sub>21</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> F	404,1978	404,1980	-0,5	10	
	C <sub>18</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> F	378,1284	378,1282	0,5	10	
	C <sub>18</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> OF	314,1670	314,1663	2,2	10	
	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> OF	300,1508	300,1507	0,3	10	
	C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> F	282,1406	282,1401	1,8	11	
	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> F	272,1550	272,1558	-2,9	9	
	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> F	270,1394	270,1401	-2,6	10	
	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> F	258,1396	258,1401	-1,9	9	
	C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> F	256,1242	256,1245	-1,2	10	
	C <sub>14</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> F	242,1090	242,1088	0,8	10	
	C <sub>13</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> F	230,1087	230,1088	-0,4	9	
	C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> N <sub>3</sub> F	217,1013	217,1010	1,4	8,5	
C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> F	189,0822	189,0823	-0,5	8		
<b>TP1</b>	3,0	C <sub>2</sub> H <sub>8</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	138,0335	138,0332	2,2	1
	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	121,0070	121,0066	3,3	2	
	CH <sub>6</sub> NO <sub>2</sub> S	96,0116	96,0114	2,1	0	
	CH <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	78,9863	78,9848	19	1	
	CH <sub>6</sub> N <sub>3</sub>	60,0580	60,0556	40	1	
	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> N <sub>2</sub>	57,0472	57,0447	43,8	2	
<b>TP2</b>	14,5	C <sub>22</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> FS	498,1718	498,1705	2,6	10
	C <sub>22</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> FS	480,1601	480,1599	0,4	11	
	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> FS	462,1491	462,1494	-0,6	12	
	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> FS	444,1389	444,1388	0,2	13	

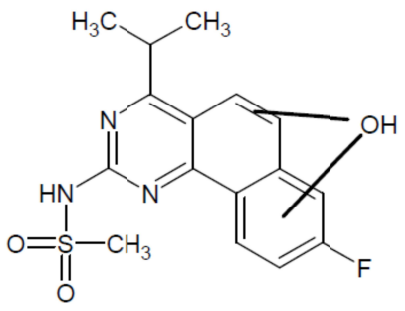
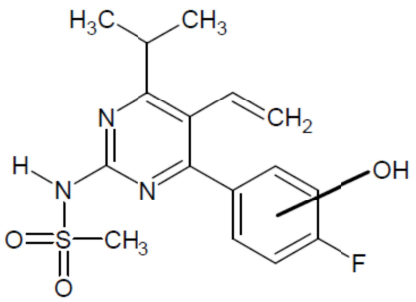


		$C_{20}H_{25}N_3O_5FS$	438,1484	438,1494	-2,3	10
		$C_{21}H_{27}N_3O_4FS$	436,1702	436,1701	0,2	10
		$C_{21}H_{27}N_3O_5F$	420,1937	420,1929	1,9	10
		$C_{21}H_{25}N_3O_5F$	418,1774	418,1773	0,2	11
		$C_{21}H_{25}N_3O_3FS$	418,1591	418,1595	-1,0	11
		$C_{21}H_{25}N_3O_4F$	402,1811	402,1824	-3,2	11
		$C_{18}H_{21}N_3O_4FS$	394,1238	394,1231	1,8	10
		$C_{19}H_{23}N_3O_3FS$	392,1447	392,1439	2,0	10
		$C_{18}H_{19}N_3O_3FS$	376,1132	376,1126	1,6	11
		$C_{17}H_{21}N_3O_3FS$	366,12970	366,1282	4,1	9
		$C_{17}H_{19}N_3O_2FS$	348,1180	348,1177	0,9	10
		$C_{18}H_{19}N_3OF$	312,1493	312,1507	-4,5	11
		$C_{17}H_{17}N_3OF$	298,1347	298,1350	-1,0	11
		$C_{16}H_{17}N_3OF$	286,1351	286,1350	0,3	10
		$C_{16}H_{17}N_3F$	270,1402	270,1401	0,4	10
		$C_{15}H_{15}N_3F$	256,1234	256,1245	-4,3	10
		$C_{15}H_{13}N_3F$	254,1079	254,1088	-3,6	11
		$C_{14}H_{13}N_3F$	242,1076	242,1088	-5,0	10
	$C_{13}H_{12}N_2F$	215,0975	215,0979	-1,9	9	
	$C_{12}H_{10}N_2F$	201,08170	201,0823	-3,0	9	
<b>TP3</b>	14,5	$C_{22}H_{31}N_3O_8FS$	516,1821	516,1810	2,1	9
		$C_{22}H_{29}N_3O_7FS$	498,1711	498,1705	1,2	10
		$C_{22}H_{27}N_3O_6FS$	480,1607	480,1599	1,7	11
		$C_{22}H_{25}N_3O_5FS$	462,1497	462,1494	0,6	12
		$C_{21}H_{27}N_3O_5F$	420,1923	420,1929	-1,4	10
		$C_{18}H_{21}N_3O_4FS$	394,1247	394,1231	4,1	10
		$C_{17}H_{21}N_3O_3FS$	366,1296	366,1282	3,8	9
		$C_{15}H_{19}N_3O_2FS$	324,1169	324,1177	-2,5	8
		$C_{16}H_{19}N_3OF$	288,1513	288,1507	2,1	9
		$C_{16}H_{18}N_3OF$	287,1436	287,1428	2,8	9.5
		$C_{15}H_{17}N_3OF$	274,1365	274,1350	5,4	9.0
		$C_{15}H_{15}N_3OF$	272,1197	272,1194	1,1	10
		$C_{16}H_{17}N_3F$	270,1411	270,1401	3,7	10
		$C_{15}H_{17}N_3F$	258,1405	258,1401	1,5	9

		$C_{15}H_{15}N_3F$	256,1250	256,1245	2,0	10
		$C_{14}H_{17}N_3F$	246,1405	246,1401	0,0	8
		$C_{14}H_{15}NOF$	232,1132	232,1132	0,0	8
		$C_{13}H_{13}N_3F$	230,1096	230,1088	3,5	9
		$C_{13}H_{13}NOF$	218,0973	218,0976	-1,4	8
		$C_{14}H_{14}OF$	217,1017	217,1023	-2,8	8
		$C_{12}H_{11}N_3F$	216,0932	216,0932	0,0	9
		$C_{13}H_{11}NF$	200,0847	200,0870	2,0	9
		$C_{11}H_{10}N_2F$	189,0806	189,0823	-9,0	8
		$C_5H_7O_3$	115,0390	115,0390	0,0	3
<b>TP4</b>	14,6	$C_{22}H_{31}N_3O_9FS$	532,1770	532,1760	1,9	9
		$C_{22}H_{29}N_3O_8FS$	514,1667	514,1654	2,5	10
		$C_{22}H_{29}N_3O_7FS$	498,1715	498,1705	2,0	10
		$C_{22}H_{27}N_3O_6FS$	480,1583	480,1599	-3,3	11
		$C_{22}H_{25}N_3O_5FS$	462,1535	462,1494	8,9	12
		$C_{17}H_{21}N_3O_4FS$	382,1244	382,1231	3,4	9
		$C_{16}H_{19}N_3O_3FS$	352,1132	352,1126	1,7	9
		$C_{15}H_{19}N_3O_2FS$	324,1178	324,1177	0,3	8
		$C_{16}H_{17}N_3OF$	286,1361	286,1350	3,8	10
		$C_{15}H_{17}N_3OF$	274,1342	274,1350	-2,9	9
		$C_{16}H_{18}O_2F$	261,1283	261,1285	-0,8	8
		$C_{14}H_{13}N_3OF$	258,1045	258,1037	3,1	10
		$C_{12}H_{20}N_2O_2S$	256,1234	256,1240	-2,3	10
		$C_{13}H_{13}N_3OF$	246,1037	246,1037	0,0	9
		$C_{14}H_{15}N_3F$	244,1240	244,1245	-2,0	9
		$C_{13}H_{13}N_3F$	230,1073	230,1088	-6,5	9,0
		$C_{12}H_8N_2F$	199,0679	199,0666	6,5	10
		$C_{11}H_{10}N_2F$	189,0814	189,0823	-4,8	8
<b>TP5</b>	14,7	$C_{22}H_{30}N_3O_7S$	480,1799	480,1809	2,1	10
		$C_{22}H_{28}N_3O_6S$	462,1697	462,1693	0,9	11
		$C_{22}H_{26}N_3O_5S$	444,1570	444,1588	-4,1	12
		$C_{20}H_{26}N_3O_5S$	420,1586	420,1588	-0,5	10
		$C_{18}H_{22}N_3O_4S$	376,1311	376,1326	-4,0	10
		$C_{19}H_{24}N_3O_3S$	374,1521	374,1533	-3,2	10

		$C_{19}H_{24}N_3O_3$	342,1796	342,1812	-4,7	10
		$C_{18}H_{22}N_3O_2$	312,1707	312,1707	0,0	10
		$C_{17}H_{20}N_3O_2$	298,1544	298,1550	-2,0	10
		$C_{17}H_{18}N_3O$	280,1437	280,1444	-2,5	11
		$C_{16}H_{20}N_3O$	270,1597	270,1601	-1,5	9
		$C_{16}H_{18}N_3O$	268,1442	268,1444	-0,7	10
		$C_{15}H_{18}N_3O$	256,1438	256,1444	-2,3	9
		$C_{14}H_{18}N_3O$	244,1433	244,1444	-4,5	8
		$C_{14}H_{14}N_3O$	240,1119	240,1131	-5,0	10
		$C_{12}H_{12}N_3O$	214,0978	214,0975	1,4	9
		$C_{12}H_{11}N_2O$	199,0855	199,0866	-5,5	9
		$C_{11}H_{11}N_2O$	187,0856	187,0866	-5,3	8
<b>TP6</b>	15,5	$C_{22}H_{29}N_3O_7FS$	498,1719	498,1705	2,8	10
		$C_{22}H_{27}N_3O_6FS$	480,1611	480,1599	2,5	11
		$C_{22}H_{25}N_3O_5FS$	462,1498	462,1494	0,9	12
		$C_{21}H_{25}N_3O_3FS$	418,1593	418,1595	-0,5	11
		$C_{19}H_{23}N_3O_3FS$	392,1439	392,1439	0,0	10
		$C_{17}H_{21}N_3O_3FS$	366,1282	366,1282	0,0	9
		$C_{16}H_{17}N_3O_3FS$	350,0963	350,0969	-1,7	10
		$C_{19}H_{21}N_3O_2F$	342,1614	342,1612	0,6	11
		$C_{18}H_{21}N_3O_2F$	330,1616	330,1612	1,2	10
		$C_{17}H_{19}N_3O_2F$	316,1455	316,1456	-0,3	10
		$C_{18}H_{21}N_3OF$	314,1651	314,1663	-3,8	10
		$C_{18}H_{19}N_3OF$	312,1502	312,1507	-1,6	11
		$C_{17}H_{17}N_3OF$	298,1354	298,1350	1,3	11
		$C_{16}H_{19}N_3OF$	288,1500	288,1507	-2,4	9
		$C_{16}H_{17}N_3OF$	286,1348	286,1350	-0,7	10
		$C_{15}H_{17}N_3OF$	274,1343	274,1350	-2,6	9
		$C_{15}H_{15}N_3OF$	272,1197	272,1194	1,1	10
		$C_{15}H_{13}N_3OF$	270,1029	270,1037	-3,0	11
		$C_{14}H_{15}N_3OF$	260,1187	260,1194	-2,7	9
		$C_{15}H_{17}N_3F$	258,1032	258,1401	3,1	9
		$C_{14}H_{12}N_3OF$	257,0952	257,0959	-2,7	10,5
	$C_{13}H_{11}N_3OF$	244,0873	244,0881	-3,3	10	

		$C_{14}H_{12}N_2OF$	243,0922	243,0928	-2,5	10
		$C_{13}H_{10}N_2OF$	229,0766	229,0772	-2,6	10
		$C_{12}H_{10}N_2OF$	217,0769	217,0772	-1,4	9,0
		$C_8H_{14}N_3O_2S$	216,0803	216,0801	0,9	4
<b>TP7</b>	15,2	$C_{22}H_{27}N_3O_6FS$	480,1605	480,1599	1,2	11
		$C_{22}H_{25}N_3O_5FS$	462,1459	462,1494	-7,6	12
		$C_{20}H_{23}N_3O_4FS$	420,1370	420,1388	-4,3	11
		$C_{21}H_{25}N_3O_4F$	402,1821	402,1824	-0,7	11
		$C_{17}H_{17}N_3OF$	298,1342	298,1350	-2,7	11
		$C_{17}H_{15}N_3F$	280,1244	280,1245	-0,4	12
		$C_{16}H_{15}N_3F$	268,1256	268,1245	4,1	11
		$C_{15}H_{13}N_3F$	254,1102	254,1088	5,5	11
		$C_{14}H_{12}N_3F$	241,1005	241,1010	-2,1	10,5
<b>TP8</b>	16,6	$C_{22}H_{27}N_3O_6FS$	480,1601	480,1599	2,3	11
		$C_{22}H_{25}N_3O_5FS$	462,1505	462,1494	2,5	12
		$C_{20}H_{23}N_3O_4FS$	420,1396	420,1388	1,9	11
		$C_{21}H_{25}N_3O_3FS$	418,1602	418,1595	1,7	11
		$C_{21}H_{25}N_3O_4F$	402,1837	402,1824	3,2	11
		$C_{19}H_{23}N_3O_3FS$	392,1455	392,1439	4,1	10
		$C_{18}H_{19}N_3O_3FS$	376,1139	376,1126	3,5	11
		$C_{18}H_{21}N_3OF$	314,16720	314,1663	2,9	10
		$C_{17}H_{17}N_3OF$	298,1364	298,1350	4,7	11
		$C_{16}H_{17}N_3F$	270,1413	270,1401	4,4	10
		$C_{12}H_{10}N_2F$	201,0822	201,0823	-0,5	9
		$C_{10}H_{13}N_2O$	177,1020	177,1022	-1,1	6
		$C_8H_9N_2O$	149,0714	149,0709	3,4	6
<b>TP9</b>	17,7	$C_{16}H_{17}N_3O_3FS$	350,0975	350,0969	1,4	10
		$C_{15}H_{15}N_3OF$	272,1199	272,1194	1,8	10
		$C_{14}H_{11}N_3OF$	256,0883	256,0881	0,8	11
		$C_{13}H_{11}N_3OF$	244,0892	244,0881	4,5	10
		$C_{14}H_{12}N_2OF$	243,0920	243,0928	-3,3	10
		$C_{14}H_{13}N_3F$	242,1091	242,1088	1,2	10
		$C_{13}H_{11}N_2OF$	230,0834	230,0850	-7,0	9,5
		$C_{13}H_8N_2OF$	227,0609	227,0615	-2,6	11

		$C_{13}H_9N_3F$	226,0767	226,0775	-3,5	11
		$C_{12}H_8N_2OF$	215,0619	215,0615	1,9	10
		$C_{13}H_{10}N_2F$	213,0810	213,0823	-6,1	10
		$C_{12}H_8N_2F$	199,0659	199,0666	-3,5	10
		$C_{11}H_8N_2F$	187,0654	187,0666	-6,4	9
		$C_{11}H_7N_2F$	186,0595	186,0588	3,8	9,5
		$C_9H_{10}N_3O$	176,0816	176,0818	-1,1	7
		$C_9H_{13}NO$	151,0964	151,0992	-18,5	4,5
		$C_7H_5NF$	122,0417	122,0401	13,1	6
<b>TP10</b>	19,2	$C_{16}H_{19}N_3O_3FS$	352,1136	352,1126	2,8	9,0
		$C_{15}H_{17}N_3OF$	274,1354	274,1350	1,5	9,0
		$C_{15}H_{16}N_3OF$	273,1274	273,1272	0,7	9,5
		$C_{15}H_{15}N_3OF$	272,1197	272,1194	1,1	10,0
		$C_{14}H_{13}N_3OF$	258,1037	258,1037	0,0	10,0
		$C_{15}H_{15}N_3F$	256,1243	256,1245	-0,8	10,0
		$C_{14}H_{15}N_3F$	244,1246	244,1245	0,4	9,0
		$C_{13}H_{13}N_3F$	230,1089	230,1088	0,4	9,0
		$C_{12}H_{11}N_3F$	216,0933	216,0932	0,5	9,0
		$C_{12}H_{12}N_3F$	217,1010	217,1010	0,0	8,5
		$C_{12}H_{12}N_2F$	203,0974	203,0979	-2,5	8,0
		$C_{11}H_9N_3F$	202,0770	202,0775	-2,5	9,0
		$C_{11}H_{10}N_2F$	189,0822	189,0823	-0,5	8,0
		$C_{10}H_6N_2OF$	189,0462	189,0459	1,6	9
		$C_{11}H_8N_2F$	187,0665	187,0666	-0,5	9
		$C_9H_{11}N_3O$	177,0891	177,0897	-3,4	6,5
		$C_{10}H_7NOF$	176,0503	176,0506	-1,7	8

### 4.3.3 Produtos de Transformação TP1

A Figura 34 mostra os cromatogramas sobrepostos e ampliados na região do pico correspondente ao tempo de retenção de três minutos. As áreas dos picos estão informadas no Quadro 23.

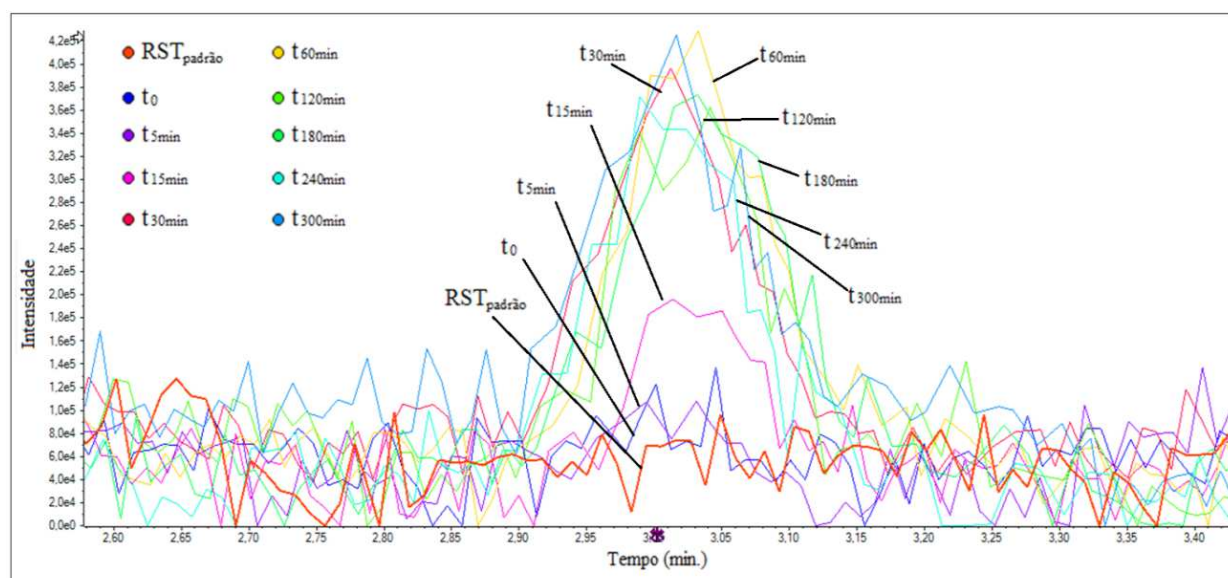


Figura 34 – Cromatogramas sobrepostos para a região com  $t_R$  em torno de 3,0 minutos.

Quadro 23 – Área do pico correspondente ao tempo de retenção 3,0 minutos ( $m/z$  138,03 Da), para os diferentes tempos de fotocatalíse.

Amostra	Área
RST padrão	ND
$t_0$	ND
$t_{5\text{min}}$	$3,58 \times 10^5$
$t_{15\text{min}}$	$7,03 \times 10^5$
$t_{30\text{min}}$	$1,01 \times 10^6$
$t_{60\text{min}}$	$8,79 \times 10^5$
$t_{120\text{min}}$	$8,87 \times 10^5$
$t_{180\text{min}}$	$8,47 \times 10^5$
$t_{240\text{min}}$	$7,63 \times 10^5$
$t_{300\text{min}}$	$5,52 \times 10^3$

O pico em questão corresponde ao íon com  $m/z$  de 138,0335 Daltons. Constata-se que o composto não está presente no padrão da rosuvastatina e que o pico claramente se afasta da linha de base do cromatograma correspondente ao tempo de 15 minutos. Apesar da Figura 34 apresentar o pico com  $t_{300\text{min}}$  com área superior àquela com do pico com  $t_{15\text{min}}$ , a concentração do íon com  $m/z$  138,03 é inferior para a amostra  $t_{300\text{min}}$ , conforme pode ser

observado no Quadro 23. Possivelmente deve ter ocorrido alguma coeluição na amostra  $t_{300\text{min}}$  que aumentou a área do pico.

Com base nos valores de massa exata foram propostas as estruturas presentes no Quadro 24.

Quadro 24 – Produtos de transformação sugeridos para o íon com  $m/z$  138,0332.

Tempo Retenção (min)	Massa experimental do íon	Composto sugerido (íon)	Massa teórica	Erro (ppm)	DBE
3,0	138,0335	$\text{C}_2\text{H}_8\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ ou $\text{CaC}_4\text{H}_8\text{N}_3$	138,0332	2,2	1,0
			138,0339	-2,9	3,0

O padrão de distribuição isotópica segundo o espectro de massas MS indica a presença do enxofre, o que favorece a estrutura  $\text{C}_2\text{H}_8\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ . Os espectros de massas experimentais e teóricos para os dois compostos possíveis são apresentados na Figura 35.

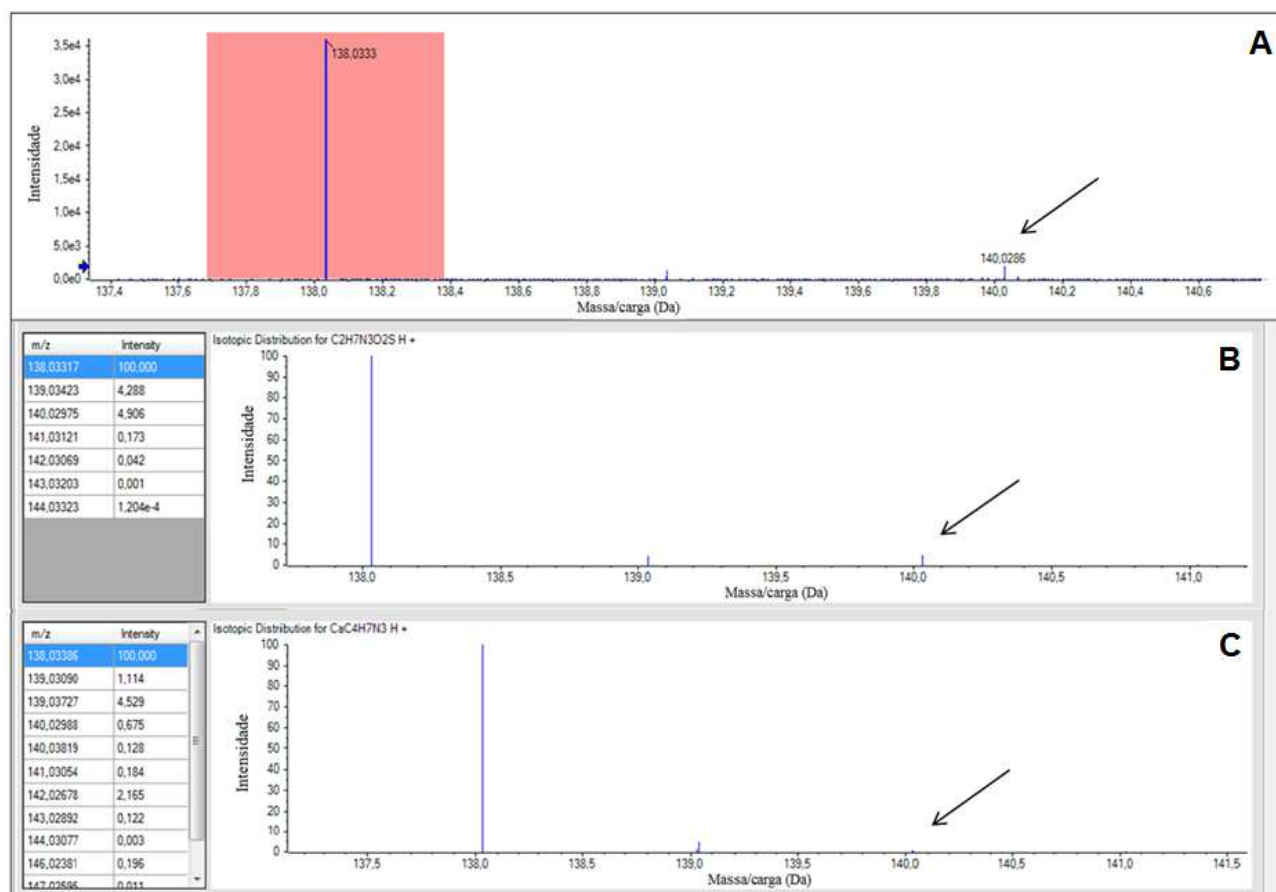


Figura 35 – Espectro de massas experimental (A) e teórico do composto  $\text{C}_2\text{H}_8\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$  (B) e  $\text{CaC}_4\text{H}_8\text{N}_3$  (C).

O pico correspondente ao  $m/z$  próximo a 140,0298 daltons corresponde ao composto com um átomo de  $^{34}\text{S}$ . Esse pico está presente tanto no espectro experimental quanto no teórico do composto  $\text{C}_2\text{H}_8\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ . Porém, no composto  $\text{CaC}_4\text{H}_8\text{N}_3$  ele praticamente não aparece.

Para a elucidação da estrutura foram utilizados os dados de RDBE, análise do padrão de fragmentação CID e massas exatas. A Figura 36 apresenta o espectro MS/MS do TP1 e os principais fragmentos CID sugeridos.

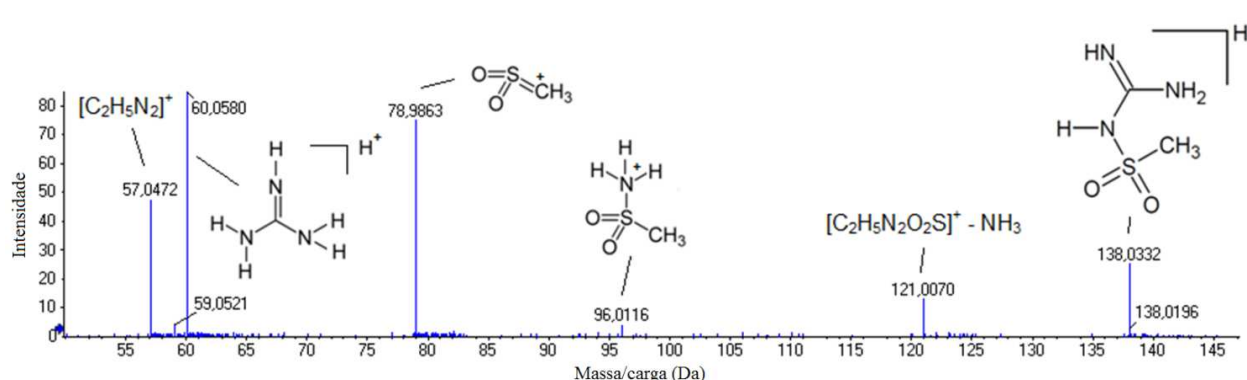


Figura 36 – Espectro de massas MS/MS e estruturas de fragmentação sugeridas para o TP1.

O padrão de fragmentação MS/MS apresenta as perdas esperadas para o composto  $\text{C}_2\text{H}_8\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ . Está presente o pico referente à perda de amônia (pico 121,0070). Também aparece a perda do grupo metilsulfóxido (pico 60,0580) e o íon  $[\text{CH}_3\text{SO}_2]^+$  (78,9863 Da), o que demonstra que se trata do  $\text{C}_2\text{H}_8\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$  e não do  $\text{CaC}_4\text{H}_8\text{N}_3$ .

#### 4.3.4 Produtos de Transformação Mono-Hidroxilados TP2 e TP6

Dois diferentes produtos de transformação com  $m/z$  de 498,17 foram identificados. O primeiro com tempo de retenção de 14,5 e o segundo, com 15,5 minutos. Para o tempo de retenção de 14,5 minutos, o valor de massa encontrado foi 498,1718 daltons. O espectro MS/MS do TP2 ( $t_R$  14,5 min  $m/z$  498,1718) está apresentado na Figura 37 para duas diferentes energias de colisão, 47 eV e 30 eV. A definição destas duas energias foi baseada nos valores utilizados nos experimentos com critério IDA e rampa de energia de colisão.



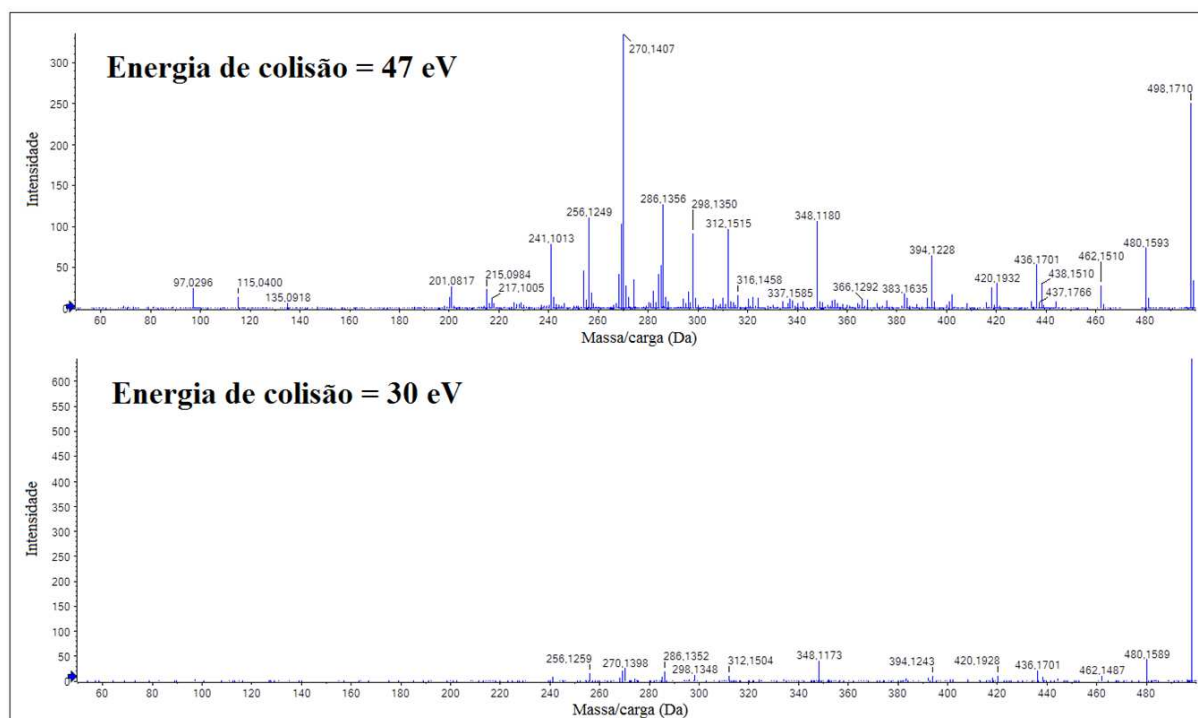


Figura 37 – Espectro de massas MS/MS do TP2 em dois diferentes valores de energia de colisão.

A energia de 30 eV gera um espectro de massas MS/MS bem mais pobre em relação ao de 47 eV uma vez que o perfil de intensidades dos picos é dependente do valor da energia de colisão. Por isso, o ajuste desse parâmetro deve ser feito com bastante cuidado. Energia de colisão aquém da ideal pode ocasionar perda de informações importantes. Energia de colisão acima da ideal pode gerar um espectro MS/MS com muita fragmentação, além de ocasionar o desaparecimento de alguns picos, dificultando a interpretação dos resultados. Podemos perceber no espectro MS/MS do TP2 a perda de moléculas neutras de água (pico 480 e 462), perda de  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (pico 438) entre outros. O padrão de fragmentação observado indica que a hidroxila foi inserida à ligação dupla, o que acaba por gerar uma carbonila/enol. Não há picos que indiquem que a hidroxila esteja ligada ao anel aromático, diferentemente do observado no espectro MS/MS do TP6. No TP2, Fragmentos como o com  $m/z$  418 ( $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_5\text{F}$ ), mostram que a hidroxila não está localizada no carbono ligado ao enxofre. O pico correspondente ao  $m/z$  348 ( $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_2\text{FS}$ ) é bastante intenso e indica que os únicos dois oxigênios do fragmento são aqueles ligados ao enxofre, sugerindo que os demais são eliminados com relativa facilidade. O fragmento com  $m/z$  270 ( $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{F}$ ) corresponde à perda de  $\text{SO}_2\text{CH}_2$  a partir do fragmento com  $m/z$  348. Observa-se que alguns fragmentos

encontrados no TP2 são os mesmos presentes na rosuvastatina, como é o caso do  $m/z$  376 ( $C_{18}H_{19}N_3O_3FS$ ),  $m/z$  256 ( $C_{15}H_{15}N_3F$ ) e do  $m/z$  270 ( $C_{16}H_{17}N_3F$ ).

Para auxiliar na definição de qual é a posição mais favorável à entrada da hidroxila na molécula, realizou-se cálculos *ab initio* que indicaram que a posição C6 (conforme numeração dos átomos da RST no Quadro 22) é mais favorável. Na Figura 38-A podemos observar dois dos principais picos cromatográficos, o primeiro com  $t_R$  de aproximadamente 14,5 minutos que corresponde ao TP2, e o segundo com  $t_R$  de aproximadamente 15,5 minutos, correspondente ao TP6. Esse primeiro pico ( $t_R$  14,5min) na verdade é formado pela sobreposição parcial de outros dois picos. Um que corresponde ao composto TP2 com a entrada da hidroxila na posição C6, destacado na Figura 38-A por “J”, e o composto TP2 com a entrada da hidroxila na posição C7, destacado na Figura 38-A por “K”.

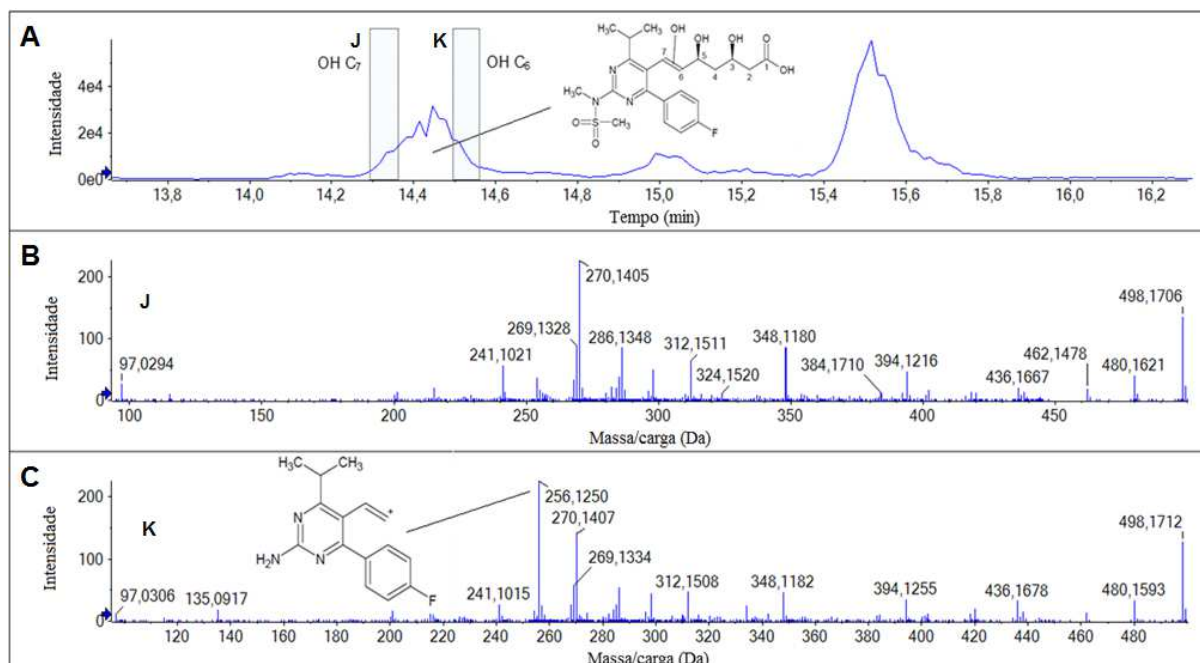
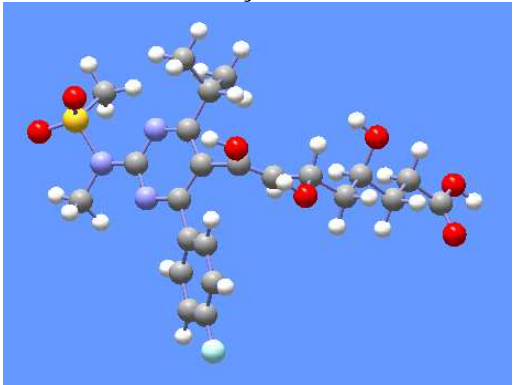
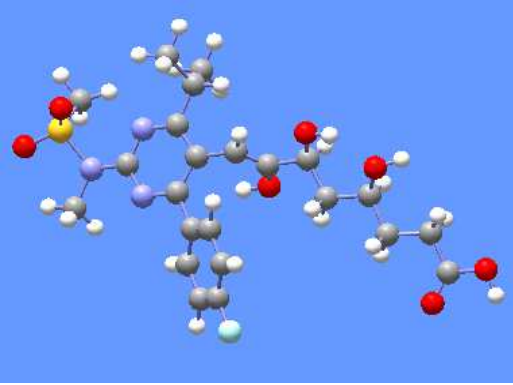


Figura 38 – Cromatograma correspondente ao íon extraído com  $m/z$  498.1705 e os espectros MS/MS da região J e K do cromatograma.

Conforme já citado, o cromatograma correspondente ao íon extraído com  $m/z$  de 498,1705 mostra que ocorre a entrada da hidroxila em ambas as posições. Porém, conforme pode ser observado na Figura 38-A, a molécula com maior tempo de retenção ( $t_R$  ~ 14,6 min) é mais abundante do que aquela com  $t_R$  de aproximadamente 14,3 min. A presença de um pico MS/MS com  $m/z$  256 Da (Figura 38–C) indica que essa estrutura corresponde à entrada da hidroxila na posição C6. A estrutura otimizada que foi utilizada nos cálculos *ab initio* para o composto TP2 estão presentes no Quadro 25.

Quadro 25 – Parâmetros Computacionais Obtidos para o TP2.

Posição da Hidroxila no TP2	Massa do íon e Fórmula Molecular	Energia (Eh e kJ mol <sup>-1</sup> , respectivamente)
<p>Posição C7</p> 	<p>498,1705</p> <p>C<sub>22</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>FS</p>	<p>-2.083,8241</p> <p>-5.471.080,6</p>
<p>Posição C6</p> 	<p>498,1705</p> <p>C<sub>22</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>FS</p>	<p>-2.083,8338</p> <p>-5.471.106,1</p>

O Quadro 25 apresenta as energias em Hartree e em kJ mol<sup>-1</sup>. A energia da molécula com a entrada da hidroxila na posição C6 é 25,5 kJ mol<sup>-1</sup> menor do que aquela que corresponde à entrada na posição C7, o que indica que o composto com hidroxila em C6 deve ser mais abundante, o que foi confirmado experimentalmente conforme discutido anteriormente.

Assim como o TP2, o TP6 (C<sub>22</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>FS, *m/z* 498,1719) também foi identificado como um produto mono-hidroxilado, mas em posição diferente que a do TP2. O ataque do radical hidroxila em diferentes posições da RST era esperado, devido ao comportamento não seletivo desse radical. A Figura 39 apresenta o espectro MS/MS do composto com *m/z* 498,1719, com *t<sub>R</sub>* de 15,5 minutos.

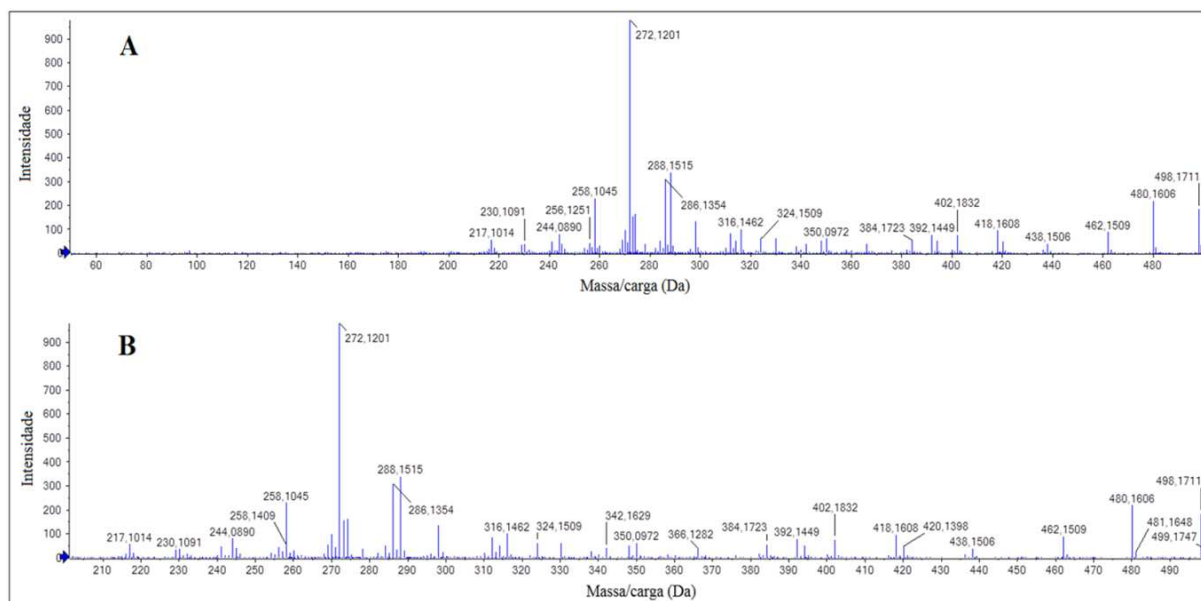


Figura 39 – Espectro de massas MS/MS do TP6 com a região de interesse ampliada (B).

A Figura 39-A apresenta o espectro de massas na faixa de 50 até 500 Da. Como os picos MS/MS se concentraram na região acima de 200 Da, a região de interesse foi ampliada na Figura 39-B. Pode ser observada a perda de duas moléculas de água (picos 480 e 462), bem como a perda de água e de  $\text{SO}_2\text{CH}_2$  (pico 402). Apesar do TP6 apresentar a mesma massa do TP2 e alguns fragmentos idênticos, o padrão de fragmentação de uma maneira geral é diferente do seu isômero TP2. O pico MS/MS mais intenso do TP6 é o correspondente ao  $m/z$  272, que não está presente no espectro do TP2 nem naquele da RST. Esse pico é referente ao íon  $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{OF}$ , e corresponde ao pico com  $m/z$  256,1242 ( $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{F}$ ) que é encontrado no espectro MS/MS da rosuvastatina, acrescido de um oxigênio. O Pico 420,1398 ( $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_4\text{FS}$ ) equivale ao pico 404 presente na RST também acrescido de um oxigênio. Esses picos indicam que a hidroxila está localizada no núcleo mais estável à fragmentação CID da molécula, que corresponde aos anéis aromáticos. Além disso, o pico  $m/z$  217,0765 corresponde ao íon  $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{OF}$  e não está presente no TP2 nem na RST. Esse pico quando associado às informações do padrão de fragmentação da RST e do TP2 evidencia a posição da hidroxila no anel aromático. Existem duas posições possíveis para a hidroxila no anel aromático: na posição orto ou meta em relação ao átomo de flúor. Os cálculos *ab initio* para as posições C2'' C3'' C5'' e C6'' indicam que as posições C2'' e C6'' possuem menor energia e por isso devem corresponder ao composto majoritário.

#### 4.3.5 Produtos de Transformação Di-hidroxiados e Tri-hidroxiados TP3 e TP4

A análise do TP3 ( $C_{22}H_{31}N_3O_8FS$ ,  $m/z$  516) indicou um valor de RDBE igual a nove. Como a RST possui RDBE igual a 10, temos a perda de uma insaturação, o que indica a adição de molécula de água à ligação dupla não aromática.

Em relação ao espectro MS/MS, o TP3 apresenta sucessivas perdas neutras de moléculas de água, conforme evidenciado pelos picos com  $m/z$  498,1711 - 480,1607 e 462,1497 daltons. O pico mais intenso do espectro MS/MS é o 366,1296 e corresponde ao íon  $[C_{17}H_{21}N_3O_3FS]^+$ . Dos três oxigênios presentes nesse íon, dois estão ligados ao enxofre. Como o mesmo pico está presente no espectro do TP6, mas não naquele do TP2, temos um bom indicativo que o terceiro oxigênio está ligado ao anel aromático. Os picos 274,1265 ( $C_{15}H_{17}N_3OF$ ) e 272,1197 ( $C_{15}H_{15}N_3OF$ ) são correspondentes a íons oxigenados que também estão presentes no TP6, mas não TP2, reforçando a hipótese que o oxigênio desses fragmentos está localizado no anel aromático. A Figura 40 apresenta o espectro MS e MS/MS do TP3.

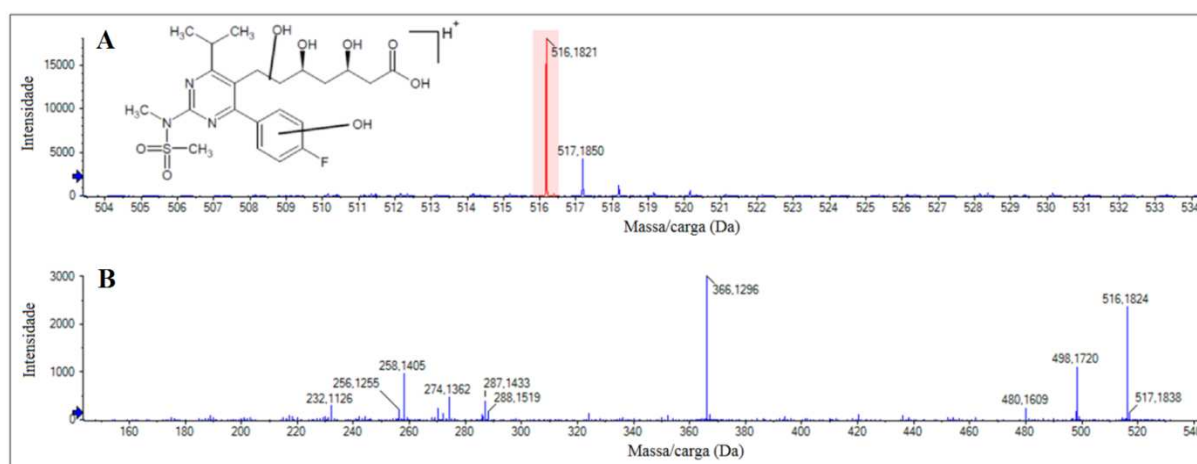


Figura 40 – Espectro de massas MS do composto com  $m/z$  de 516,1821 daltons (em A) e espectro de massas MS/MS (em B).

Em relação ao TP4, a análise da sua massa exata, RDBE e do padrão de fragmentação (CID) do íon com  $m/z$  de 532,1770 daltons indica que se trata do íon  $C_{22}H_{31}N_3O_9FS$ . Em relação à RST, há a incorporação de três hidroxilas, uma delas localizada no anel aromático e as outras duas adicionadas à ligação dupla não aromática. A estrutura do TP4 está apresentada no Quadro 22. A análise do padrão de fragmentação dos picos relevantes é bastante similar a do TP3.

#### 4.3.6 Produtos de Transformação TP5, TP7 e TP8

Os três principais produtos de transformação com  $m/z$  de 480 foram analisados, apesar de que outros dois produtos minoritários com esse mesmo valor de massa nominal também foram detectados. O composto com  $t_R$  de 14,7 minutos apresentou um pico no espectro MS com  $m/z$  480,1809 Da. Para esse valor de massa, três composições elementares são possíveis:  $C_{19}H_{31}N_3O_8FS$ ,  $C_{22}H_{27}N_3O_8F$  e  $C_{22}H_{30}N_3O_7S$ .

A elucidação da composição elementar para esse produto de transformação foi baseada no padrão de distribuição isotópica determinado experimentalmente. A presença de heteroátomos que possuam um padrão característico auxilia na tarefa de identificação dos TPs. São conhecidos quatro isótopos de enxofre estáveis:  $^{32}S$ ,  $^{33}S$ ,  $^{34}S$  e  $^{6}S$ , com abundância natural de 95,02 %, - 0,75 %, 4,21 % e 0,02 %, respectivamente <sup>(75)</sup>. A análise dos dados indicou a presença do enxofre na constituição do composto. A razão entre as intensidades dos picos  $^{13}C$  e  $^{12}C$  indicou que o composto possui 22 átomos de carbono em sua constituição, o que levou a concluir que o TP5 possui um íon  $[M+H]^+$  com fórmula  $C_{22}H_{30}N_3O_7S$ . Os experimentos em MS/MS mostraram que todos os fragmentos possuem oxigênio na sua composição. O fragmento com  $m/z$  199 ( $C_{12}H_{11}N_2O$ ) indica que o oxigênio extra não foi adicionado ao nitrogênio ligado ao enxofre. O fragmento com  $m/z$  de 187 ( $C_{11}H_{11}N_2O$ ), associado ao seu valor de RDBE (valor de 8) e o padrão de fragmentação observado para os outros TPs, indica que o oxigênio adicional está localizado na forma de hidroxila no anel aromático. Porém, a posição preferencial desse grupo no anel não foi possível determinar.

Os analisadores Q-TOF permitem a discriminação de compostos com pequenas diferenças de massa. Os erros são na ordem de 5 ppm ou até menores. Esse é o caso do TP5 ( $C_{22}H_{30}N_3O_7S$ ) e TP7–TP8 ( $C_{22}H_{27}N_3O_6FS$ ). Os três compostos possuem a mesma massa nominal de 480,1 daltons, mas diferentes massas exatas, e conseqüentemente, diferentes composições elementares.

No caso específico dos compostos com tempo de retenção de 15,2 e de 16,6 minutos, os dados das análises mostram que se tratam de dois isômeros: o TP7 ( $C_{22}H_{27}N_3O_6FS$ ,  $m/z$  480.1605, Figura 41–A) e TP8 ( $C_{22}H_{27}N_3O_6FS$ ,  $m/z$  480.1601, Figura 41–B). Ambos possuem cinco fragmentos idênticos conforme o espectro MS/MS ( $m/z$  462, 420, 418, 402 e 241). Porém, oito fragmentos são exclusivos e característicos para o TP8 ( $m/z$  392, 376, 314, 298, 270, 201, 177, e 149). Observa-se no TP7 o aumento de uma unidade de RDBE em relação à RST, o que, associado ao espectro de fragmentação MS/MS, indica a formação de um anel adicional.

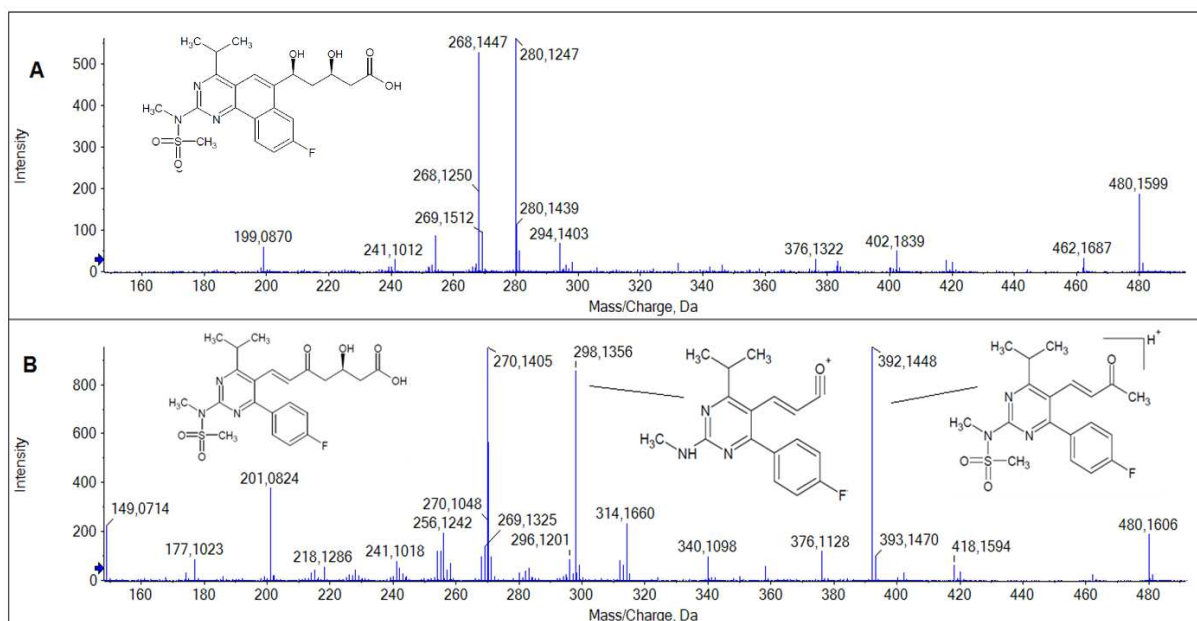


Figura 41 – Espectro MS/MS dos isômeros TP7 e TP8.

O TP8 apresenta um valor de RDBE de 11, indicando o aumento do grau de instauração em uma unidade. Um dos picos mais intensos é aquele com  $m/z$  270,1405 Da corresponde ao mesmo fragmento encontrado na rosuvastatina também como um dos mais intensos. Os outros dois picos mais intensos (392,1448 e 298,1356 daltons) indicam que ocorreu uma oxidação no carbono 3 (vide numeração do Quadro 22), o que deu origem à carbonila.

#### 4.3.7 Produtos de Transformação TP9 e TP10

O produto de transformação com tempo de retenção de 17,7 minutos possui uma massa experimental de 350,0975 Da que corresponde ao composto  $C_{16}H_{17}N_3O_3FS$ , indicando a perda de seis carbonos e três oxigênios em relação à RST. Contudo, o valor de RDBE igual a 10 permanece inalterado, o que indica a formação de um anel que não estava presente no composto original. A Figura 42 apresenta a estrutura do TP9 e o seu espectro MS/MS

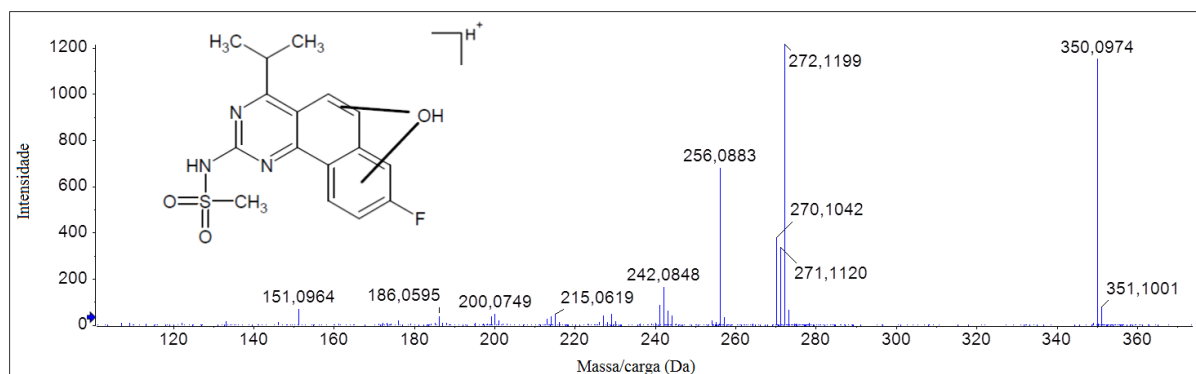


Figura 42 – Estrutura do TP9 e seu espectro MS/MS.

O pico MS/MS mais intenso (272,1199 Da) refere-se à perda do grupo  $\text{CH}_2\text{SO}_2$ , mostrando que essa região da molécula não sofreu alterações. Em relação à posição do terceiro oxigênio, os fragmentos de massa 243, 230, 227 e 215 indicam que ele não está ligado ao nitrogênio ligado ao enxofre. Íons como o 215 e 151 indicam que o oxigênio está ligado a um dos anéis na forma de uma hidroxila.

Em relação ao TP10, o valor de MS igual a 352.1126 Da indicam que o mesmo corresponde ao composto  $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_3\text{FS}$ . A Figura 43 apresenta o espectro MS/MS do composto e o seu espectro de fragmentação.

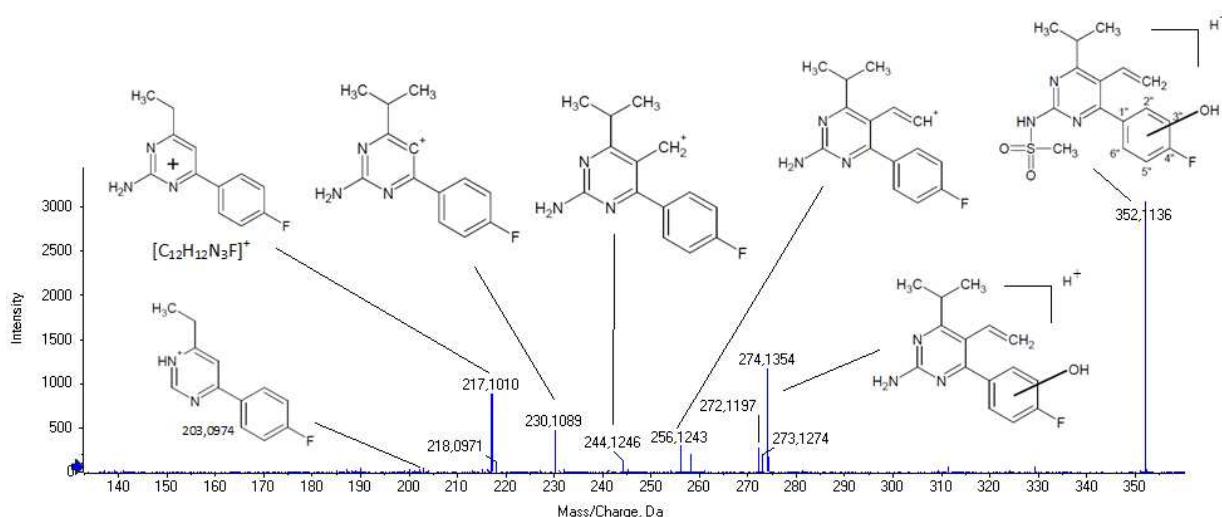


Figura 43 – Espectro MS/MS do TP10.

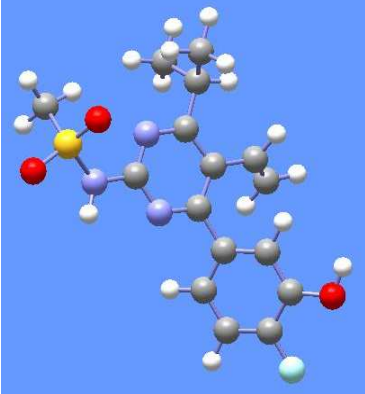
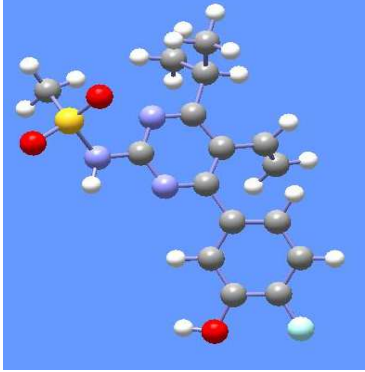
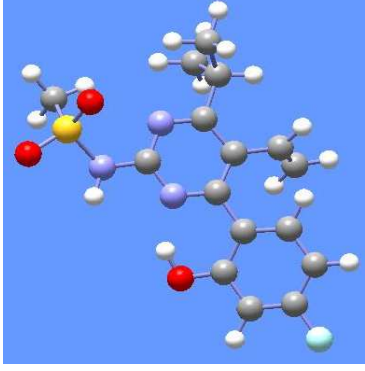
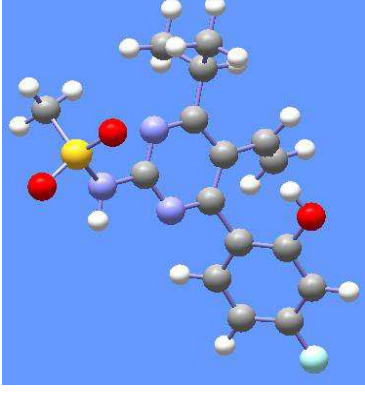
O valor de RDBE igual a nove indica que os anéis foram preservados. A perda de carbonos e oxigênios em relação ao composto original indica uma diminuição da cadeia alifática da molécula. O fragmento com  $m/z$  274,1354 ( $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{OF}$ ) refere-se à perda neutra



do  $\text{CH}_2\text{SO}_2$ , indicando que essa região da molécula não é alterada. Fragmentos com sinais bem baixos são encontrados ao se ampliar o espectro na região de  $m/z$  189,0462 e 176,0503, indicando que o oxigênio está ligado ao anel aromático na forma de uma hidroxila.

Para determinar qual a posição do anel aromático com a maior probabilidade de se encontrar a hidroxila foram realizados cálculos *ab initio*. As quatro possíveis posições para a hidroxila foram avaliadas. Os resultados indicaram que as duas posições equivalentes, C2'' e C6'' (vide numeração no Quadro 22), conduzem a estruturas mais estáveis. A energia da molécula com a hidroxila na posição C6'' é  $32,5 \text{ kJ mol}^{-1}$  menor do que na posição C3''. O Quadro 26 apresenta as estruturas otimizadas para a hidroxila em diferentes posições e os valores de energia para cada uma delas.

Quadro 26 – Parâmetros computacionais obtidos para o TP10.

Posição da Hidroxila no TP10	Estrutura da Molécula	Massa do íon e Fórmula Molecular	Energia (Eh e kJ mol <sup>-1</sup> ), respectivamente
Posição C3''		<p>352,1136</p> <p>C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>FS</p>	<p>-1508,7627</p> <p>-3961256,8</p>
Posição C5''		<p>352,1136</p> <p>C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>FS</p>	<p>-1508,7631</p> <p>-3961257,8</p>
Posição C6''		<p>352,1136</p> <p>C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>FS</p>	<p>-1508,7751</p> <p>-3961289,3</p>
Posição C2''		<p>352,1136</p> <p>C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>FS</p>	<p>-1508,7680</p> <p>-3961270,7</p>

É importante salientar que inúmeros outros produtos de transformação minoritários da rosuvastatina foram encontrados haja vista a grande complexidade da molécula.

#### 4.3.8 Avaliação Cinética da Degradação da Rosuvastatina

A partir da área dos picos, integrados segundo a massa exata, foi determinada a variação da concentração da RST e dos TPs. Os dados são apresentados na Figura 44 e Figura 45. Observou-se que 94 % da rosuvastativa sofreu degradação nos primeiros 15 minutos da fotocatalise. Um experimento de controle para avaliar o processo sem a presença do ZnO foi realizado, mantendo os demais parâmetros inalterados. A degradação foi de 30,6% após 60 minutos de fotocatalise na ausência de ZnO.

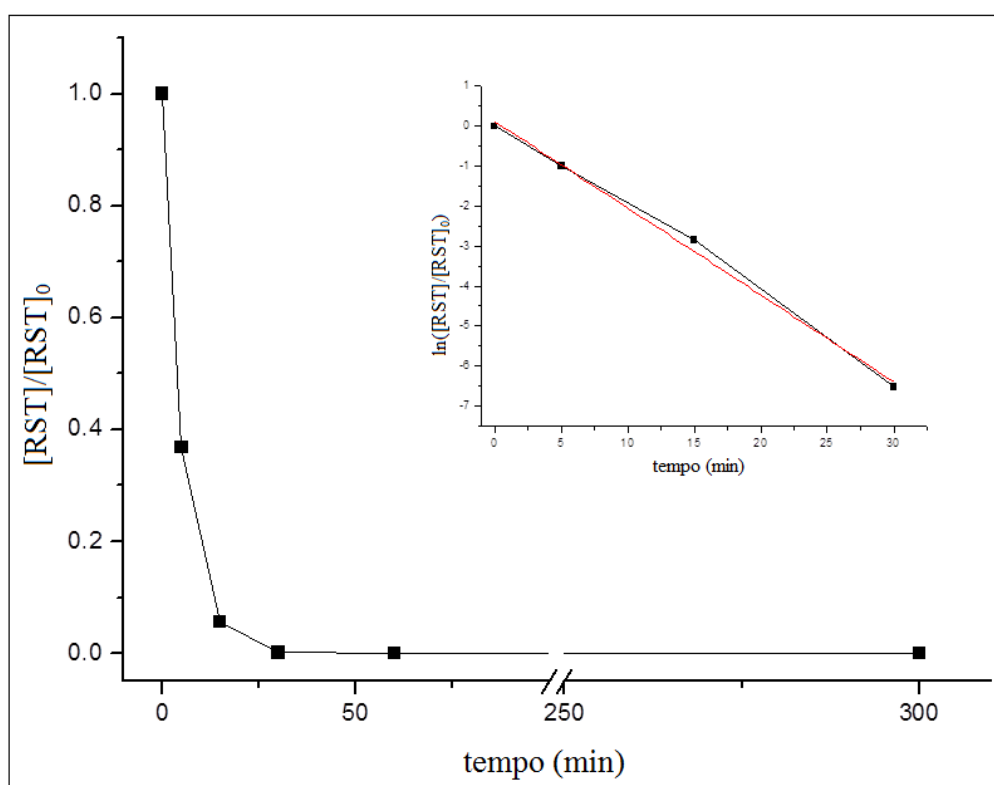


Figura 44 – Degradação da RST por fotocatalise com ZnO (concentração de RST determinada por LC-QTOF-MS,  $k = 0.2159 \text{ min}^{-1}$ ,  $t_{1/2} = 3.21 \text{ min}$ ,  $r = 0.9955$ ).

Apesar da quantidade reduzida de pontos na curva, segundo a Figura 44, a fotocatalise da RST pelo ZnO parece seguir uma cinética de pseudo-primeira ordem, como é comum de se acontecer na fotocatalise heterogênea quando a concentração inicial do substrato é baixa o suficiente para que não ocorra a saturação do catalisador. É importante destacar que os produtos de transformação também poderiam competir com a superfície do ZnO a medida que

são formados, mas a concentração experimental ao longo da reação foi menor que a concentração inicial da RST, o que garante a condição de não saturação do catalisador.

A Figura 44 mostra que a RST sofre uma rápida fotodegradação, sendo quase totalmente degradada após 30 min. A constante de velocidade de degradação ( $k$ ) e o tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) foram  $0,2159 \text{ s}^{-1}$  e 3,21 min, respectivamente. O coeficiente de correlação ( $r$ ) foi 0,9955, o que confirma a adequação do modelo de pseudo-primeira ordem para descrever a cinética de degradação da RST. Este comportamento está de acordo com um estudo anterior no que diz respeito à degradação fotocatalítica de RST em soluções aquosas contendo ZnO em suspensão, em que a concentração de RST foi analisada através da técnica de espectrofotometria de absorção molecular <sup>(73)</sup>. Nesse estudo, a avaliação cinética mostrou um comportamento de pseudo-primeira ordem pra a degradação do RST, o que confirma os resultados obtidos por meio da técnica de LC-MS-QTOF empregada no presente trabalho. A Figura 45 mostra o perfil cinético dos produtos de transformação da rosuvastatina durante o processo de fotocatalise com ZnO, obtido através das análises por LC-MS-QTOF.

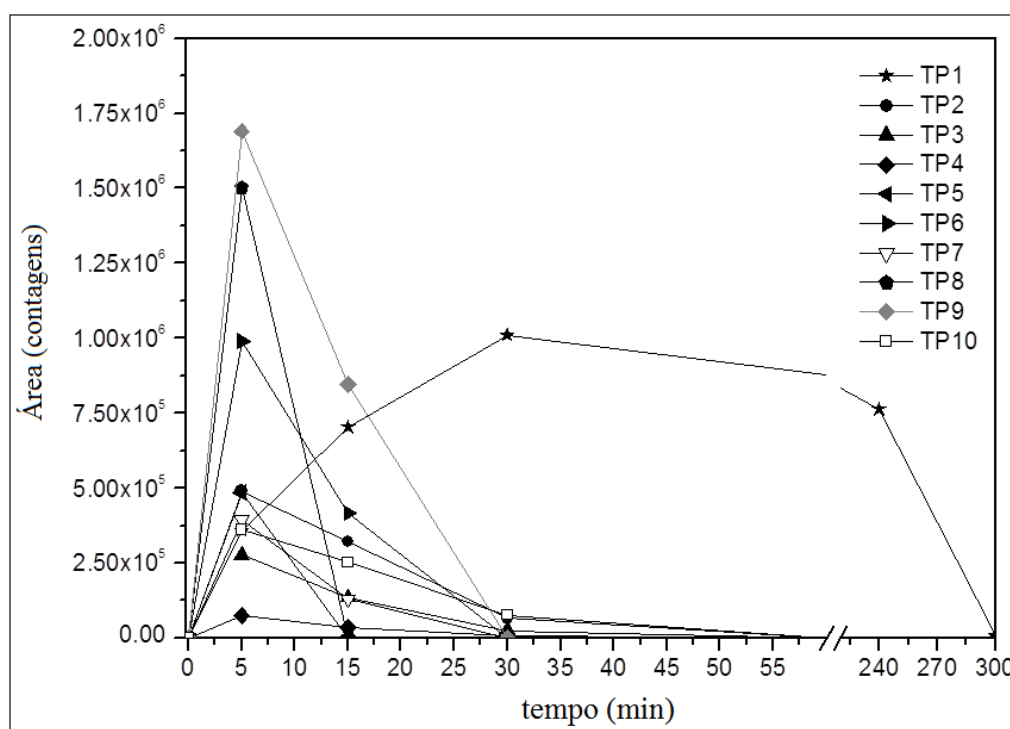


Figura 45 – Concentração dos TPS durante o processo de fotocatalise por ZnO.

Nove dos dez TPS identificados alcançam uma concentração máxima em aproximadamente 5 minutos de fotocatalise. Após, a maioria deles tem a concentração diminuída drasticamente após 30 minutos, exceto para o TP1, que permanece com a sua

concentração praticamente constante até 260 minutos para depois ser degradado completamente até o tempo de aproximadamente 300 minutos. Esse comportamento é um indicativo que outros produtos de transformação que são formados ao longo do processo acabam por gerar o TP1, o que explica a sua persistência. A degradação da RST começa com o ataque eletrofílico do radical hidroxila, favorecendo o surgimento de vários compostos hidroxilados. Estes compostos em seguida sofrem decomposição através de sucessivas reações.

Em estudos anteriores com *D. magna* <sup>(73)</sup> avaliou-se a toxicidade aguda da RST em solução aquosa e de efluentes gerados pela fotocatalise com ZnO. Os resultados obtidos mostram que os TPs formados pela fotocatalise são mais tóxicos que a RST em si. Como o TP1 é o mais persistente, ele poderia ser o responsável pelo aumento da toxicidade do sistema, pois os demais TPs são degradados logo após a primeira hora de fotocatalise. Além disso, conforme foi citado anteriormente, estudos de toxicidade *in silico* mostraram que a rosuvastatina e os seus subprodutos da degradação são potencialmente carcinogênicos devido à presença de derivados de pirimidina.

#### **4.4 Identificação dos Produtos Transformação do Sulfametoxazol**

O sulfametoxazol (SMX) foi submetido ao processo de fotólise, conforme descrito em 3.2, para posterior análise por LC-Q-TOF-MS. A Figura 46 apresenta os espectros MS e MS/MS do sulfametoxazol.

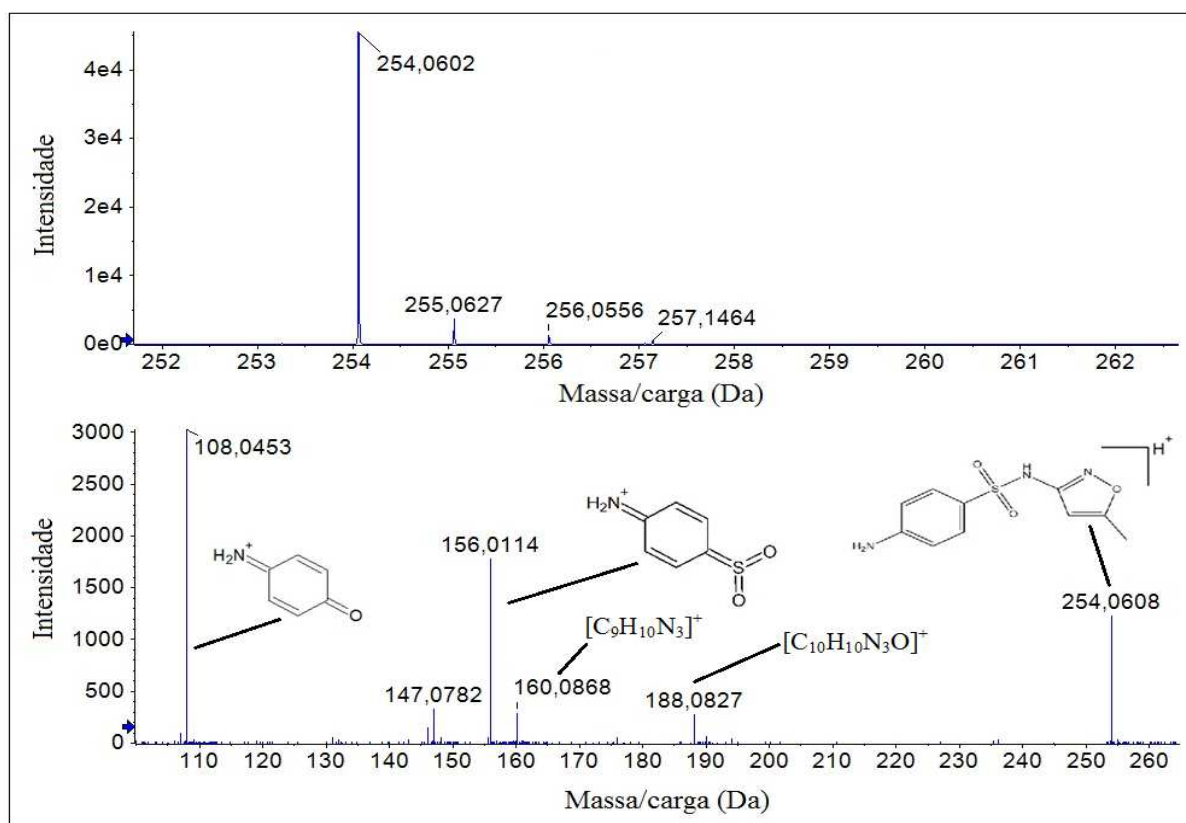


Figura 46 – Espectro MS (quadro superior) e MS/MS (quadro inferior) do sulfametoxazol, em solução aquosa na concentração de  $10 \text{ mg L}^{-1}$ .

O espectro MS experimental (presente no quadro superior da Figura 46) é similar ao espectro teórico apresentado na Figura 14. A fragmentação CID apresentada no quadro inferior da Figura 46 foi obtido com uma energia de colisão de 35 eV. Essa valor de energia foi escolhido por gerar um espectro com uma relação adequada entre a intensidade do íon pseudo-molecular ( $m/z$  254,0608) e os picos mais intensos ( $m/z$  108,0453 e 156,0114). Quando comparamos o espectro MS/MS da rosuvastatina com o do sulfametoxazol, observamos que o primeiro possui mais picos de fragmentação do que o segundo. Isso ocorre haja vista que a molécula da RST é muito mais complexa do que a do SMX, o que possibilita a formação de uma variedade muito maior de íons na fragmentação por CID.

Foram identificados 10 principais produtos de transformação na fotólise do sulfametoxazol. A Figura 47 apresenta três cromatogramas sobrepostos, referentes à amostra que não sofreu fotólise; à amostra após 30 minutos de fotólise e à amostra após 240 minutos de fotólise. O Quadro 27 apresenta as fórmulas dos fragmentos CID, valores de massa exata dos íons, erros experimentais de massa e valores de RDBE, tanto para o SMX quanto para os seus produtos de transformação gerados através da fotólise direta.

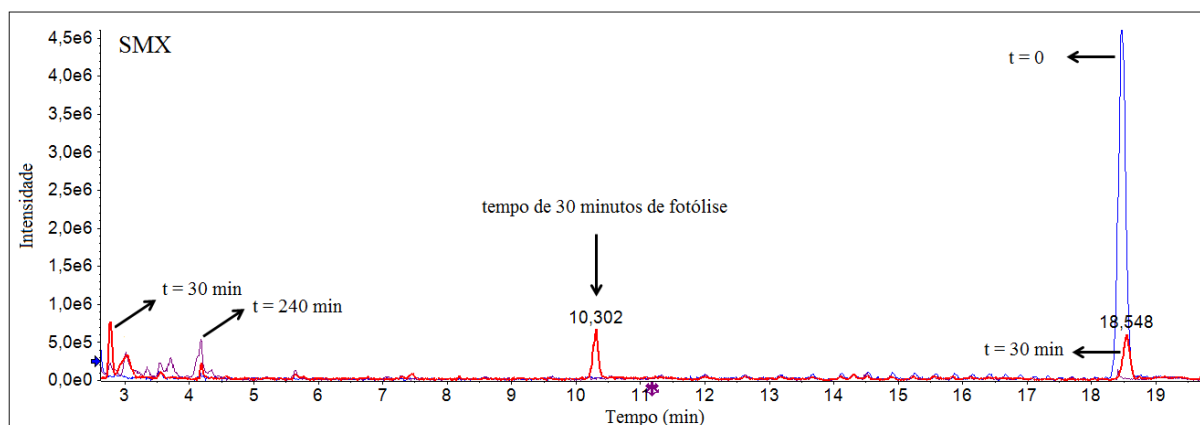
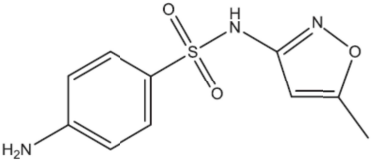
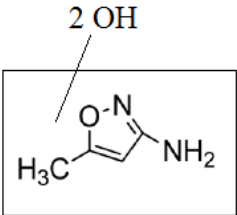
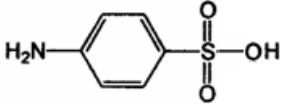
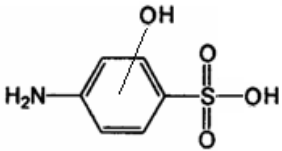
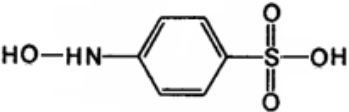


Figura 47 – Cromatogramas sobrepostos das amostras de sulfametoxazol submetidas a fotólise em tempo zero, 30 minutos e 240 minutos.

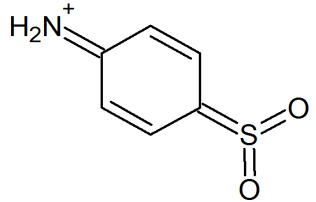
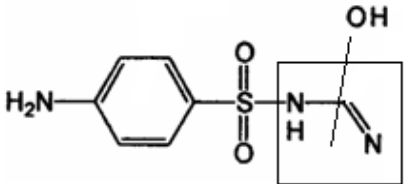
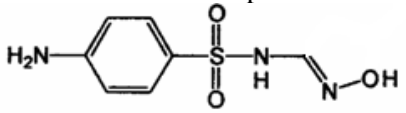
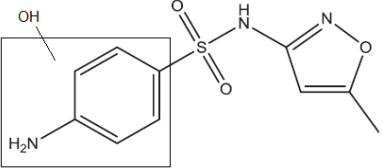
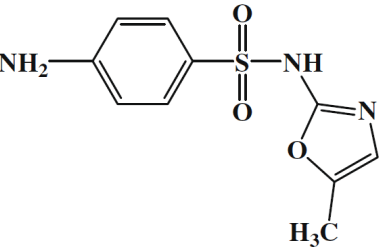
Podemos observar que após 30 minutos de fotólise a concentração do sulfametoxazol (pico com  $t_R$  de 18,5 min) diminui consideravelmente. No tempo referente a 240 minutos de fotólise esse pico praticamente desapareceu.

Quadro 27 – Dados de massa exata determinados mediante análise do sulfametoxazol por LC-QTOF-MS/MS e seus prováveis produtos de transformação gerados por fotólise.

Estrutura	t <sub>R</sub> (min)	Fórmula (Íon) [M+H] <sup>+</sup>	Massa Experimental	Massa Calculada	Erro (ppm)	RDBE
SMX	18,5	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	254,0602	254,0594	3,1	7,0
		C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> N <sub>3</sub> O	188,0827	188,0827	4,6	8,0
		C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> N <sub>3</sub>	160,0868	160,0869	-0,6	7,0
		C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> NO <sub>2</sub> S	156,0114	156,0114	0,0	5,0
		C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub>	147,0782	147,0791	-6,1	6,5
		C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> NO	108,04530	108,0444	8,3	5,0
TP1	2,9	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	133,0606	133,0608	-1,5	2,0
		C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	115,0505	115,0502	2,6	3,0
TP2	3,0	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>3</sub> S	174,0219	174,0219	0,0	4
						
TP3	3,0	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>4</sub> S	190,0159	190,0169	-5,0	4,0
Proposta 1 (mais provável):		C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> NO <sub>3</sub> S	172,0072	172,0063	5,2	5,0
		C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> NO <sub>2</sub>	124,0394	124,0393	0,8	5
		C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NO <sub>2</sub>	122,0244	122,0237	5,7	6
		C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> NO	109,0536	109,0522	12,8	4,5
	Proposta 2:		C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> NO	108,0455	108,0444	10,2
						



TP4	3,0	$C_7H_{10}N_3O_3S$	216,0428	216,0437	-4,2	5,0
Proposta 1:		$C_7H_7N_2O_3S$	199,0165	199,0172	-3,5	6,0
		$C_6H_8NO_3S$	174,0198	174,0219	-12,1	4,0
		$C_7H_9N_3$	135,0793	135,0791	1,5	5,5
		$C_7H_6N_2$	118,0524	118,0526	-1,7	6,5
		$C_6H_5O_2$	109,0282	109,0284	-1,8	5
Proposta 2						
TP5	4,2	$C_7H_{10}N_3O_4S$	232,0376	232,0387	-4,7	5,0
Proposta 1		$C_7H_7N_2O_4S$	215,0112	215,0121	-4,1	6,0
		$C_7H_8N_3O_3S$	214,0297	214,0281	7,5	6,0
		$C_6H_8NO_4S$	190,0161	190,0169	-4,2	4,0
		$C_7H_8N_3O_2$	166,0606	166,0611	-3,0	6
		$C_7H_5N_2O_2$	149,0331	149,0346	-10,1	7,0
		$C_6H_6NO_2$	124,0397	124,0393	3,2	5,0
		$C_6H_7NO$	109,0532	109,0522	9,2	4,5
Proposta 2		$C_6H_6NO$	108,0442	108,0444	-1,9	5,0
TP6	7,3	$C_6H_6NO_2S$	156,0112	156,0114	-1,3	5

		$C_6H_6NO$	108,04500	108,0444	5,6	5
TP7	7,4	$C_7H_{10}N_3O_3S$	216,0427	216,0437	-4,6	5,0
		$C_6H_6NO_2S$	156,01170	156,0114	1,9	5,0
Estrutura mais provável:		$C_6H_6NO$	108,04500	108,0444	5,6	5,0
						
TP8	9,1	$C_{10}H_{12}N_3O_4S$	270,0532	270,05430	-4,1	7
		$C_6H_6NO_3S$	172,0060	172,0063	-1,7	5
		$C_6H_6NO_2$	124,0392	124,0393	-0,8	5
		$C_6H_6NO$	108,0444	108,0444	0,0	5
TP9	10,3	$C_{10}H_{12}N_3O_3S$	254,0595	254,0594	0,4	7
		$C_6H_6NO_2S$	156,0109	156,0114	-3,2	5
		$C_6H_6NOS$	140,0156	140,0165	-6,4	5
		$C_6H_6NO$	108,04510	108,0444	6,5	5
TP10	16,8	$C_{10}H_{12}N_3O_4S$	270,0527	270,05430	0,7	7
		$C_6H_6NO_3S$	172,0035	172,0063	-16,3	5

	$C_6H_6NO_2$	124,0396	124,03930	2,4	5
	$C_6H_7NO$	109,0516	109,05222	-5,5	4,5
	$C_6H_6NO$	108,04480	108,0444	3,7	5

Em relação ao TP1, o valor de massa exata indica que o composto em questão se refere ao do  $C_4H_9N_2O_3$ . O fragmento com  $m/z$  115 Da ( $C_4H_7N_2O_2$ ) corresponde a uma perda neutra de água. Essa perda ocorre com o aumento do valor de RDBE em uma unidade, conforme o esperado para a eliminação de uma molécula de água. Apesar do TP1 ser citado no Quadro 27, não é possível determinar a estrutura do composto, pois os dados de fragmentação não são suficientes para tal. Cabe ressaltar que O TP1 possui RDBE igual a dois, o que implica que a estrutura correta para o composto ou não contém o anel ou não possui as duas ligações duplas presentes na estrutura proposta para o TP1.

O composto apresentado como TP2 possui massa exata e RDBE que indicam que se trata do  $C_6H_8NO_3S$ , sendo a sua estrutura proposta no Quadro 27. Como a contagem de íons foi muito baixa, os picos de fragmentação ficaram com sinal equivalente ao do ruído, o que impossibilitou a confirmação da estrutura da molécula, apesar dela ser proposta em três diferentes publicações: 38 (Trovó A. G. *et al*), 39 (Bonvin, F. *et al*) e 40 (Trovó A. G. *et al*).

Os dados de massa exata indicam que o íon que elui no tempo de 3 minutos e que apresenta  $m/z$  190,0159 Da, possui a fórmula molecular  $C_6H_8NO_4S$ . Duas propostas de estruturas constam no Quadro 27 para o TP3. O padrão de fragmentação MS/MS para o composto não permite chegar a uma conclusão definitiva para a estrutura. Porém, os fragmentos CID encontrados para esse íon são diferentes daqueles informados por Trovó A. G. *et al* <sup>(38)</sup>, que apresenta a estrutura da proposta 2 no Quadro 27 como um TP da fotólise do SMX. Além disso, cálculos *ab initio* (vide Quadro 28) foram realizados para avaliar a estabilidade dos compostos em face da substituição de um hidrogênio do anel aromático por uma hidroxila. Os resultados indicam que quando a hidroxila está localizada no anel aromático do SMX, temos uma estrutura muito mais estável do que aquela em que a hidroxila está ligada diretamente a esse grupo amino. Assim, é possível inferir que a hidroxila está localizada no anel aromático, apesar do padrão de fragmentação não apresentar picos que permitam uma conclusão definitiva em relação a essa questão.

O valor de  $m/z$  encontrado para o TP4 ( $t_R$  3,0 min) foi de 216,0428 Da. Para o TP7 ( $t_R$  7,4min), foi de 216,0427 Da. A análise dos resultados indicou que ambos os íons  $[M+H]^+$  possuem a fórmula  $C_7H_{10}N_3O_3S$ . Os diferentes tempos de retenção e os diferentes espectros MS/MS, conforme apresentado nas Figuras 18 e 49, indicam que se trata de compostos diferentes.

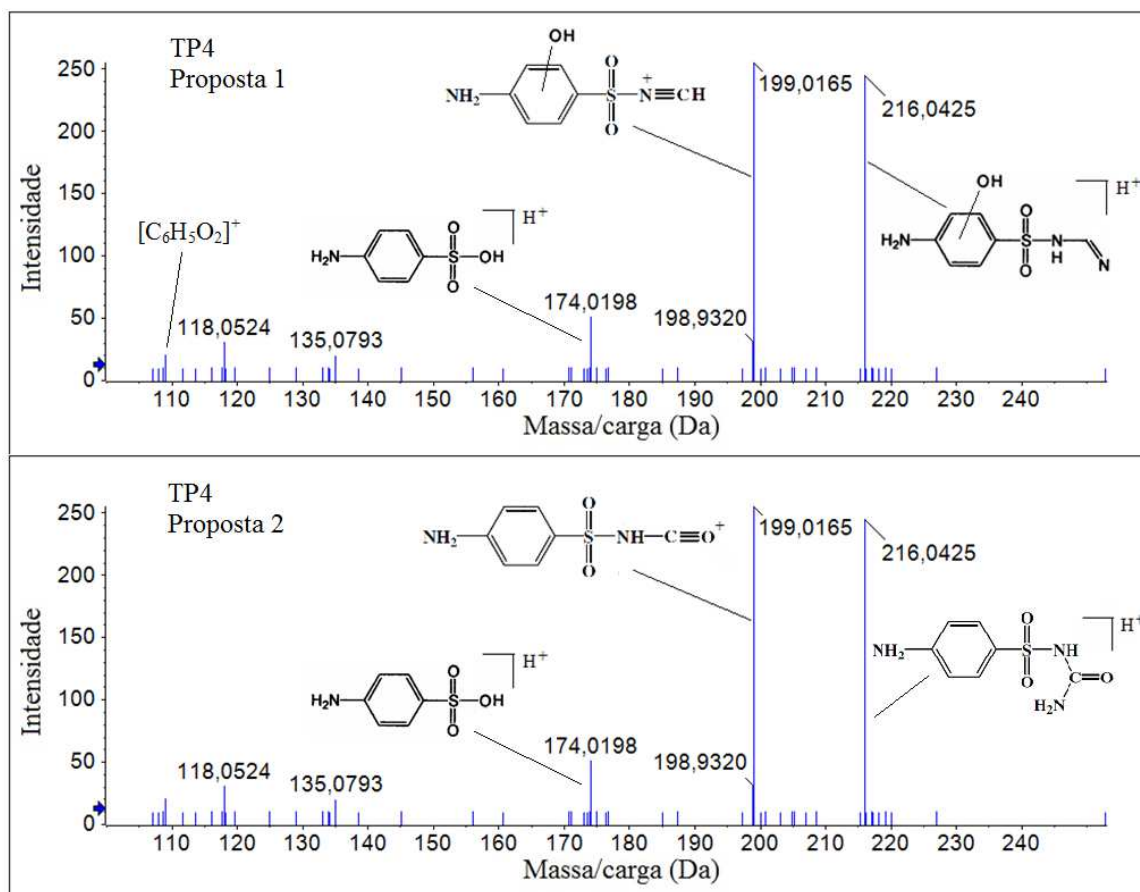


Figura 48 – Espectro de massas em modo MS/MS do composto TP4 com as duas propostas de estrutura e de padrão de fragmentação.

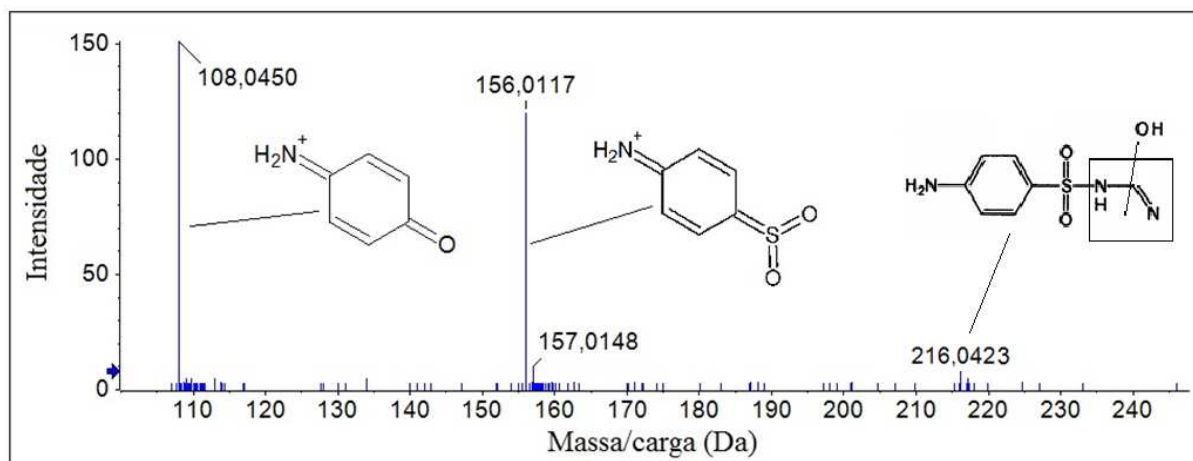


Figura 49 – Espectro de massas em MS/MS do TP7.

Conforme pode ser visto na Figura 48, o TP4 deu origem a um pico intenso referente à perda de amônia com  $m/z$  de 199 Da. É interessante notar que essa perda não está evidenciada no espectro MS/MS do sulfametoxazol, o que indica que a perda não tem origem no

nitrogênio ligado ao anel aromático. Além disso, a perda provoca o aumento do valor de RDBE em uma unidade, o que indica a formação de instauração adicional. Esse pico pode ser explicado tanto através da proposta 1 quanto da proposta 2 presentes na Figura 48, o que torna inconclusiva a estrutura do TP4. O pico com  $m/z$  174 Da ( $C_6H_8NO_3S$ ) é originado a partir do composto com  $m/z$  216 Da (íon pai) a partir de uma perda de  $CH_2N_2$ , e vem acompanhado de uma redução no valor de RDBE em uma unidade. A presença desse pico também não é suficiente para definir qual a proposta é a mais provável. Os picos com  $m/z$  135 e 118 Da não contribuem para a elucidação da estrutura, pois são formados a partir de um rearranjo durante o processo de fragmentação CID, porém não possuem oxigênio em sua estrutura. A presença do pico com  $m/z$  109,0282 Da favorece a proposta 1, pois indica uma hidroxila provavelmente ligada ao anel aromático. Esse pico corresponde ao íon  $[C_6H_5O_2]^+$ , porém a sua baixa intensidade associada a ausência de outros picos que evidenciem a estrutura correta, dificulta conclusão em relação à proposta 1 e à proposta 2 para o TP4.

Em relação ao TP7 ( $t_R$  7,4;  $m/z$  216,0427 Da -  $C_7H_{10}N_3O_3S$ ) o seu espectro MS/MS apresenta apenas dois fragmentos ( $m/z$  156 e 108). Esses picos também são os dois mais intensos do SMX. O fato do composto não apresentar perda de amônia neutra (pico MS/MS mais intenso para o seu isômero TP4) é um indício que a hidroxila está ligada ao nitrogênio no final da cadeia, no entanto os resultados são inconclusivos pela falta de informações mais robustas.

O composto com tempo de retenção de 4,2 minutos e  $m/z$  de 232,0387 corresponde ao  $C_7H_{10}N_3O_4S$ , identificado como TP5. Esse composto trata-se do TP4 hidroxilado. O composto apresenta em seu espectro MS/MS uma perda neutra de amônia e perda neutra de água. O pico correspondente ao  $m/z$  de 190,0161 Da ( $C_6H_8NO_4S$ ) equivale ao TP3. O fragmento com  $m/z$  124,0393 Da corresponde ao íon com fórmula  $[C_6H_6NO_2]^+$ . A presença desse fragmento indica que um dos oxigênios está ligado ao anel aromático na forma de uma hidroxila.

O composto proposto como TP6 no Quadro 27 é também citado por Trovó A. G. *et al*<sup>(38)</sup>. O seu tempo de retenção foi de 7,3 minutos e sua massa encontrada foi 156,0112 Da, correspondente ao  $C_6H_6NO_2S$ . O seu espectro MS/MS apresenta como pico da perda neutra de SO.

Encontrou-se um produto de transformação (TP9) com a mesma massa do SMX: 254,0595 Da, mas com um tempo de retenção diferente. Enquanto o SMX possui  $t_R$  de 18,5 minutos, o  $t_R$  do TP9 é de 10,3 minutos. O TP9 já foi apresentado em dois trabalhos anteriores<sup>(37, 38)</sup>. Ele é oriundo de um rearranjo devido a abertura do anel de cinco membros

seguido de uma nova ciclização. Da mesma forma que o SMX, os picos mais intensos do espectro MS/MS são os correspondentes a  $m/z$  de 156 e 108 daltons.

O TP8 e o TP10 são dois compostos isômeros que possuem fórmula molecular  $C_{10}H_{12}N_3O_4S$  e massa de 270,0543 Da, com tempos de retenção de 9,1 e 16,8 minutos, respectivamente. Os compostos são originados a partir da hidroxilação da molécula do sulfametoxazol. A única diferença significativa entre os espectros MS/MS do TP8 e TP10 é que o espectro do TP10 apresenta dois picos igualmente intensos na região próxima ao  $m/z$  110 Da: um referente ao  $m/z$  109,0516 Da (que corresponde ao íon  $[C_6H_7NO]^+$ ) e outro ao  $m/z$  108,0444 Da (que corresponde ao íon  $[C_6H_6NO]^+$ ). O TP8, por sua vez, apresenta apenas o pico referente ao  $m/z$  108,0444 Da. O fragmento com  $m/z$  de 109 Da corresponde a um íon com RDBE igual a 4,5, o que dificulta a determinação da sua estrutura por ser uma espécie radicalar com um elétron desemparelhado. É interessante observar que os picos 172 e 124 e 108 Da no espectro MS/MS se referem a compostos que apresentam apenas seis hidrogênios na sua composição. O pico referente ao  $m/z$  109 Da se refere ao composto com sete hidrogênios. Isso indica que ele não pode ter se originado a partir do fragmento com  $m/z$  172 ou 124 Da (muito menos do 108 Da). Logo, pode-se considerar que ele seja derivado diretamente do íon  $m/z$  de 270 Da (íon pai). Dessa forma, temos um bom indicativo de que a posição da hidroxila no TP10 é responsável por favorecer a ruptura da ligação entre o carbono aromático e o enxofre, de forma gerar o pico correspondente ao  $m/z$  109 Da, porém são necessários estudos adicionais para se estabelecer um mecanismo que explique as observações. Vale salientar que para o sulfametoxazol não se observa o pico correspondente ao  $m/z$  109 Da, embora apresente o que corresponde ao  $m/z$  de 108 Da. Os TPs cuja hidroxilação não ocorre na região do anel aromático também não apresentam o pico  $m/z$  109 Da. Apenas os TPs com estruturas propostas para hidroxilação na região do anel aromático homogêneo possuem o pico referente ao  $m/z$  109 Da. Esse fato reforça a hipótese de que a hidroxila na posição adequada tem um papel fundamental para a formação desse fragmento.

A posição aproximada da hidroxila no TP8 e TP10 foi possível pela presença de três oxigênios no fragmento MS/MS com  $m/z$  172 Da, o íon  $[C_6H_6NO_3S]^+$ , que corresponde à perda de  $C_4H_6N_2O$ . Para a formação desse íon, ocorre a ruptura da ligação entre o enxofre e o nitrogênio. O fragmento com  $m/z$  124 Da, que corresponde ao íon  $[C_6H_6NO_2]^+$ , também evidencia que a hidroxila foi adicionada ou no anel aromático ou no nitrogênio ligado a esse anel, pois ele possui dois oxigênios em sua composição.

Como já foi citado anteriormente, as reações de fotólise não são seletivas. Foram encontrados seis diferentes compostos com  $m/z$  270,0543 Da, conforme pode ser visto na Figura 50, que apresenta o cromatograma de extração do íon com  $m/z$  270,0543  $\pm$  0,0005 Da.

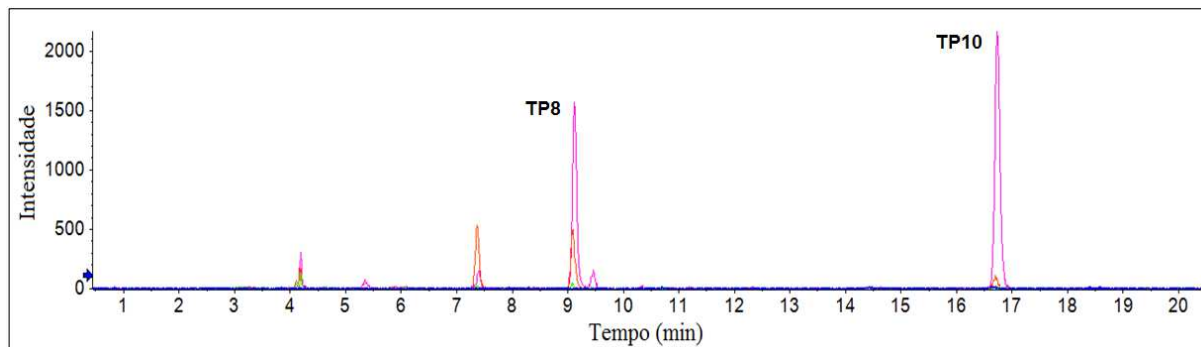


Figura 50 – Cromatograma do íon extraído com  $m/z$  270,0543  $\pm$  0,0005 Da.

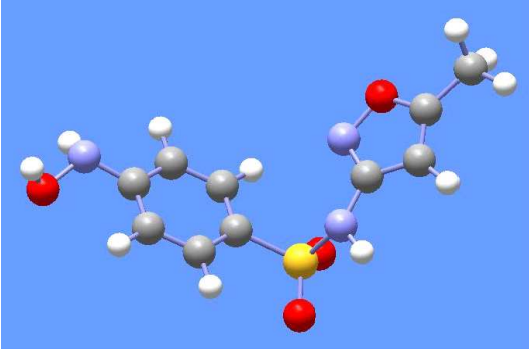
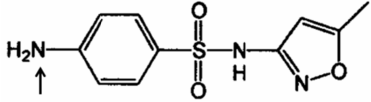
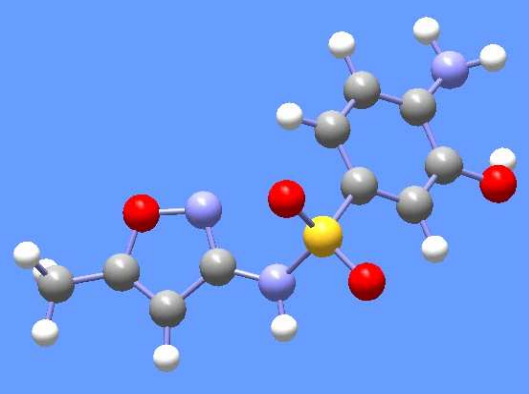
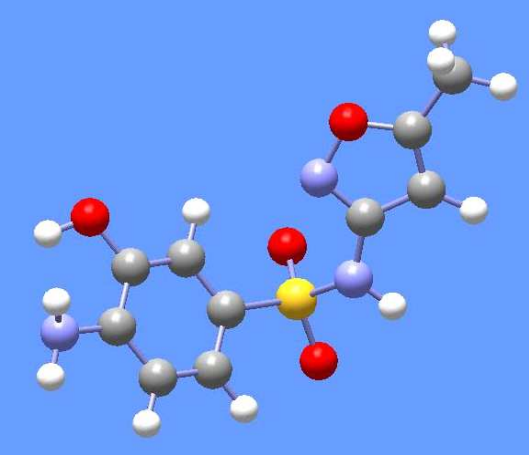
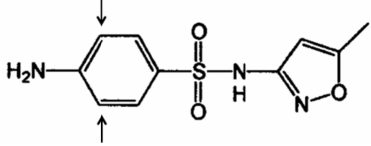
Apenas os compostos com tempo de retenção 9,1 minutos (TP8) e 16,8 minutos (TP10) apresentaram uma intensidade suficiente para análise do padrão de fragmentação. Os demais não foram considerados, pois a intensidade dos picos foi inferior ao mínimo necessário para realizar uma análise sistemática dos mesmos.

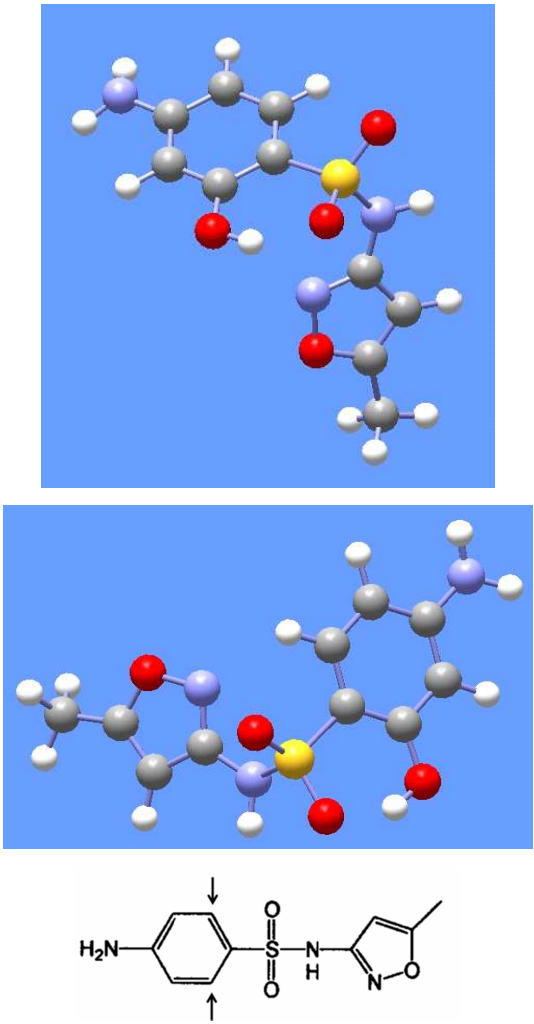
Como ferramenta auxiliar para a determinação das estruturas mais prováveis dos TPs do sulfametoxazol, foram realizados cálculos computacionais a fim de verificar a posição mais provável em que ocorre a substituição do hidrogênio pela hidroxila. O Quadro 28 apresenta as conformações obtidas a partir de cálculos *ab initio* e as respectivas energias em Hartree e  $\text{kJ mol}^{-1}$ .

Quadro 28 – Energias das estruturas do sulfametoxazol hidroxilado em diferentes posições.

<b>Posição da Hidroxila</b>	<b>Massa do íon (daltons) e Fórmula do íon <math>[M + H]^+</math></b>	<b>Energia da conformação mais estável (Eh e <math>\text{kJ mol}^{-1}</math>, respectivamente)</b>
Hidroxila ligada ao NH do anel benzênico	270,0543 $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$	-1251,1192 -3284813,71



 		
<p data-bbox="389 790 660 824">Posição <i>orto</i> ao NH<sub>2</sub></p>   	<p data-bbox="898 1346 1074 1435">270,0543 C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S</p>	<p data-bbox="1182 1294 1334 1328">-1251,1785</p> <p data-bbox="1174 1402 1342 1435">-3284969,40</p>

Posição 3 - <i>meta</i> ao NH <sub>2</sub>		
	<p>270,0543</p> <p>C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S</p>	<p>-1251,1888</p> <p>-3284996,44</p>

Os dados obtidos a partir de cálculos *ab initio* mostram que a hidroxila na posição *meta* ao grupo NH<sub>2</sub> no anel aromático forma um composto com uma energia 182,73 kJ mol<sup>-1</sup> menor do que aquela quando a hidroxila está ligada diretamente ao nitrogênio ligado ao anel benzênico. Para a hidroxila na posição *meta* ao NH<sub>2</sub>, a energia é 27,04 kJ mol<sup>-1</sup> menor do que na posição *orto* a esse substituinte. Conforme pode ser visto nas estruturas otimizadas propostas no Quadro 28, quando a hidroxila está localizada na posição *meta* em relação ao NH<sub>2</sub>, o hidrogênio da hidroxila pode interagir com os oxigênios ligados ao enxofre, estabilizando a molécula. Assim, embora seja provável que exista uma mistura de compostos, pelos resultados dos cálculos teóricos se concluiria que o composto majoritário tenderia a ser aquele com a hidroxila na posição *meta* em relação ao NH<sub>2</sub>. Porém, quando se considera o mecanismo de reação radicalar, a posição *orto* em relação ao grupo NH<sub>2</sub> é, em princípio, favorecida para a entrada da hidroxila, tendo em vista a maior densidade de carga oriunda das

estruturas de ressonância do anel aromático. Esse fato levanta dúvidas em relação aos resultados *in silico* obtidos para essa simulação.

Da mesma forma que ocorreu com a RST, inúmeros outros potenciais produtos de transformação/degradação minoritários do SMX foram detectados, porém não foram considerados devido as suas baixas intensidades que geraram espectros MS/MS sem as condições mínimas de interpretação.

#### 4.5 Identificação dos Produtos Transformação do Ciprofloxacino

O antibiótico ciprofloxacino (CFX) foi submetido à reação de fotólise conforme descrito em 3.2 para posterior análise por LC-QTOF-MS. A Figura 51 apresenta o cromatograma do ciprofloxacino. O tempo de retenção obtido foi de 12,44 minutos nas condições definidas no capítulo 3. Os espectros experimentais MS e MS/MS do CFX são apresentados na Figura 52.

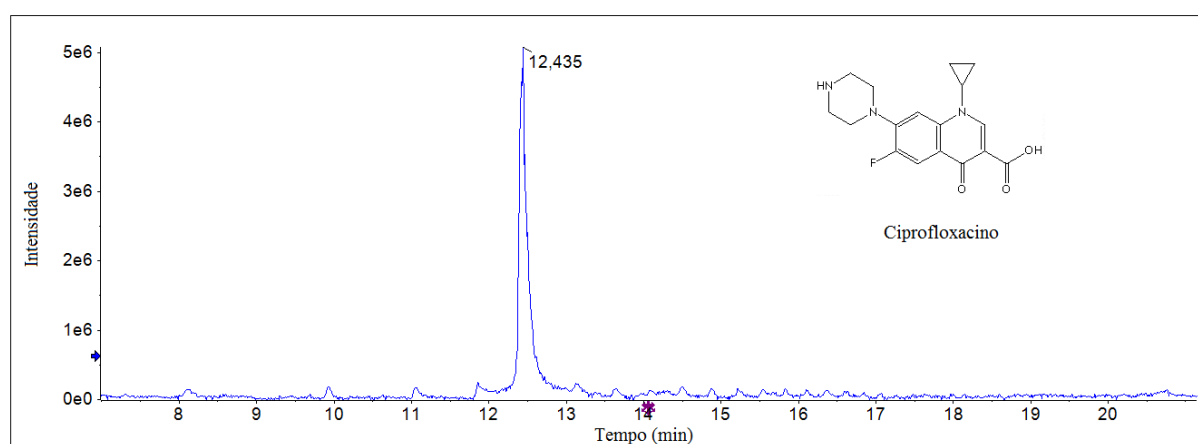


Figura 51 – Cromatograma do ciprofloxacino na concentração de 10 mg L<sup>-1</sup>.

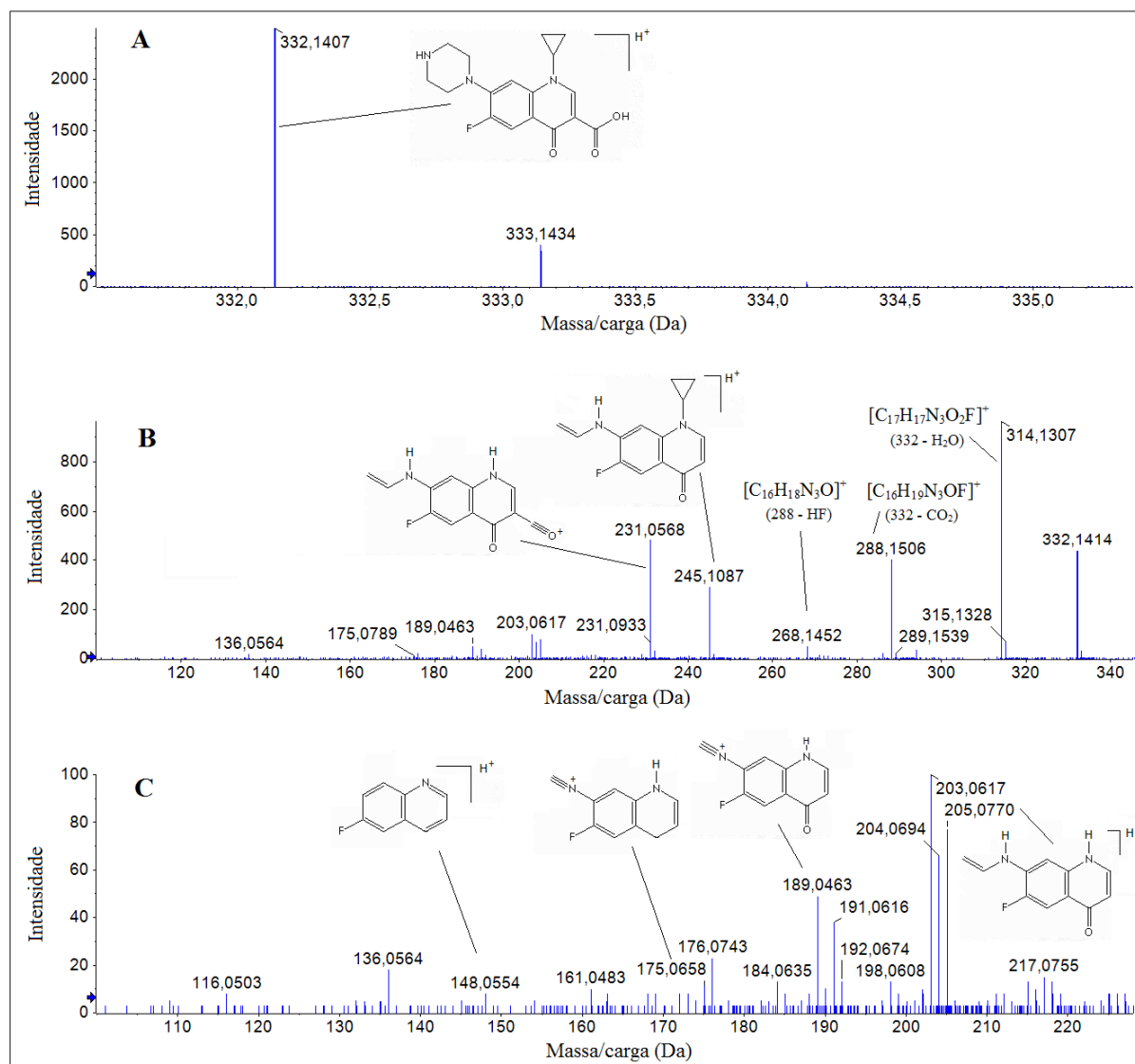


Figura 52 – Espectro MS do CFX (A) - espectro MS/MS do CFX (B) – espectro MS/MS ampliado na região de  $m/z$  100 a 230 Da (C).

A Figura 52-A, apresenta o espectro em MS do ciprofloxacino protonado. O pico com  $m/z$  de 333,1434 é resultante da distribuição isotópica natural e se refere à molécula do CFX com um átomo de carbono 13 em sua composição. Em “B” e “C” temos o espectro MS/MS com a sugestão dos principais fragmentos. Em “C”, o espectro em MS/MS foi ampliando na região de  $m/z$  entre 100 e 230 Da para facilitar a visualização dos picos.

Dentre os diversos produtos de transformação que foram encontrados na fotólise do ciprofloxacino, quinze tiveram estruturas sugeridas. A Figura 53 apresenta dois cromatogramas sobrepostos de duas amostras de ciprofloxacino, uma sem ser submetida ao processo de fotólise ( $t=0$ ) e outra, submetida à fotólise por 240 minutos.

O Quadro 29 apresenta as fórmulas dos fragmentos CID, valores de massa exata dos íons, erros experimentais de massa e valores de RDBE tanto para o CFX quanto para os seus produtos de transformação gerados através da fotólise direta.

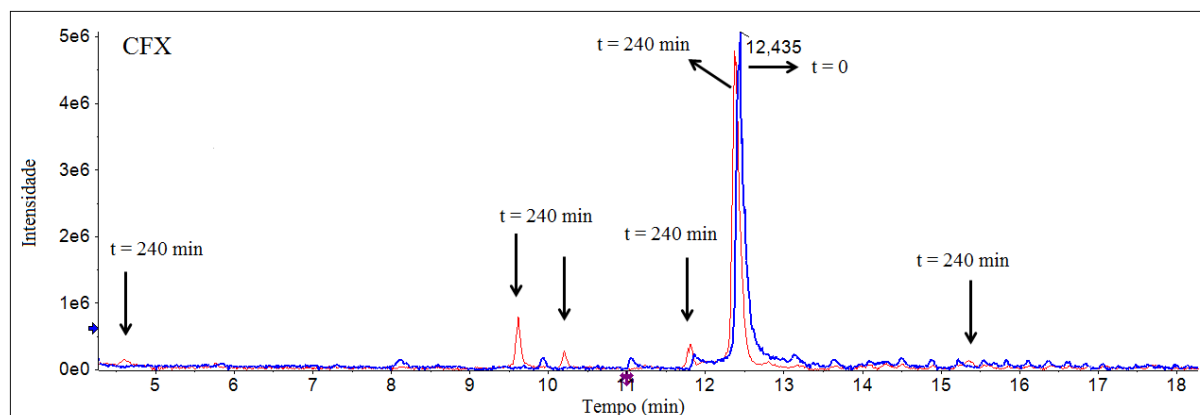
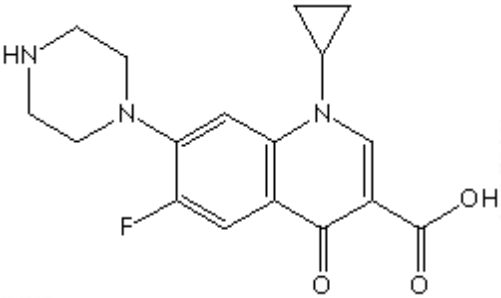
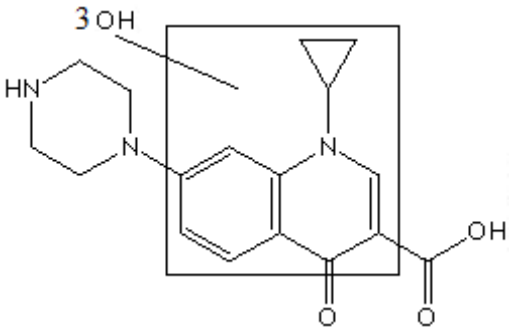
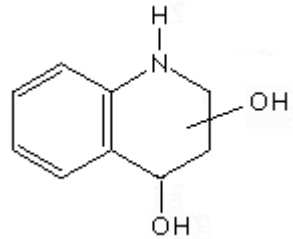
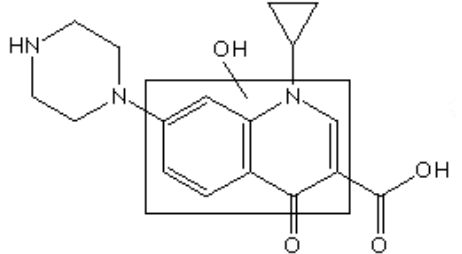


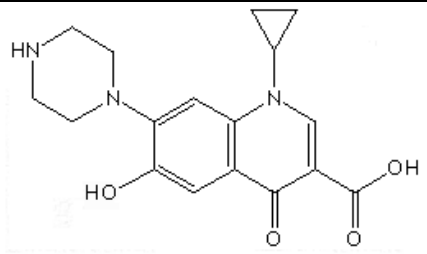
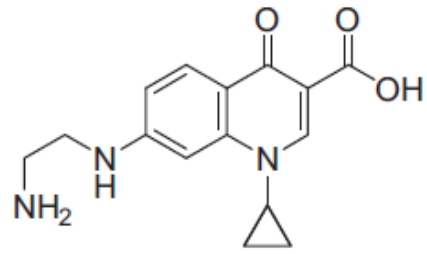
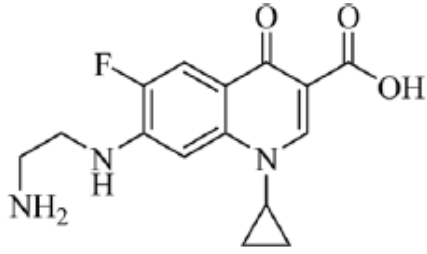
Figura 53 – Cromatogramas sobrepostos das mostras de ciprofloxacino nos tempos de fotólise igual a zero e 240 minutos.

Podemos observar que após 240 minutos de fotólise a área do pico referente ao CFX (12,4 min) ainda aparece bastante intenso, o que demonstra uma considerável resistência da substância a esse processo de degradação.

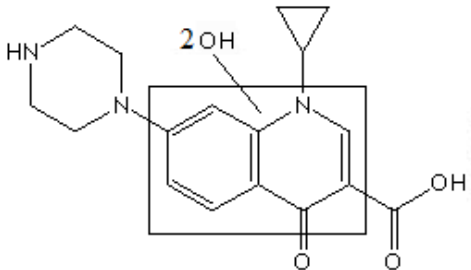
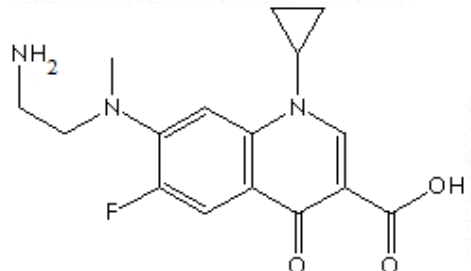
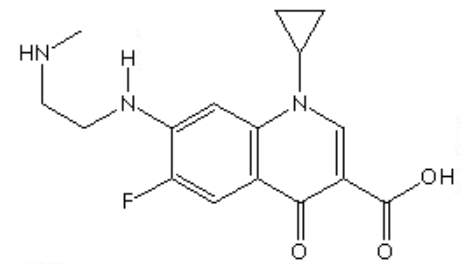
Quadro 29 – Massa exata determinada por LC-QTOF-MS/MS para o ciprofloxacino (CFX) e para seus prováveis produtos de transformação gerados por fotólise, juntamente com as fragmentações identificadas.

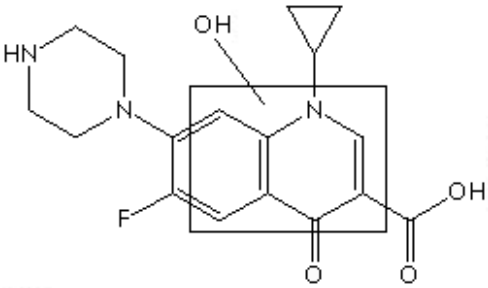
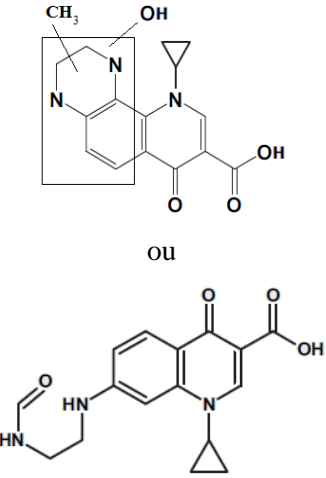
Estrutura	t <sub>R</sub> (min)	Fórmula (Íon) [M+H] <sup>+</sup>	Massa Experimental	Massa Calculada	Erro (ppm)	RDBE
CFX	12,4	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> F	332,1407	332,1405	0,6	10
		C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> F	314,1307	314,1299	2,5	11
		C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> OF	288,1506	288,1507	-0,3	9,0
		C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> N <sub>3</sub> O	268,1452	268,1444	3,0	10
		C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> OF	245,1084	245,1085	-0,4	9,0
		C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> F	231,0567	231,0564	1,3	10
		C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> OF	205,0765	205,0772	-3,4	8
		C <sub>11</sub> H <sub>9</sub> N <sub>2</sub> OF	204,0688	204,0693	-2,5	8,5
		C <sub>11</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> OF	203,0610	203,06152	-2,5	9
		C <sub>10</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> OF	189,0453	189,0459	-3,0	9
		C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> F	175,0663	175,0666	-1,7	8,0
		C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> NF	148,0571	148,0557	9,5	7,0
		C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> NF	136,0564	136,0557	5,1	6,0
TP1	4,6	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	362,1347	362,1347	0,0	10
		C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	344,1245	344,1241	1,2	11
		C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	326,1140	326,1135	1,4	12
		C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	300,1368	300,1343	8,6	10
		C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	298,1188	298,1188	0,7	11
		C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>6</sub>	276,0517	276,0503	5,1	10

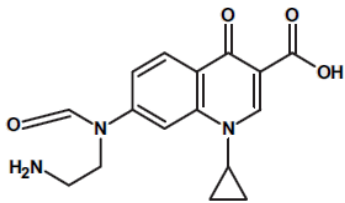
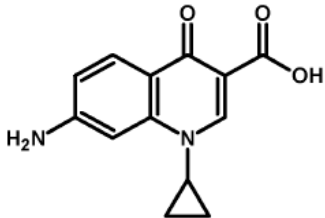
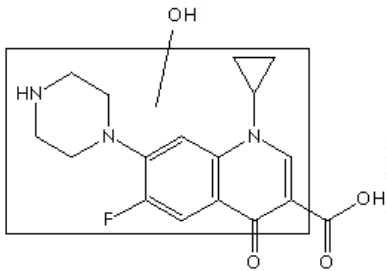
		$C_{13}H_8NO_5$	258,0393	258,0397	-1,6	11
		$C_{14}H_{11}N_2O_3$	255,0772	255,0764	3,1	11
		$C_{12}H_{11}N_2O_3$	231,0758	231,0764	-2,6	9
		$C_{12}H_8NO_3$	214,0496	214,0499	-1,4	10
		$C_{10}H_2NO_4$	199,9967	199,9978	-5,5	11,0
		$C_{11}H_{10}NO_2$	188,0706	188,0706	0,0	8,0
		$C_{10}H_{10}NO$	160,0753	160,0757	-2,5	7,0
<b>TP2</b>	<b>5,8</b>	$C_9H_{12}NO_2$	166,0855	166,0863	-4,8	5
		$C_9H_7O$	131,0468	131,0491	-17,6	7,0
		$C_8H_{10}N$	120,0813	120,0808	4,2	5,0
		$C_8H_8N$	118,0635	118,0651	-13,6	6,0
		$C_7H_7O$	107,0467	107,0491	-22,4	5,0
		$C_8H_7$	103,0549	103,0542	6,8	6,0
<b>TP3</b>	<b>9,6</b>	$C_{17}H_{20}N_3O_4$	330,1453	330,1448	1,5	10
 <p>Mais provável:</p>		$C_{17}H_{18}N_3O_3$	312,1349	312,1343	1,9	11,0
		$C_{16}H_{20}N_3O_2$	286,1549	286,1550	-0,3	9,0
		$C_{16}H_{18}N_3O_2$	284,1390	284,1394	-1,4	10
		$C_{15}H_{13}N_2O_3$	269,0920	269,0921	-0,4	11,0
		$C_{14}H_{15}N_2O_2$	243,1124	243,1128	-1,6	9,0
		$C_{12}H_9N_2O_3$	229,0608	229,0608	0,0	10,0
		$C_{12}H_{13}N_2O_2$	217,0969	217,0972	-1,4	8,0
		$C_{11}H_9N_2O_2$	201,0660	201,0659	0,5	9,0
		$C_{10}H_7N_2O_2$	187,0500	187,050	-1,1	9,0

		$C_{11}H_8NO$	170,0617	170,0600	10,0	9
		$C_9H_6NO_2$	160,0428	160,0393	21,8	8,0
TP4	10,2	$C_{15}H_{18}N_3O_3$	288,1348	288,1343	1,7	9,0
		$C_{15}H_{16}N_3O_2$	270,1256	270,1237	7,0	10
		$C_{15}H_{13}N_2O_2$	253,0965	253,0972	-2,8	11
		$C_{13}H_{11}N_2O_2$	227,0812	227,0815	-1,3	10
		$C_{12}H_7N_2O_2$	211,0494	211,0502	-3,8	11
		$C_{11}H_9N_2O_2$	201,0627	201,0659	-15,9	9
		$C_{11}H_7N_2O_2$	199,0509	199,0502	3,5	10
		$C_9H_8N_2$	144,0691	144,0682	6,2	7,5
		$C_9H_7N_2$	143,0622	143,0604	12,6	8
TP5	11,2	$C_{15}H_{17}N_3O_3F$	306,1249	306,1249	0,0	9
		$C_{15}H_{15}N_3O_2F$	288,1145	288,1143	0,7	10
		$C_{15}H_{14}N_3O_2$	268,1081	268,1081	0,0	11
		$C_{13}H_{10}N_2O_2F$	245,0718	245,0721	-1,2	10
		$C_{12}H_9N_3O_2$	227,0680	227,0689	-4,0	10,5
		$C_{11}H_6N_2O_2F$	217,0409	217,0408	0,5	10
		$C_{10}H_7N_2OF$	190,0535	190,0537	-1,1	8,5
TP6	11,8	$C_{17}H_{20}N_3O_5$	346,1405	346,1398	2,0	10
		$C_{17}H_{18}N_3O_4$	328,1306	328,1292	4,3	11

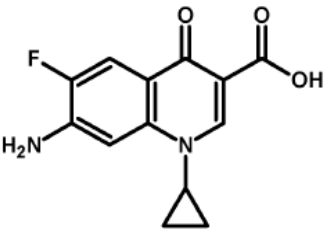
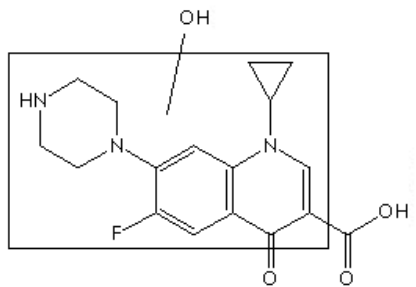


		$C_{16}H_{18}N_3O_3$	300,1346	300,1343	1,0	10
		$C_{14}H_{13}N_3O_4$	287,0893	287,0901	-2,8	10,5
		$C_{13}H_{10}N_3O_4$	272,0664	272,0666	-0,7	11
		$C_{13}H_{11}N_2O_4$	259,0716	259,0713	1,0	10
		$C_{14}H_{13}N_2O_3$	257,0919	257,0921	-0,8	10
		$C_{12}H_9N_2O_4$	245,0558	245,0557	0,4	10
		$C_{10}H_7N_2O_3$	203,0440	203,0451	-5,4	9
		$C_9H_6N_2O_3$	190,0371	190,0373	-1,1	8,5
		$C_{10}H_6NO_3$	188,0339	188,0342	-1,6	9
TP7	11,9	$C_{16}H_{19}N_3O_3F$	320,1411	320,1405	1,9	9
 <p style="text-align: center;">ou</p> 		$C_{16}H_{17}N_3O_2F$	302,1306	302,1299	2,3	10
		$C_{16}H_{16}N_3O_2$	282,1237	282,1237	0,0	11
		$C_{15}H_{19}N_3OF$	276,1519	276,1507	4,3	8,0
		$C_{15}H_{17}N_3OF$	274,1364	274,1350	5,1	9
		$C_{15}H_{18}N_3O$	256,1441	256,1444	-1,2	9
		$C_{11}H_{11}N_3O_3F$	252,0781	252,0779	0,8	8
		$C_{13}H_{14}N_2OF$	233,1092	233,1085	3	8
		$C_{12}H_8N_2O_2F$	231,0567	231,0564	1,3	10
		$C_{12}H_{12}N_2OF$	219,0929	219,0928	0,5	8
		$C_{11}H_{10}N_2OF$	205,0766	205,0772	-2,9	8
		$C_{11}H_{10}NO_3$	204,0668	204,0655	6,4	8
		$C_{10}H_8N_2OF$	191,0621	191,0621	3,1	8
		$C_{11}H_9NOF$	190,0668	190,0663	2,6	8

		$C_9H_8N_2F$	163,0663	163,0666	-1,8	7
		$C_9H_7NF$	148,0548	148,0557	-6,1	7
TP8	12,8	$C_{17}H_{19}N_3O_4F$	348,1349	348,1354	-1,4	10
		$C_{17}H_{17}N_3O_3F$	330,1251	330,1249	0,6	11
		$C_{16}H_{19}N_3O_2F$	304,1462	304,1456	4	9
		$C_{15}H_{12}N_2O_3F$	287,0832	287,0827	1,7	11
		$C_{14}H_{14}N_2O_2F$	261,1049	261,1034	5,7	9
		$C_{12}H_8N_2O_3F$	247,0517	247,0514	0,2	10
		$C_{12}H_{12}N_2O_2F$	235,0884	235,0877	3,0	8
		$C_{10}H_6N_2O_2F$	205,0394	205,0408	-6,8	9
		$C_{10}H_4NO_3F$	205,0176	205,0170	2,9	9,5
		$C_9H_6N_2O_2F$	193,0403	193,0408	-2,6	8
TP9	15,3	$C_{16}H_{18}N_3O_4$	316,1301	316,1292	2,8	10
		$C_{16}H_{16}N_3O_3$	298,1187	298,1186	0,3	11
		$C_{13}H_{11}N_2O_2$	227,0816	227,0815	0,4	10
		$C_{12}H_7N_2O_2$	211,0503	211,0502	0,5	11
		$C_{11}H_7N_2O_2$	199,0502	199,0502	0,0	10
		$C_9H_7N_2$	143,0614	143,0604	4,0	8,0

OU						
						
TP10	16,5	$C_{13}H_{13}N_2O_3$	245,0915	245,0921	-2,4	9,0
		$C_{13}H_{11}N_2O_2$	227,0819	227,0815	1,8	10
		$C_{10}H_7N_2O_2$	187,0484	187,0502	-9,6	9
		$C_{10}H_6N_2O_2$	186,0413	186,0424	-5,9	9,5
		$C_{10}H_5N_2O_2$	185,0355	185,0346	4,9	10
		$C_{10}H_4NO_2$	170,0238	170,0237	0,6	10
		$C_{10}H_{11}N_2$	159,0930	159,0917	8,2	7
		$C_8H_6N_2$	130,0539	130,0526	10	7,5
TP11	16,6	$C_{17}H_{19}N_3O_4F$	348,1357	348,1354	0,9	10
		$C_{17}H_{17}N_3O_3F$	330,1251	330,1249	0,6	11
		$C_{17}H_{15}N_3O_2F$	312,1169	312,1143	8,3	12
		$C_{16}H_{17}N_3O_2F$	302,1327	302,1299	9,3	10
		$C_{15}H_{14}N_2O_3F$	289,0976	289,0983	-2,4	10
		$C_{16}H_{18}N_3OF$	287,1436	287,1428	2,8	9,5
		$C_{14}H_{11}N_3O_2F$	272,0816	272,0830	-5,	11
		$C_{14}H_{14}N_2OF$	245,1087	245,1085	0,8	9

TP12	17,1	$C_{16}H_{17}N_3O_4F$	334,1197	334,1198	-0,3	10,0
<p>OU</p> <p>OU</p>	$C_{16}H_{15}N_3O_3F$	316,1099	316,1092	2,2	11	
	$C_{13}H_{10}N_2O_2F$	245,0759	245,0721	15,5	10	
	$C_{12}H_7N_2O_2F$	230,0506	230,0486	8,7	10,5	
	$C_{12}H_6N_2O_2F$	229,0423	229,0408	6,5	11	
	$C_{11}H_6N_2O_2F$	217,0407	217,0408	-0,5	10	
TP13	17,7	$C_{14}H_{11}N_3O_3F$	288,0774	288,0779	-1,7	11
	$C_{14}H_9N_3O_2F$	270,0678	270,0673	1,9	12	
	$C_{13}H_{11}N_3OF$	244,0921	244,0881	16,4	10	
	$C_{11}H_5N_3O_2F$	230,0365	230,0360	2,2	11	
	$C_{11}H_7N_3OF$	216,0567	216,0568	-0,5	10	
	$C_{11}H_9N_3F$	202,0780	202,0775	2,5	9	
	$C_9H_5N_3F$	174,0471	174,0462	5,2	9	

TP14	19,1	$C_{13}H_{12}N_2O_3F$	263,0823	263,0827	-1,5	9
		$C_{13}H_{10}N_2O_2F$	245,0722	245,0721	0,4	10
		$C_{12}H_{10}N_2OF$	217,0768	217,0772	-1,8	9
		$C_{10}H_6N_2O_2F$	205,0384	205,0408	-11,7	9
		$C_{10}H_5N_2O_2F$	204,0339	204,0330	4,0	9,5
TP15	19,2	$C_{17}H_{19}N_3O_4F$	348,1349	348,1354	-1,4	10
		$C_{17}H_{17}N_3O_3F$	330,1261	330,1249	3,6	11
		$C_{12}H_8N_2O_2F$	231,0562	231,0564	-0,9	10

O TP1 apresenta tempo de retenção de 4,6 minutos, fórmula molecular  $C_{17}H_{20}N_3O_6$  e massa experimental do íon  $[M + H]^+$  de 362,1347 Da. A proposta para a sua estrutura e o seu espectro MS/MS são apresentados na Figura 54.

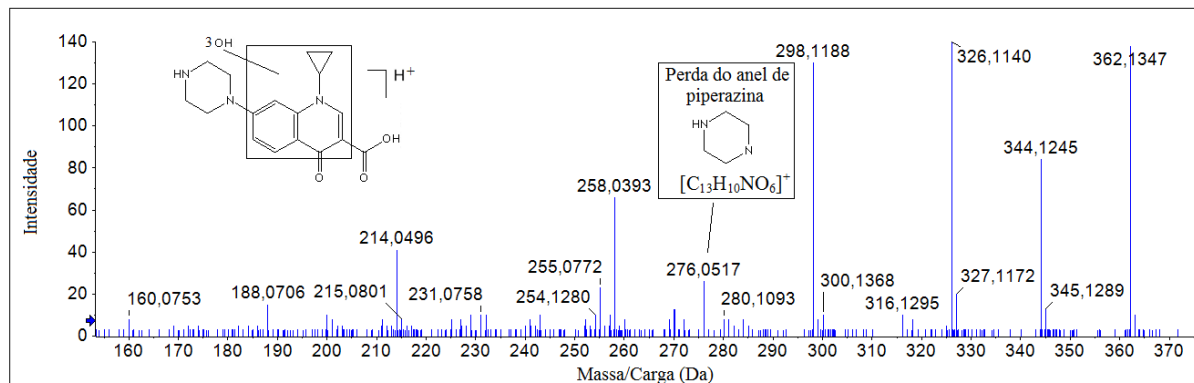


Figura 54 – Espectro MS/MS do TP1.

Podemos observar no espectro MS/MS do TP1 a perda de duas moléculas de água ( $m/z$  344 e 326), de  $CO_2$  ( $m/z$  300) a partir do pico 344 e de  $CO$  ( $m/z$  298) a partir do pico 326. O fragmento com  $m/z$  de 276 ( $C_{13}H_{10}NO_6$ ) é formado pela perda do anel da piperazina (apresentado na Figura 54). Como esse íon possui seis oxigênios na sua estrutura, podemos concluir que o TP1 não possui oxigênios ligados na piperazina. Além disso, é mais provável que as hidroxilas estejam localizadas nos anéis saturados. A localização de hidroxila no anel de três membros é improvável e não foram encontrados fragmentos que permitam indicar a posição exata das hidroxilas.

O pico com tempo de retenção de 5,8 minutos e massa 166,0855 Da foi identificado como TP2. A fórmula molecular do íon é  $C_9H_{12}NO_2$ . A Figura 55 apresenta o espectro MS/MS do TP2 e a proposta da estrutura dos principais fragmentos.

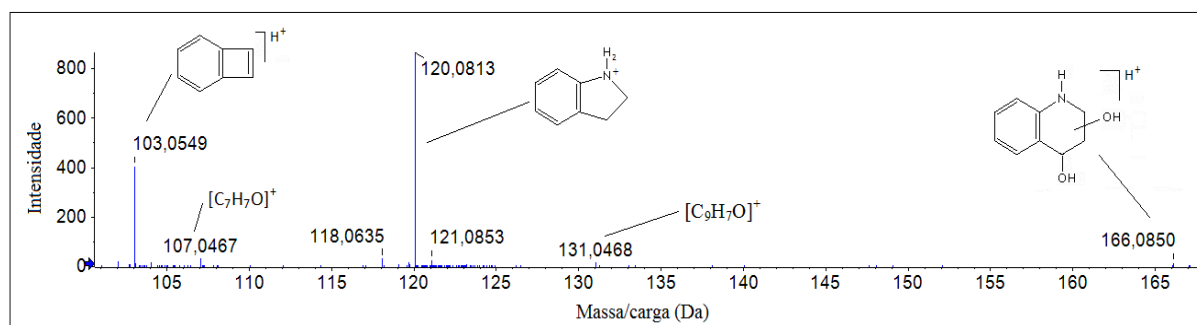


Figura 55 – Espectro de massas em modo MS/MS do TP2.

A estrutura apresentada na Figura 55 para o pico com  $m/z$  de 166 é a mais provável. Como o composto apresenta nove carbonos, um nitrogênio e RDBE igual a cinco, temos um forte indicativo que a molécula compartilha os anéis condensados presentes no CFX. Os fragmentos MS/MS indicam que as hidroxilas estejam localizadas no anel não aromático da molécula.

O espectro MS/MS do composto com tempo de retenção de 9,6 minutos é apresentado na Figura 56, juntamente com a estrutura mais provável do composto. O TP3 apresenta a fórmula  $C_{17}H_{20}N_3O_4$  e a massa encontrada para o íon  $[M+H]^+$  foi 330,1453 Da.

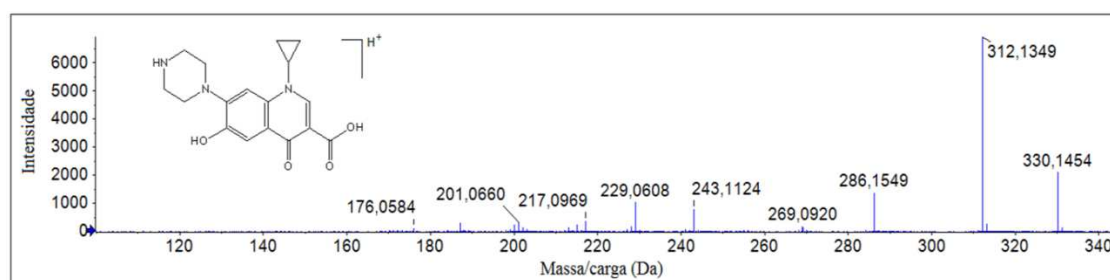


Figura 56 – Espectro de massas em MS/MS do TP3.

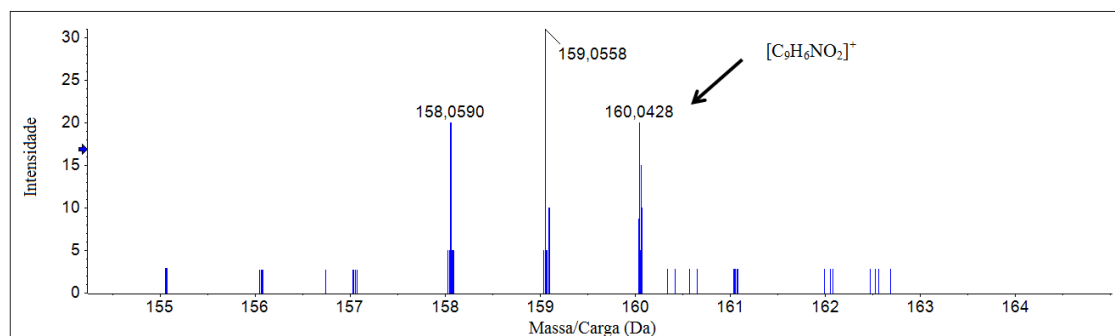


Figura 57 – Ampliação do espectro MS/MS na região próxima ao  $m/z$  160 Da.

O espectro MS/MS do TP3 apresenta grande similaridade com o do CPX, o que é um indicativo de que a hidroxila está ocupando a posição do flúor. Além disso, temos a presença de um pico MS/MS de baixa intensidade, correspondente ao  $m/z$  160,0428 Da (Figura 57), que corresponde ao íon  $C_9H_6NO_2$ , que indica que a hidroxila está localizada nos anéis condensados da molécula.

O TP4 e TP5 diferem apenas na substituição do átomo de flúor do TP5 ( $C_{15}H_{17}N_3O_3F$ ) por um hidrogênio no TP4 ( $C_{15}H_{18}N_3O_3$ ). A diminuição do RDBE em uma unidade em relação ao CFX e a presença do íon  $C_{15}H_{14}N_3O_2$  (268,10810 Da) e íon  $C_{12}H_9N_3O_2$  (227,0680 Da) no TP5 indicam que a perda dos dois carbonos desses TPs é oriunda da abertura do anel piperazina.

O produto de transformação identificado como TP6 corresponde ao composto  $C_{17}H_{20}N_3O_5$ . O fragmento MS/MS com fórmula  $C_{14}H_{13}N_3O_4$  (287,0893 Da) corresponde à perda do anel de três membros a partir do fragmento com  $m/z$  328,1306 Da. A presença do fragmento  $C_9H_6N_2O_3$  (190,0371 Da) indica que as duas hidroxilas adicionais em relação ao CFX estão localizadas nos anéis condensados da molécula.

O TP7 apresenta um padrão de fragmentação muito parecido com o do CFX, conforme apresentado na Figura 58.

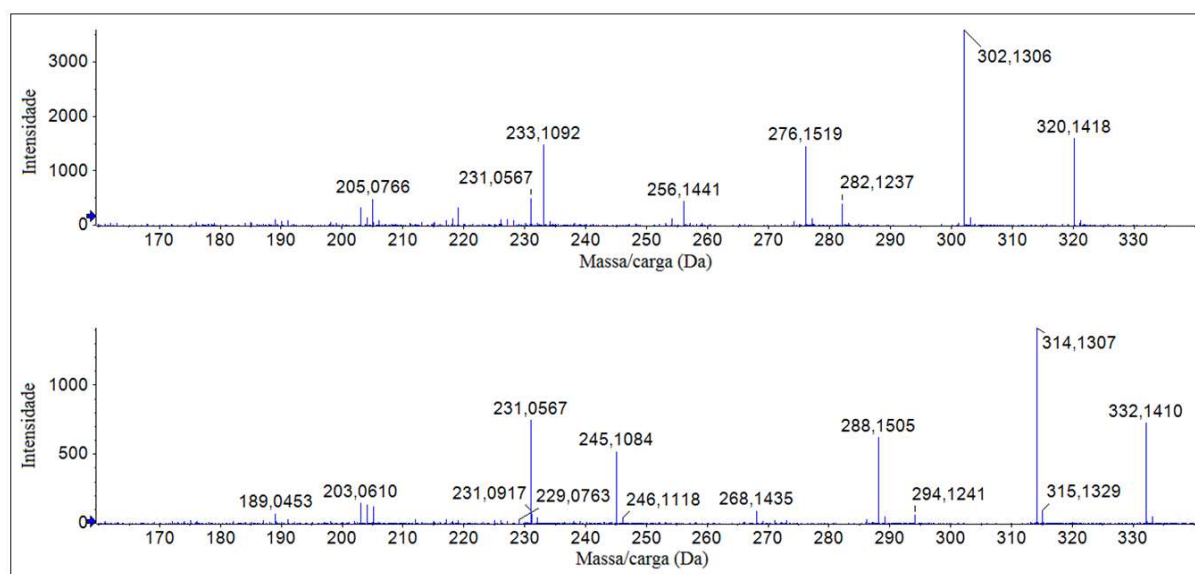


Figura 58 – Espectro de massas MS/MS do TP7 (espectro de massas superior) e do CPX (espectro de massas inferior inferior).

Os valores de  $m/z$  dos fragmentos de massas maiores do TP7 estão deslocados em 12 daltons em relação aos fragmentos do CFX (TP7 302 e CFX 314 – TP7 282 e CFX 294 – TP7 276 e CFX 288 – TP7 256 e CFX 268 – TP7 233 e CFX 245). Isso decorre do fato do TP7 ter um carbono a menos do que o CFX. Na região de massas menores alguns fragmentos são idênticos, haja vista a grande similaridade entre o TP7 e o CFX.

Foram encontrados cinco diferentes compostos com  $m/z$  348,1354 Da, conforme pode ser observado na Figura 59. Eles correspondem ao CFX hidroxilado em diferentes posições.



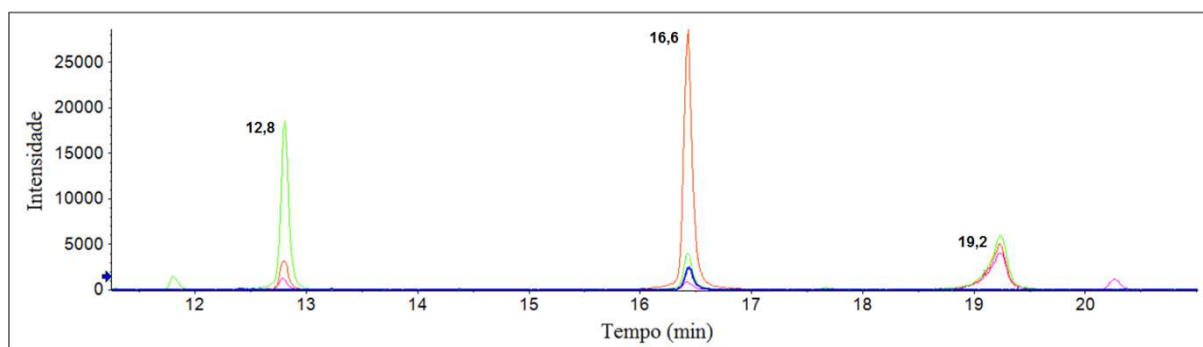


Figura 59 – Cromatogramas de extração do íon  $348,135 \pm 0,001$  Da.

A formação desses cinco diferentes compostos confirma a baixa seletividade dos radicais hidroxila gerados durante a fotólise. Os três compostos majoritários foram analisados (TP8, TP11 e TP15), pois os outros dois não apresentaram intensidade suficiente para possibilitar a análise do espectro MS/MS. A Figura 60 apresenta os espectros MS/MS dos três principais TPs com  $m/z$  de 348 Da.

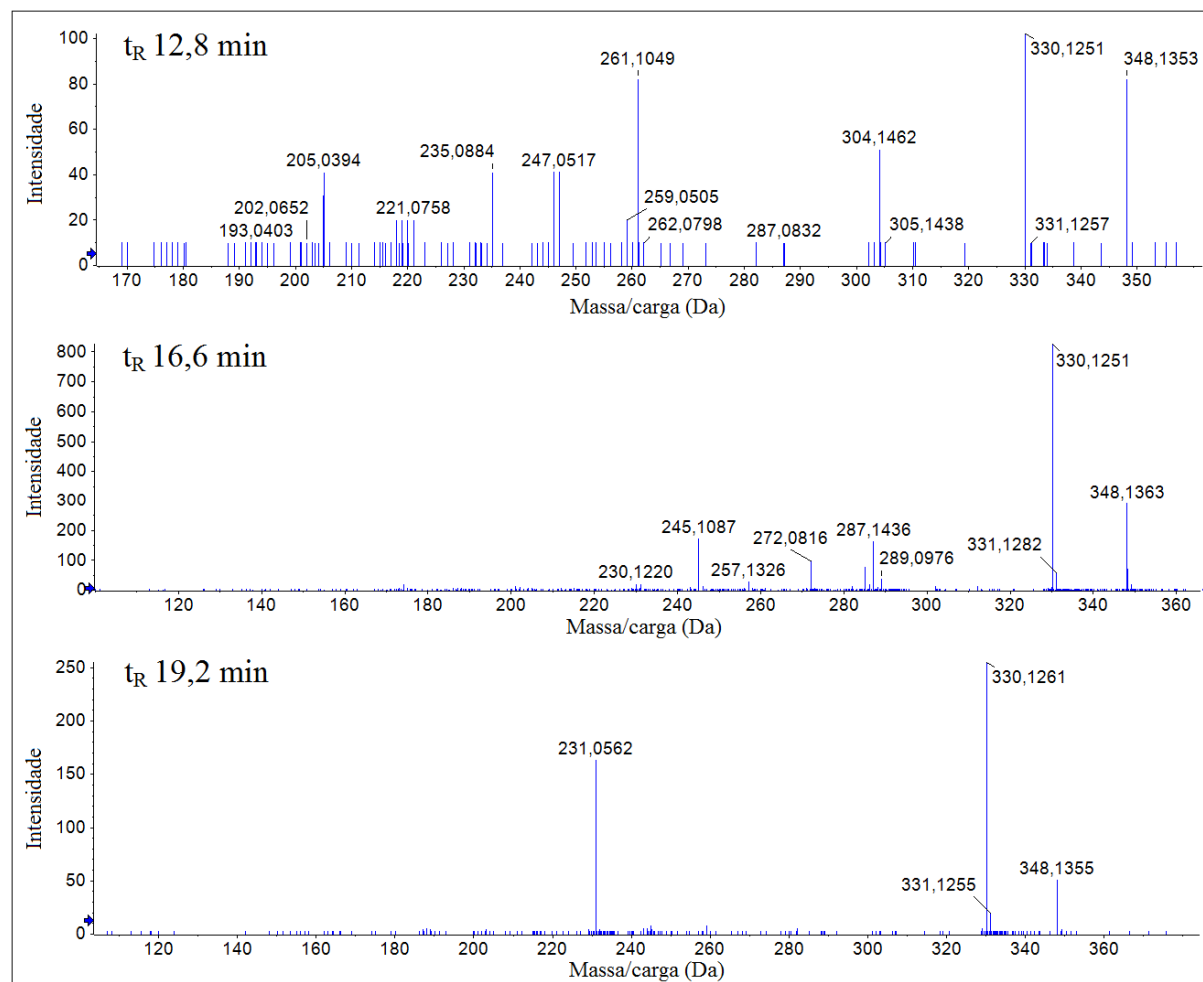


Figura 60 – Produtos de transformação do CFX, com  $m/z$  348 Da e  $t_R$  12,8, 16,6 e 19,2 minutos.

O TP8 apresenta o fragmento com  $m/z$  205,0176 Da que corresponde ao íon  $C_{10}H_4NO_3F$ . Esse fragmento indica que o oxigênio adicional está localizado nos anéis condensados. O TP11 e TP15 não apresentaram fragmentos que possibilitassem identificar a localização da hidroxila adicional, apesar das posições mais favorecidas estarem localizadas nos anéis condensados e no anel piperazina.

O TP9 ( $C_{16}H_{18}N_3O_4$ ,  $m/z$  316,1301 Da) e TP12 ( $C_{16}H_{17}N_3O_4F$ ,  $m/z$  334,1197 Da) diferem entre si pela substituição do flúor do TP12 por um hidrogênio no TP9. Os espectros MS/MS dos dois compostos apresentam grande similaridade, conforme pode ser observado na Figura 61, o que indica que compartilham uma estrutura muito parecida.

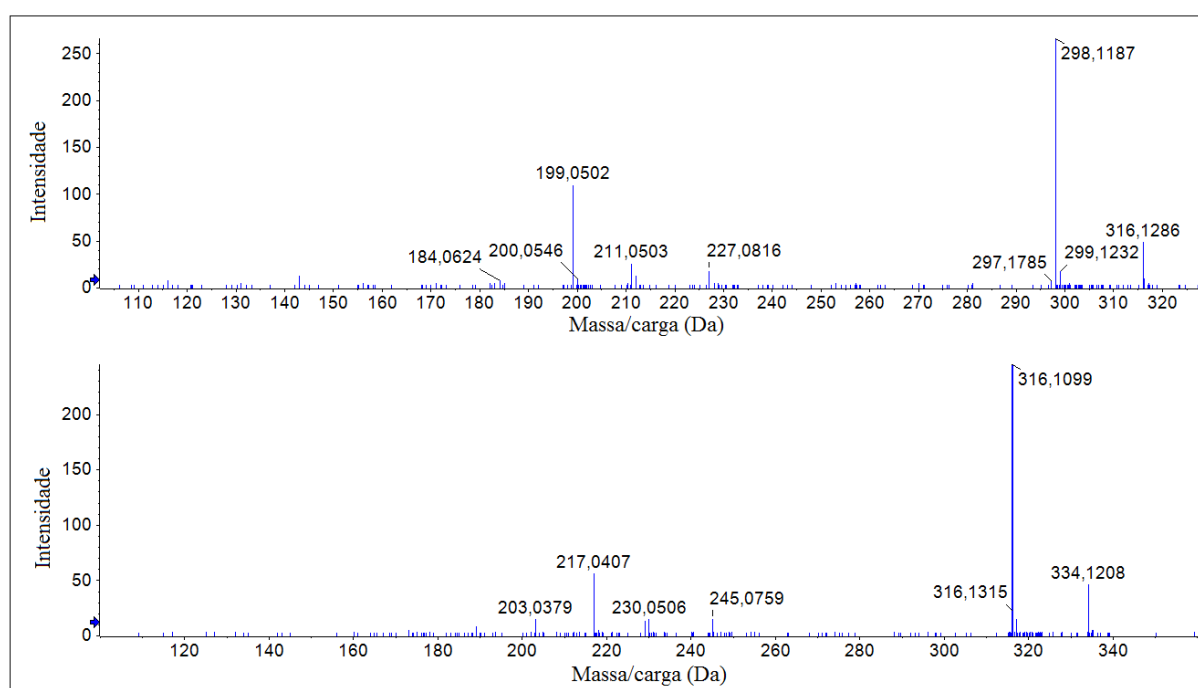


Figura 61 – Espectro de massas em MS/MS do TP9 (Espectro superior) e TP12 (espectro inferior).

Os espectros MS/MS não fornecem informações suficientes para elucidar de forma mais precisa a estrutura dos compostos. O espectro de fragmentação pobre e a ausência de perdas relacionadas à presença do grupo aldeído favorecem as estruturas propostas no Quadro 29 para o TP9 e TP12, que possuem um terceiro anel condensado aos dois já existentes no CFX.

O TP10 possui uma massa experimental de 245,0915 e a fórmula do íon é  $C_{13}H_{13}N_2O_3$ . A diminuição de um nitrogênio em relação ao CFX e a presença de fragmentos

referentes à perda do anel de três membros são informações condizentes com a estrutura proposta para o TP10, presente no Quadro 29.

O produto de transformação identificado como TP13 apresenta  $m/z$  288,0774 Da, que corresponde à fórmula  $C_{14}H_{11}N_3O_3F$  para o íon  $[M+H]^+$ . O seu valor de RDBE é igual a 11. Em relação ao CFX, temos a diminuição de três átomos de carbono e o aumento de RDBE em uma unidade, o que indica o aumento do grau de instauração da molécula. Aliado a isso, todos os fragmentos MS/MS do TP13 possuem três nitrogênios em sua composição, o que não ocorre no CFX, onde se observa a sucessiva perda de nitrogênios durante a fragmentação CID. Esse aumento da estabilidade da região em que se encontram os nitrogênios da piperazina e os valores de RDBE do íon e seus fragmentos sugerem a formação de um novo anel aromático condensado ao outro já existente, conforme consta na proposta do TP13 no Quadro 29.

A estrutura com  $m/z$  experimental de 263,0823 Da corresponde ao composto  $C_{13}H_{12}N_2O_3F$ , identificado como TP14. O sinal muito baixo deste composto reduz o número de picos MS/MS e as suas intensidades. Apesar disso, a diminuição de quatro carbonos e um nitrogênio em relação ao CFX, associado ao valor de RDBE igual a 9 e a presença de fragmentos que correspondem à perda do anel de três membros (205,0384 e 204,0339 Da) sugerem a estrutura proposta no Quadro 29 para o TP14.

Da mesma forma que ocorreu com os demais compostos, outros potenciais produtos de transformação/degradação foram encontrados para a fotólise do ciprofloxacino. No entanto, estes apresentam sinal muito baixo no cromatograma, dificultando a análise dos respectivos espectros de fragmentação.

#### **4.6 Identificação dos Produtos Transformação do Norfloxacin**

O antibiótico norfloxacin (NFX) foi submetido à reação de fotólise conforme descrito em 3.2 para posterior análise por LC-QTOF-MS. A Figura 62 apresenta o cromatograma do norfloxacin e a Figura 63, os seus espectros experimentais MS e MS/MS.

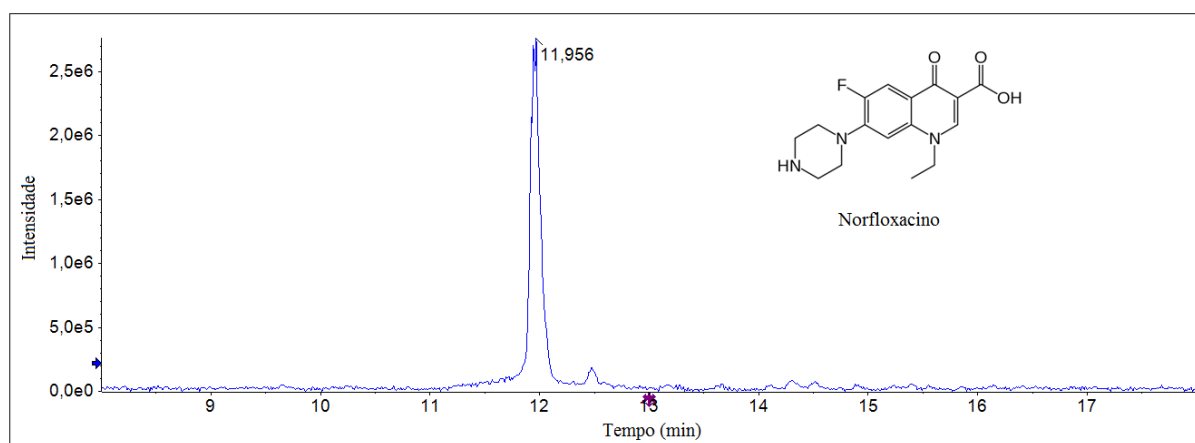


Figura 62 – Cromatograma do norfloxacin na concentração de 10 mg L<sup>-1</sup>.

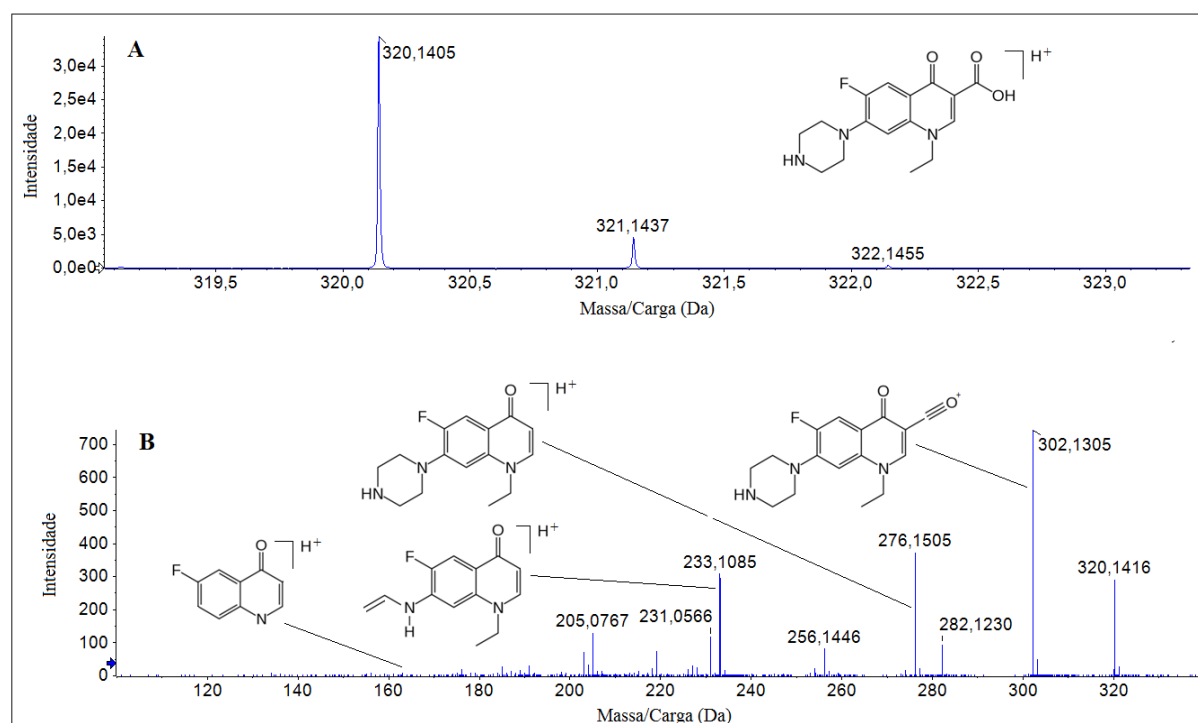


Figura 63 – Espectro de massas em MS do NFX(A) - espectro MS/MS do NFX (B).

Na Figura 63-A, tem-se o espectro MS do norfloxacin protonado. O pico referente ao  $m/z$  de 321,1437 Da é oriundo da distribuição isotópica natural dos elementos e se refere à molécula do NFX protonada e com um átomo  $^{13}\text{C}$  em sua composição (que equivale ao íon [ $^{12}\text{C}_{15} \text{ }^{13}\text{C} \text{ }^1\text{H}_{19} \text{ }^{14}\text{N}_3 \text{ }^{16}\text{O}_3 \text{ }^{19}\text{F}$ ]<sup>+</sup>). O pico referente ao  $m/z$  322,1455 Da se relaciona com picos de baixa intensidade que estão praticamente sobrepostos e tem como principais contribuições íons originados de moléculas com dois átomos de  $^{13}\text{C}$ , íons originados de moléculas com um átomo de  $^{18}\text{O}$ , íons de moléculas com um  $^2\text{H}$  e um  $^{15}\text{N}$ , íons com um  $^{13}\text{C}$  e um  $^2\text{H}$  e íons com

um  $^{13}\text{C}$  e um  $^{17}\text{O}$ . Em “B” temos o espectro MS/MS do NFX com a sugestão de estrutura de alguns dos principais fragmentos.

Dentre os diversos potenciais produtos de transformação/degradação que foram encontrados na fotólise do norfloxacin, quinze tiveram estruturas sugeridas. A Figura 64 apresenta dois cromatogramas sobrepostos de duas amostras de norfloxacin: uma antes do início do processo de fotólise ( $t=0$ ) e a outra, no tempo de fotólise de 240 minutos.

O Quadro 30 apresenta as fórmulas dos fragmentos CID, valores de massa exata dos íons, erros experimentais de massa e valores de RDBE tanto para o NFX quanto para o os seus produtos de transformação gerados através da fotólise direta.

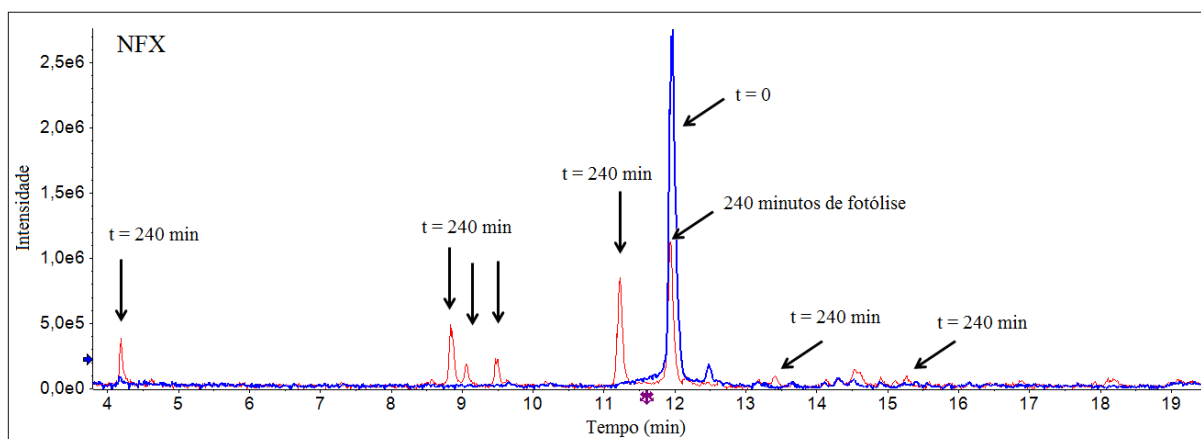
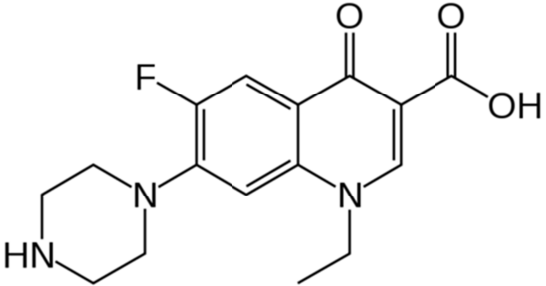
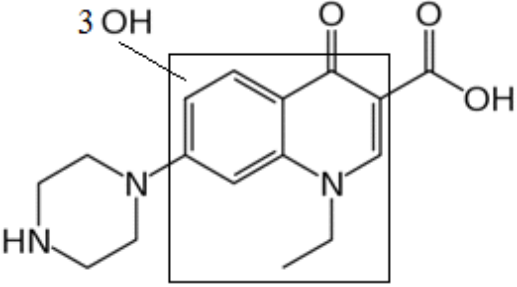
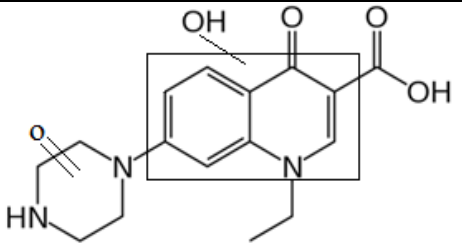
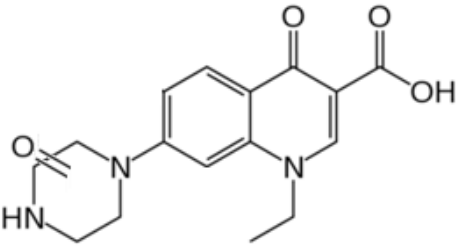
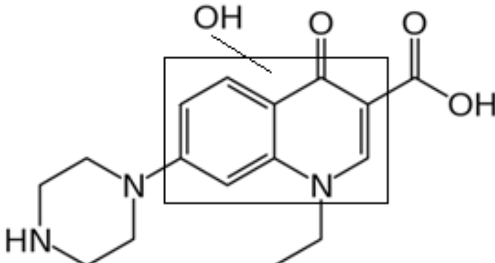


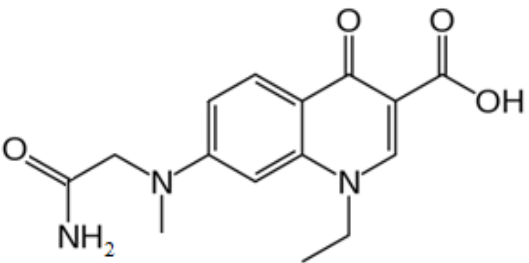
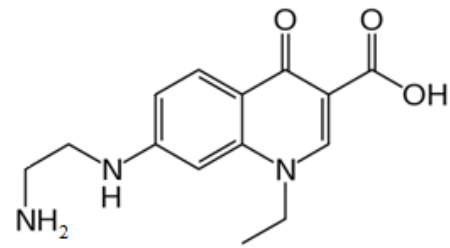
Figura 64 – Cromatogramas sobrepostos das amostras de norfloxacin nos tempos de zero e 240 minutos de fotólise.

Podemos observar que após 240 minutos de fotólise a área do pico referente ao NFX (11,95 min) ainda está intenso, o que demonstra uma considerável resistência da substância a esse processo de degradação.

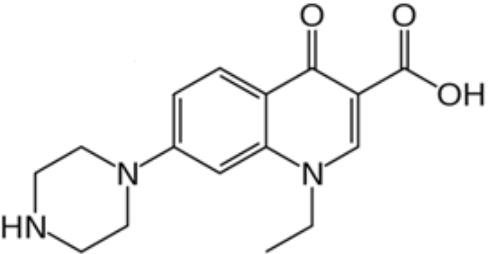
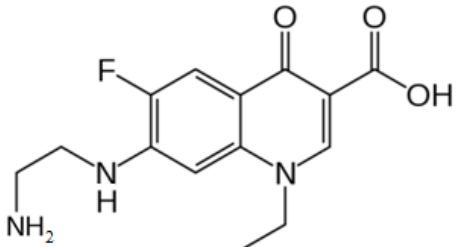
Quadro 30 – Dados de massa exata determinados por LC-QTOF-MS/MS do norfloxacino (NFX) e seus prováveis produtos de transformação gerados por fotólise, juntamente com as fragmentações identificadas.

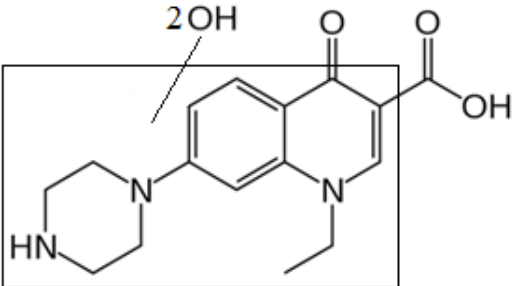
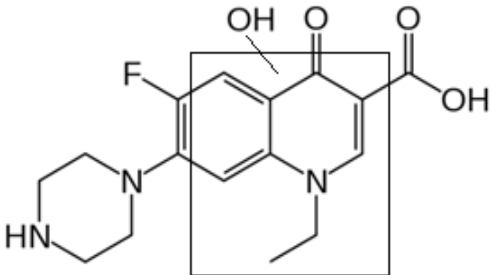
Estrutura	t <sub>R</sub> (min)	Fórmula (Íon) [M+H] <sup>+</sup>	Massa Experimental	Massa Calculada	Erro (ppm)	RDBE	
<b>NFX</b>	11,95	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> F	320,1405	320,14050	0,0	9,0	
		C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> F	302,1308	302,1299	3,0	10,0	
		C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	282,1232	282,1237	-1,8	11,0	
		C <sub>15</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> OF	276,1512	276,1507	1,8	8,0	
		C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> N <sub>3</sub> O	256,1436	256,1444	-3,1	9,0	
		C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	254,0921	254,0924	-1,2	11	
		C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> OF	233,1083	233,1085	-0,9	8,0	
		C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> F	231,0556	231,0564	-3,5	10	
		C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> N <sub>3</sub> O	228,1126	228,1131	-2,2	9,0	
		C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> OF	219,0923	219,0928	-2,3	8,0	
		C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> OF	205,0765	205,0772	-3,4	8,0	
		C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> F	189,0820	189,0823	-1,6	8,0	
		C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> N <sub>2</sub> F	176,0736	176,0744	-4,5	7,5	
		C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> NOF	164,0495	164,0506	-6,7	7,0	
	<b>TP1</b>	4,2	C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	350,1346	350,1347	-0,3	9,0
		C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	332,1242	332,1241	0,3	10	
		C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	314,1141	314,1135	1,9	11	
		C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	304,1281	304,1292	-3,6	9	
		C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	286,1185	286,1186	-0,4	10	
		C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>6</sub>	264,0503	264,0503	0,0	9	
		C <sub>12</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>5</sub>	248,0545	248,0554	-3,6	9	
		C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>5</sub>	246,0393	246,0397	-1,6	10	
		C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>4</sub>	230,0440	230,0448	-3,5	10	
		C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>4</sub>	220,0603	220,0604	-0,5	8	
		C <sub>11</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>3</sub>	202,0493	202,0499	-3,0	9	
		C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>2</sub>	176,0702	176,0706	-2,3	7	
		C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> NO	148,0738	148,0757	-12,8	6	
	<b>TP2</b>	4,2	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	332,1232	332,1241	-3,3	10

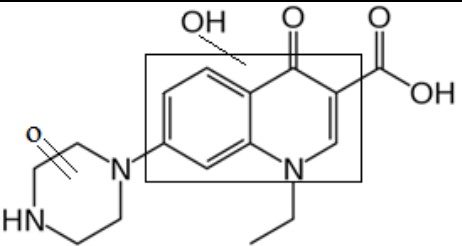
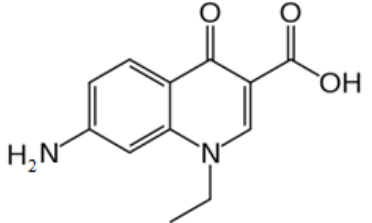
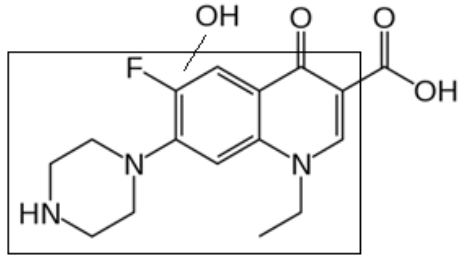
		$C_{16}H_{16}N_3O_4$	314,1130	314,1135	-1,6	11	
		$C_{15}H_{16}N_3O_3$	286,1173	286,1186	-4,5	10	
		$C_{14}H_{16}N_3O_2$	258,1262	258,1237	9,7	9,0	
		$C_{13}H_{11}N_2O_3$	243,0768	243,0764	1,6	10	
		$C_{11}H_{11}N_2O_3$	219,0781	219,0764	7,8	8	
		$C_9H_{11}N_2O$	163,0862	163,0866	-2,5	6	
<b>TP3</b>	4,6	$C_{16}H_{18}N_3O_4$	316,1283	316,1292	-2,8	10	
		$C_{15}H_{18}N_3O_3$	288,1339	288,1343	-1,4	9	
		$C_{15}H_{16}N_3O_2$	270,1226	270,1237	-4,1	10	
		$C_{14}H_{18}N_3O_2$	260,1380	260,1394	-5,4	8	
		$C_{13}H_{13}N_2O_3$	245,0917	245,0921	-1,6	9	
		$C_{14}H_{15}N_2O_2$	243,1112	243,1128	-6,2	9	
		$C_{12}H_{12}NO_3$	218,0806	218,0812	-2,8	8	
		$C_{11}H_9N_2O_2$	201,0658	201,0659	-0,5	9	
		$C_{10}H_8NO_3$	190,0501	190,0499	1,1	8	
		$C_{10}H_9N_2O_2$	189,0649	189,0659	-5,3	8	
	<b>TP4</b>	8,8	$C_{16}H_{20}N_3O_4$	318,1448	318,1448	0,0	9,0
		$C_{16}H_{18}N_3O_3$	300,1350	300,1343	2,3	10	
		$C_{15}H_{20}N_3O_2$	274,1556	274,1550	2,2	8	
		$C_{14}H_{13}N_2O_3$	257,0914	257,0921	-2,7	10	
		$C_{13}H_{11}N_2O_3$	243,0751	243,0764	-5,3	10	
		$C_{13}H_{15}N_2O_2$	231,1122	231,1128	-2,6	8	
		$C_{12}H_{11}N_2O_3$	231,0760	231,0764	-1,7	9	
		$C_{11}H_{13}N_2O_2$	205,0968	205,0972	-2,0	7	
		$C_{11}H_{12}NO_2$	190,0861	190,0863	-1,1	7	
		$C_{11}H_{10}NO_2$	188,0699	188,0706	-3,7	8	
		$C_9H_9N_2O_2$	177,0655	177,0659	-2,3	7	
		$C_9H_6NO_2$	160,0387	160,0393	-3,7	8	
	<b>TP5</b>	9,05	$C_{15}H_{18}N_3O_4$	304,1291	304,1292	-0,3	9
			$C_{15}H_{15}N_2O_4$	287,1022	287,1026	-1,4	10

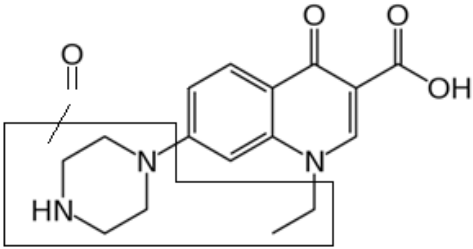
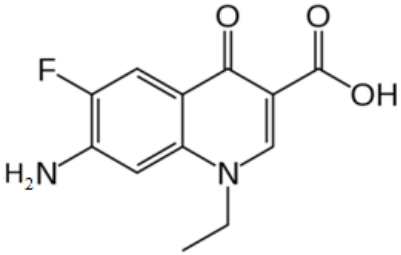
		$C_{15}H_{16}N_3O_3$	286,1186	286,1186	0,0	10
		$C_{15}H_{14}N_3O_2$	268,1069	268,1081	-4,5	11
		$C_{14}H_{16}N_3O_2$	258,1230	258,1237	-2,7	9
		$C_{14}H_{15}N_2O_2$	243,1122	243,1128	-2,5	9
		$C_{13}H_{10}N_3O_2$	240,0757	240,0768	-4,6	11
		$C_{13}H_{15}N_2O$	215,1172	215,1179	-3,3	8
		$C_{12}H_9N_2O_2$	213,0650	213,0659	-4,2	10
		$C_{11}H_7N_2O_2$	199,0485	199,0502	-8,5	10
		$C_{11}H_{11}N_2O$	187,0858	187,0866	-4,3	8
		$C_{10}H_9N_2$	157,0756	157,0760	-2,7	8
		$C_9H_9N_2$	145,0761	145,0760	0,7	7
		$C_9H_8N$	130,0671	130,0651	15,4	7
<b>TP6</b>	9,5	$C_{14}H_{18}N_3O_3$	276,1342	276,1343	-0,4	8
		$C_{14}H_{16}N_3O_2$	258,1237	258,1237	0,0	9
		$C_{14}H_{13}N_2O_2$	241,0976	241,0972	1,7	10
		$C_{11}H_7N_2O_2$	199,0496	199,0502	-3,0	10
		$C_{11}H_{12}N_2$	172,0987	172,0995	-4,6	7,5
<b>TP7</b>	10,15	$C_{16}H_{20}N_3O_3$	302,1490	302,1499	-2,0	9
		$C_{16}H_{18}N_3O_2$	284,1395	284,1394	0,4	10
		$C_{15}H_{20}N_3O$	258,1599	258,1601	-0,8	8
		$C_{14}H_{14}N_3O_2$	256,1073	256,1081	-3,1	10



		$C_{15}H_{18}N_3$	240,1499	240,1495	1,7	9
		$C_{14}H_{18}N_3$	228,1494	228,1495	-0,4	8
		$C_{12}H_9N_2O_2$	213,0655	213,0659	-1,9	10
		$C_{12}H_{13}N_2O$	201,1020	201,1022	-1,0	8
		$C_{11}H_{11}N_2O$	187,0859	187,0866	-3,7	8
		$C_{11}H_{11}N_2$	171,0924	171,0917	4,1	8
		$C_9H_9N_2$	145,0761	145,0760	0,7	7
<b>TP8</b>	10,7	$C_{14}H_{17}N_3O_3F$	294,1244	294,1249	-1,7	8
		$C_{14}H_{15}N_3O_2F$	276,1140	276,1143	-1,1	9
		$C_{14}H_{14}N_3O_2$	256,1074	256,1081	-2,7	10
		$C_{12}H_{10}N_2O_2F$	233,0727	233,0721	2,6	9
		$C_{12}H_9N_3O_2$	227,0694	227,0689	2,2	10,5
		$C_{12}H_{14}N_3$	200,1169	200,1182	-6,5	8
		$C_{11}H_{11}N_2F$	190,0904	190,0901	1,6	7,5
		$C_{11}H_{10}N_3$	184,0872	184,0869	1,6	9
		$C_9H_8N_2F$	163,0647	163,0666	-11,7	7
<b>TP9</b>	11,2	$C_{16}H_{20}N_3O_5$	334,1404	334,1398	1,8	9
		$C_{16}H_{18}N_3O_4$	316,1306	316,1292	4,4	10
		$C_{15}H_{18}N_3O_3$	288,1336	288,1343	-2,4	9
		$C_{14}H_{13}N_3O_4$	287,0904	287,0901	1,0	10,5
		$C_{12}H_{11}N_2O_4$	247,0707	247,0713	-2,4	9
		$C_{13}H_{13}N_2O_3$	245,0915	245,0921	-2,4	9
		$C_{12}H_9N_2O_4$	245,0556	245,0557	-0,4	10

		$C_{12}H_{11}N_2O_3$	231,0756	231,0764	-3,5	9
		$C_{11}H_7N_2O_4$	231,0404	231,0400	1,7	10
		$C_{11}H_{11}N_2O_3$	219,0758	219,0764	-2,7	8
		$C_{11}H_9N_2O_3$	217,0602	217,0608	-2,8	9
		$C_{11}H_8NO_3$	202,0487	202,0490	-1,5	9
		$C_{11}H_{13}N_2O$	189,1012	189,1022	-5,3	7
		$C_{10}H_{10}NO_2$	176,0703	176,0706	-1,7	7
		$C_9H_{11}N_2O$	163,0858	163,0866	-4,9	6
<b>TP10</b>	12,15	$C_{16}H_{19}N_3O_4F$	336,1350	336,1354	-1,2	9
		$C_{16}H_{17}N_3O_3F$	318,1249	318,1249	0,0	10
		$C_{16}H_{16}N_3O_3$	298,1164	298,1186	-7,4	11
		$C_{15}H_{19}N_3O_2F$	292,1451	292,1456	-1,7	8
		$C_{14}H_{12}N_2O_3F$	275,0830	275,0827	1,1	10
		$C_{13}H_{15}N_2O_4$	263,1041	263,1026	5,7	8
		$C_{12}H_8N_2O_3F$	247,0500	247,0514	-5,7	10
		$C_{11}H_{10}NO_4$	220,0626	220,0604	10,0	8
		$C_{10}H_6N_2O_2F$	205,0393	205,0408	-7,3	9
		$C_9H_6N_2O_2F$	193,0405	193,0408	-1,6	8
		$C_9H_7NO_2F$	180,0437	180,0455	-10,0	7
		$C_9H_6NO_2F$	179,0376	179,0377	-0,6	7,5
<b>TP11</b>	13,4	$C_{16}H_{18}N_3O_5$	332,1238	332,12410	-0,9	10
		$C_{16}H_{16}N_3O_4$	314,1137	314,1135	0,6	11
		$C_{16}H_{14}N_3O_3$	296,1055	296,1030	8,4	12

		$C_{15}H_{16}N_3O_3$	286,1184	286,1186	-0,7	10
		$C_{14}H_{10}N_3O_3$	268,0701	268,0717	-6,0	12
		$C_{14}H_{16}N_3O_2$	258,1221	258,1237	-6,2	9
		$C_{13}H_{12}N_3O_3$	258,0861	258,0873	-4,6	10
		$C_{13}H_{11}N_2O_3$	243,0759	243,0764	-2,1	10
		$C_{12}H_{10}NO_3$	216,0645	216,0655	-4,6	9
		$C_{10}H_7N_2O_2$	187,0493	187,0502	-4,8	9
<b>TP12</b>	15,25	$C_{12}H_{13}N_2O_3$	233,0923	233,0921	0,9	8
		$C_{12}H_{11}N_2O_2$	215,0823	215,0815	3,7	9
		$C_{10}H_7N_2O_2$	187,0495	187,0502	-3,7	9
		$C_{10}H_{11}N_2$	159,0935	159,0917	11,3	7
		$C_8H_7N_2$	131,0602	131,0604	-1,5	7
		$C_7H_6N$	104,0500	104,0495	4,8	6
<b>TP13</b>	15,8	$C_{16}H_{19}N_3O_4F$	336,1348	336,1354	-1,8	9
		$C_{16}H_{17}N_3O_3F$	318,1247	318,1249	-0,6	10
		$C_{16}H_{15}N_3O_2F$	300,1148	300,1143	1,7	11
		$C_{15}H_{18}N_3OF$	275,1436	275,1428	2,9	8,5
		$C_{15}H_{16}N_3OF$	273,1266	273,1272	-2,2	9,5
		$C_{14}H_{16}N_3F$	245,1320	245,1323	-1,2	8,5
		$C_{13}H_{14}N_2OF$	233,1091	233,1085	2,6	8
		$C_{13}H_{13}N_3F$	230,1102	230,1088	6,1	9
		$C_{11}H_6N_2O_2F$	217,0391	217,0408	-7,8	10
	<b>TP14</b>	16,8	$C_{16}H_{18}N_3O_4$	316,1298	316,1292	1,9
		$C_{16}H_{16}N_3O_3$	298,1200	298,1186	4,7	11
		$C_{15}H_{16}N_3O_2$	270,1251	270,1237	5,2	10
		$C_{14}H_{13}N_2O_2$	241,0976	241,0972	1,7	10
		$C_{13}H_{11}N_2O_2$	227,0822	227,0815	3,1	10

		$C_{11}H_7N_2O_2$	199,0500	199,0502	-1,0	10
		$C_{11}H_{12}N_2$	172,0999	172,0995	2,3	7,5
		$C_{10}H_9N_2$	157,0771	157,0760	7,0	8
<b>TP15</b>	17,9	$C_{12}H_{12}N_2O_3F$	251,0829	251,0827	0,8	8
		$C_{12}H_{10}N_2O_2F$	233,0734	233,0721	5,6	9
		$C_{10}H_6N_2O_2F$	205,0409	205,0408	0,5	9
		$C_9H_6N_2OF$	177,0466	177,0459	4	8
		$C_8H_6N_2F$	149,0518	149,0510	5,4	7
		$C_7H_5NF$	122,0409	122,0401	6,6	6

O TP1 obtido pela fotólise do norfloxacinó é similar ao TP1 originado na fotólise do ciprofloxacino. Esse produto de transformação é originado a partir da perda do átomo de flúor da molécula do NFX, com a adição de três hidroxilas. Cabe ressaltar que apesar das várias possibilidades de posições para as três novas hidroxilas, o cromatograma apresenta um único pico para o íon com  $m/z$  350,1347 Da, o que indica que, ou bem está ocorrendo coeluição dos isômeros formados, o que é improvável, ou bem há apenas um único composto formado com esse  $m/z$ . A Figura 65 apresenta o espectro de fragmentação do TP1.

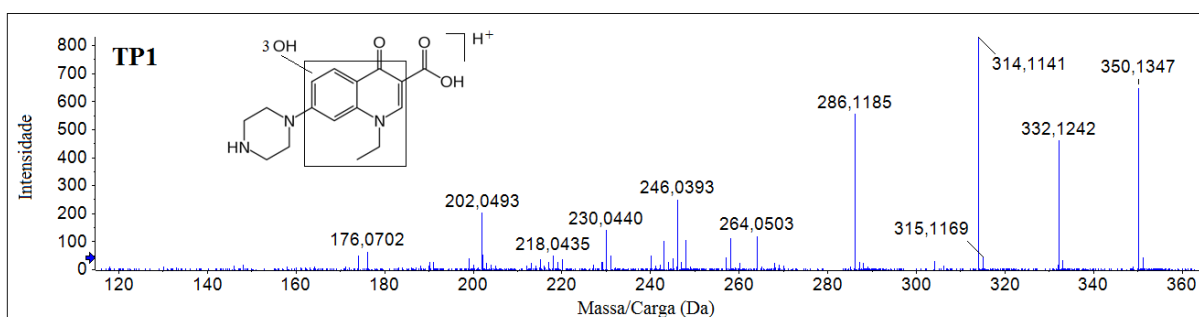


Figura 65 – Espectro em modo MS/MS do TP1.

O pico com  $m/z$  264,0503 Da é relativo ao íon  $C_{12}H_{10}NO_6$  e se refere à perda do anel piperazina, o que indica que todos oxigênios estão nas posições indicadas na Figura 65. Apesar do rico espectro de fragmentação do TP1, não há picos que permitam identificar a localização precisa das hidroxilas adicionais.

Dois produtos de transformação com  $m/z$  332,1232 Da foram encontrados. O primeiro com  $t_R$  de 4,2 minutos (TP2) e o segundo com  $t_R$  de 13,4 minutos (TP11). A fórmula molecular do íon  $[M+H]^+$  é  $C_{16}H_{18}N_3O_5$  e os espectros MS/MS desses dois TPs são apresentados na Figura 66.

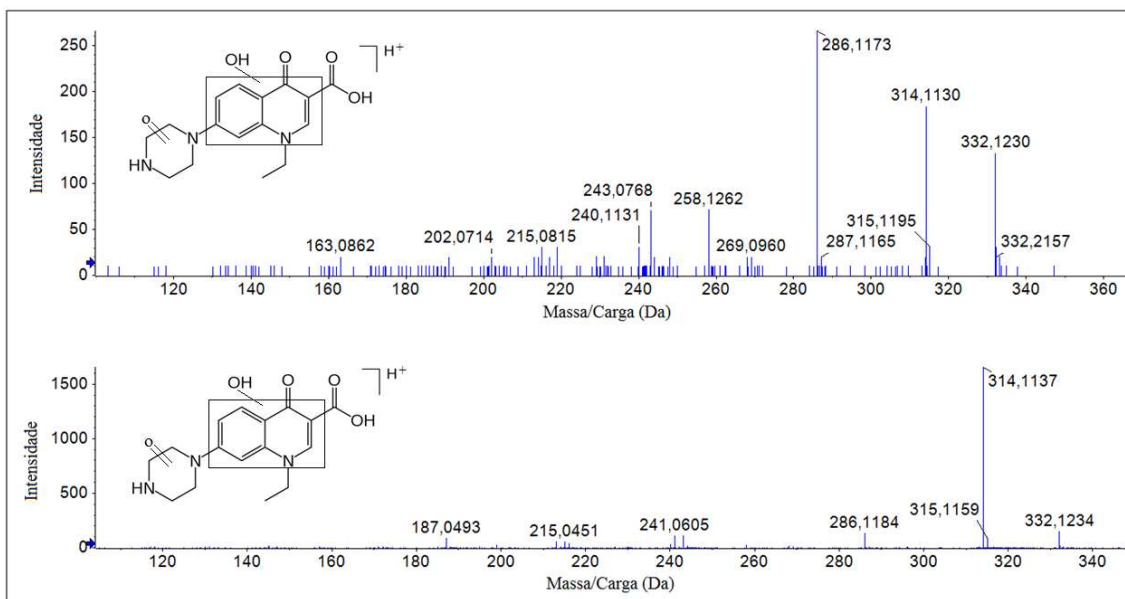


Figura 66 – Espectro em modo MS/MS do TP2 e TP11.

Os TP2 e TP11 apresentam um RDBE igual a 10, o que indica o aumento de uma instauração em relação ao NFX. Além disso, apresentam duas perdas distintas de CO com picos intensos que não estão presentes no espectro relativo ao NFX. Uma delas possivelmente é originada da carboxila após a perda de água. A segunda perda indica que houve a formação de uma nova carbonila, provavelmente no anel da piperazina. Poderia ainda ocorrer a formação de duas carbonilas juntamente com a abertura do anel da piperazina, mas não há dados suficientes para suportar ou refutar essa hipótese. Através da análise dos espectros de fragmentação não foi possível determinar as posições da hidroxila e carbonila no TP2 e no TP11.

Dois TPs (TP3 e TP14) apresentaram massa de 316,1292 DA e RDBE igual a 10, que correspondem a dois isômeros com íons de fórmula  $C_{16}H_{18}N_3O_4$ . A Figura 67 apresenta o espectro MS/MS dos dois compostos.

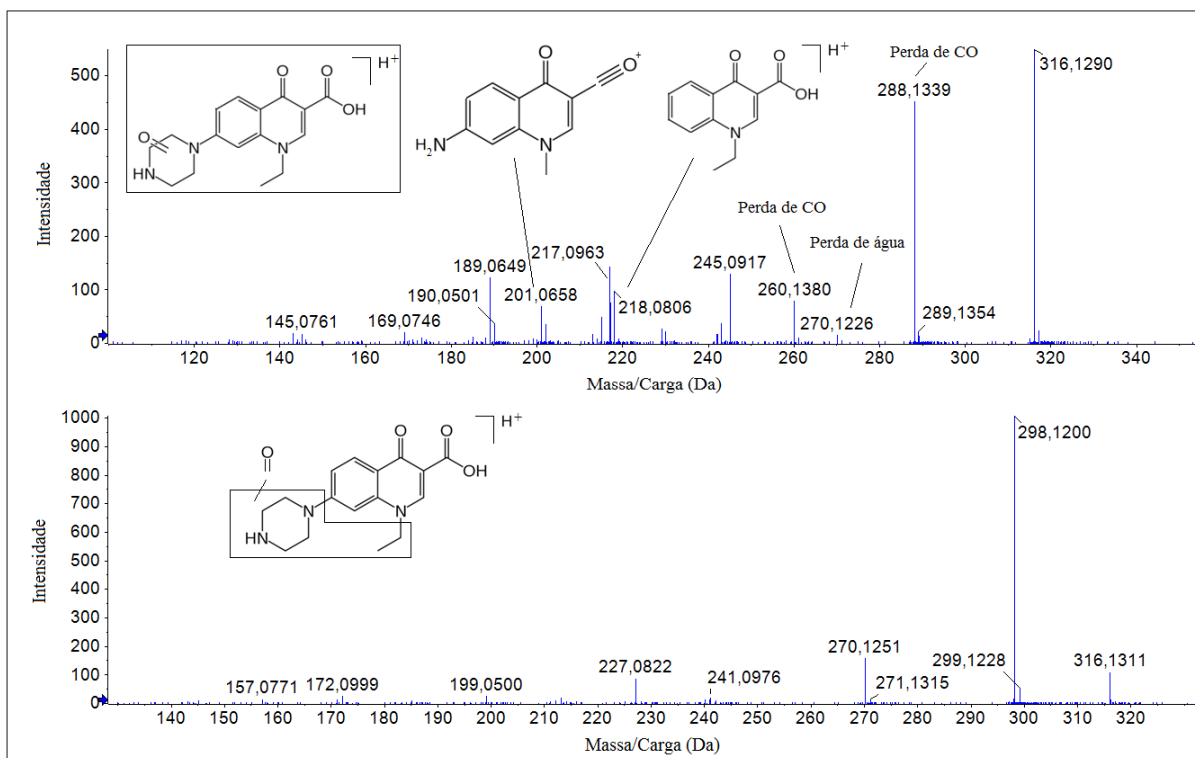


Figura 67 – Espectro MS/MS do TP3 e TP14.

Em relação ao NFX, o TP3 e TP14 apresentam um oxigênio adicional e um átomo de hidrogênio a menos, além da perda do átomo de flúor. O aumento do valor de RDBE em uma unidade indica a formação de uma nova instauração. As duas perdas de CO no TP3 indicam que essa nova instauração está presente na forma de carbonila, pois o espectro de massas do NFX indica apenas uma perda de CO. Em relação à posição da nova carbonila no TP3, dois diferentes locais são possíveis: no anel piperazina ou na etila ligada ao nitrogênio. A presença do fragmento MS/MS com  $m/z$  218 Da indica que a nova carbonila está localizada no anel piperazina, conforme pode ser observado na estrutura sugerida para esse fragmento na Figura 67. Em relação ao TP14, o composto não apresenta fragmentos que permitam concluir a localização da carbonila adicional. O fato do espectro MS/MS apresentar apenas uma perda de “CO” indica que a carbonila pode estar localizada na etila, no carbono ligado diretamente ao nitrogênio.

O TP4 apresenta uma massa experimental para o íon  $[M+H]^+$  de 318,1448 Da e fórmula  $C_{16}H_{20}N_3O_4$ . Em relação ao NFX, o TP4 apresenta um oxigênio e um hidrogênio adicional e não está presente o átomo de flúor. O valor de RDBE permaneceu com o valor igual a nove, o que indica que não houve alteração na

instauração da molécula, ou seja, o oxigênio adicional possivelmente está presente na forma de hidroxila. O espectro MS/MS do TP4 consta na Figura 68.

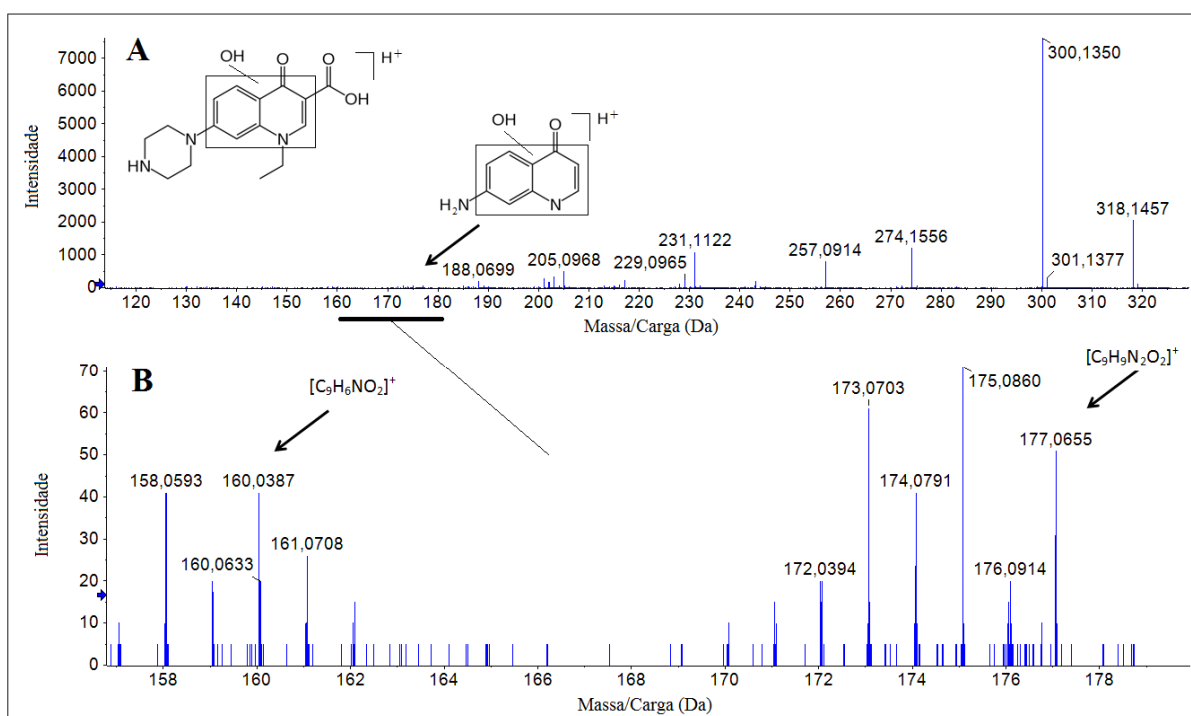


Figura 68 – Espectro MS/MS do TP4 (A), ampliado na região de  $m/z$  160 a 180 Da (B).

A presença dos fragmentos com  $m/z$  177 e 160 indicam que o oxigênio adicional está localizado em alguma posição dos anéis condensados da molécula. Na Figura 68 – A, é apresentada a estrutura do fragmento com  $m/z$  177,0655 (RDBE = 7, íon  $[C_9H_9N_2O_2]^+$ ). A Figura 68-B apresenta o espectro MS/MS do TP4 ampliado na região entre 160 e 180 Da, onde estão indicados os picos que permitem concluir que a hidroxila não está localizada no anel piperazina e nem na etila ligada ao nitrogênio.

O produto de transformação com tempo de retenção de 9,05 minutos foi identificado como TP5. Sua massa experimental é de 304,1291Da e o íon possui fórmula de  $C_{15}H_{18}N_3O_4$ . A Figura 69 apresenta o seu espectro MS/MS.



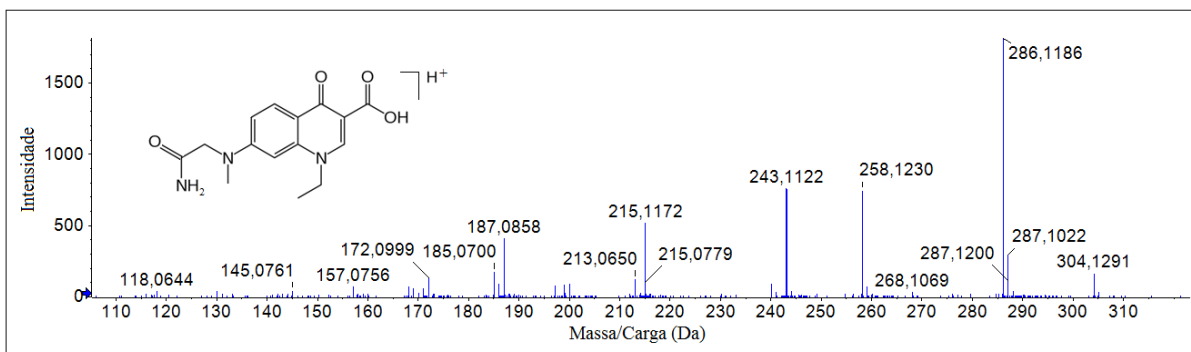


Figura 69 – Espectro em modo MS/MS do TP5.

O fragmento com  $m/z$  287,1022 se refere à perda neutra de amônia, o que indica que o anel de piperazina sofreu abertura, dando origem a uma amina primária. Como o RDBE é o mesmo do NFX, o oxigênio extra foi adicionado ao anel piperazina na forma de uma carbonila. O fragmento com  $m/z$  215 Da se refere à perda de CO a partir do íon com  $m/z$  243, o que indica que a carbonila está localizada no anel de piperazina.

O TP6 e o TP8 possuem uma estrutura muito similar. O átomo de flúor presente no TP8 é substituído por um hidrogênio no TP6. A fórmula do íon  $[M+H]^+$ , correspondente ao TP6, é  $C_{14}H_{18}N_3O_3$  e a sua massa experimental é 276,1342 Da. O TP8 apresenta o íon  $[M+H]^+$  com fórmula  $C_{14}H_{17}N_3O_3F$  e  $m/z$  294,1244 Da. O valor de RDBE igual a oito em ambos TPs indica a diminuição de uma instauração em relação ao NFX. A diminuição de dois carbonos em relação ao composto original e o pico no espectro MS/MS do TP6 com  $m/z$  de 241,0976 ( $C_{14}H_{13}N_2O_2$ ), que se refere à perda de amônia a partir do pico 258,1237 Da, indica que o composto possui uma amina primária, o que sugere que a perda dos carbonos ocorreu na piperazina. O espectro do TP8 apresenta o pico 233,0727 Da, referente à perda de  $C_2H_5N$ , que corresponde aos dois carbonos e um nitrogênio originalmente pertencentes à piperazina.

Os dados obtidos para o composto TP7 indicam que o mesmo se trata do norfloxacino que sofreu a substituição do átomo de flúor por um átomo de hidrogênio. A massa encontrada foi 302,1490 Da, que corresponde à fórmula  $C_{16}H_{20}N_3O_3$  para o íon  $[M+H]^+$ .

O produto de transformação com  $t_R$  de 11,2 minutos tem massa igual a 334,1398 Da. Esse composto corresponde ao TP9. A fórmula do seu íon  $[M+H]^+$  é  $C_{16}H_{20}N_3O_5$  e o valor de RDBE é igual a nove. O composto se refere ao NFX abstraído do átomo de flúor e acrescido de dois oxigênios na forma de hidroxila. Os dados do espectro em modo MS/MS não permitiram inferir posições preferenciais para a posição dessas duas hidroxilas.

Sete diferentes TP's foram identificados com massa do íon 336,1354, conforme apresentado na Figura 70. Os íons desses compostos possuem fórmula  $C_{16}H_{19}N_3O_4F$  e correspondem ao NFX hidroxilado.

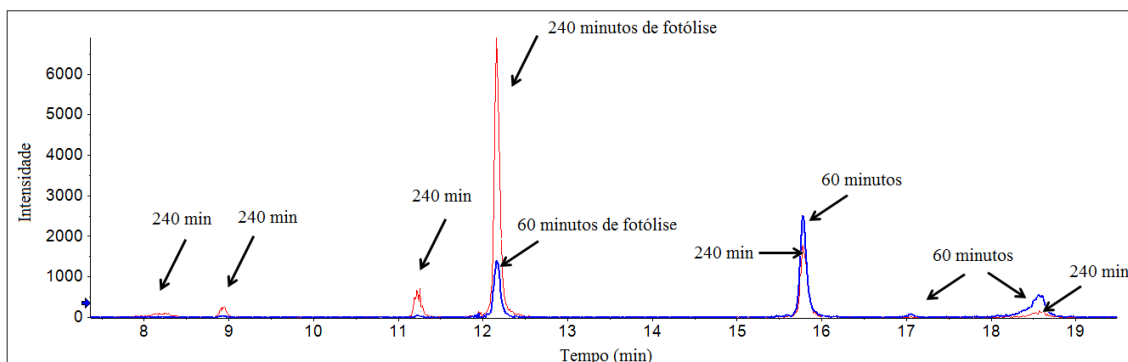


Figura 70 – Cromatograma do íon extraído para o m/z de 336,1354 Da.

Dos sete compostos, apenas os dois mais abundantes foram analisados, o TP10 e TP13. Os espectros de massa em modo MS/MS para esses dois compostos estão apresentados na Figura 71.

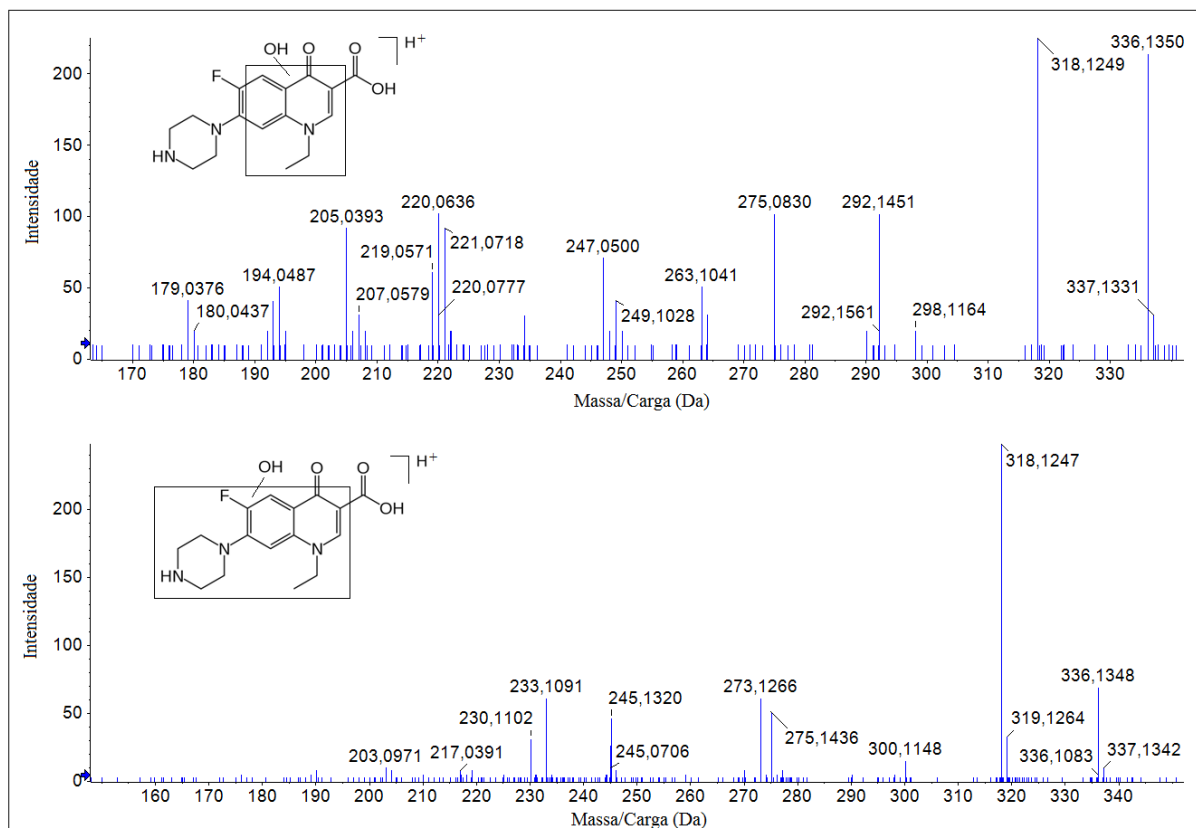


Figura 71 – Espectro em modo MS/MS do TP10 (quadro superior) e TP13 (quadro inferior).

O TP10 apresenta o fragmento com  $m/z$  de 220,06260 Da, que corresponde ao íon  $[M+H]^+$  com fórmula  $C_{11}H_{10}NO_4$ , que corresponde à perda da piperazina, o que indica que a hidroxila não está localizada nesse anel. Os fragmentos apresentados pelo TP13 não permitem inferir a posição mais provável da hidroxila.

O TP12 ( $C_{12}H_{13}N_2O_3$ ) e TP15 ( $C_{12}H_{12}N_2O_3F$ ) apresentam estrutura bastante similar e se diferem apenas pela substituição do átomo de flúor no TP15 por um átomo de hidrogênio no TP12. O espectro em modo MS/MS do TP12 está apresentado na Figura 72.

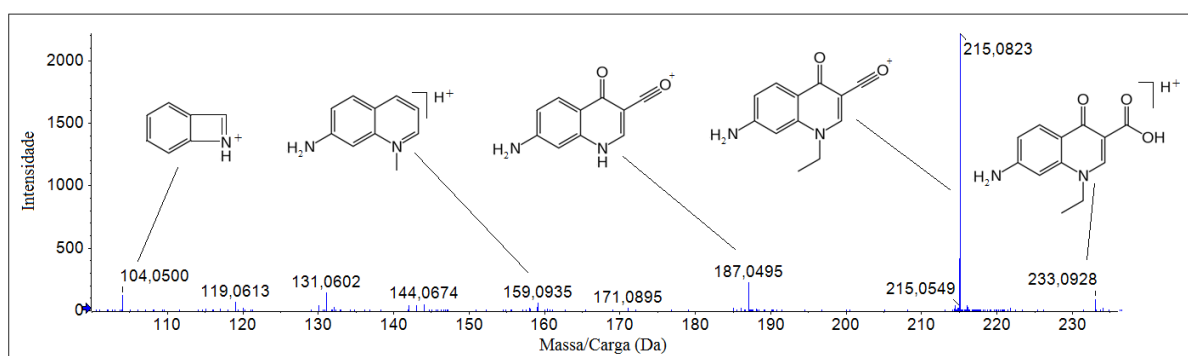


Figura 72 – Espectro de fragmentação em modo MS/MS do TP12.

Os picos mais intensos referentes ao TP12 e TP15 se referem à perda neutra de uma molécula de água. A interpretação do espectro MS/MS do TP15 é muito parecida a do TP12. Como podemos observar na Figura 72, o espectro obtido em modo MS/MS do TP12 é relativamente simples, haja vista que se refere a uma molécula com uma quantidade de átomos menor do que a dos demais TPs.

Inúmeros outros potenciais produtos de transformação foram detectados, porém estavam presentes em concentração menores e não foram investigados neste trabalho.

#### 4.7 Uso da Espectrometria de Massa no Estudo da Amoxicilina

As análises da amoxicilina (AMX) foram conduzidas conforme descrito no capítulo 3. Foi realizado um estudo da transferência da amoxicilina para o leite bovino. Além disso, foi avaliado se a técnica de preparo de amostra empregada na quantificação da AMX também pode ser aplicada para amostras utilizadas na identificação dos principais metabólitos da amoxicilina que seriam transferidos ao leite.

A amoxicilina apresenta comportamento peculiar, possivelmente relacionado à sua instabilidade. A quantificação da AMX apresenta várias dificuldades. Esse tipo de análise normalmente é realizado por LC-MS/MS com o emprego do modo MRM. A identificação da AMX em amostras de produtos de origem animal tem apresentado pouco êxito quando a análise é conduzida em modo *product ion*. Contudo, a identificação de metabólitos da AMX que são transferidos para o leite é relevante do ponto de vista da saúde pública. A estratégia de quantificação da AMX em leite por espectrometria de massas em modo MRM que foi realizada neste trabalho foi considerada factível. Os resultados obtidos não foram satisfatórios para a etapa de identificação dos metabólitos da amoxicilina presentes no leite, mas indicam caminhos para estudos futuros que tenham esse objetivo. A seguir são apresentados e discutidos os resultados obtidos para a amoxicilina.

#### 4.7.1 Amoxicilina em Meio Aquoso

Na determinação do padrão de fragmentação da AMX utilizou-se solução aquosa de amoxicilina na concentração de 10 mg L<sup>-1</sup>. A Figura 73, em seu quadro superior, apresenta o pico cromatográfico que, teoricamente, deve corresponder apenas à amoxicilina. No quadro inferior são apresentados os íons presentes na região em destaque do pico cromatográfico.

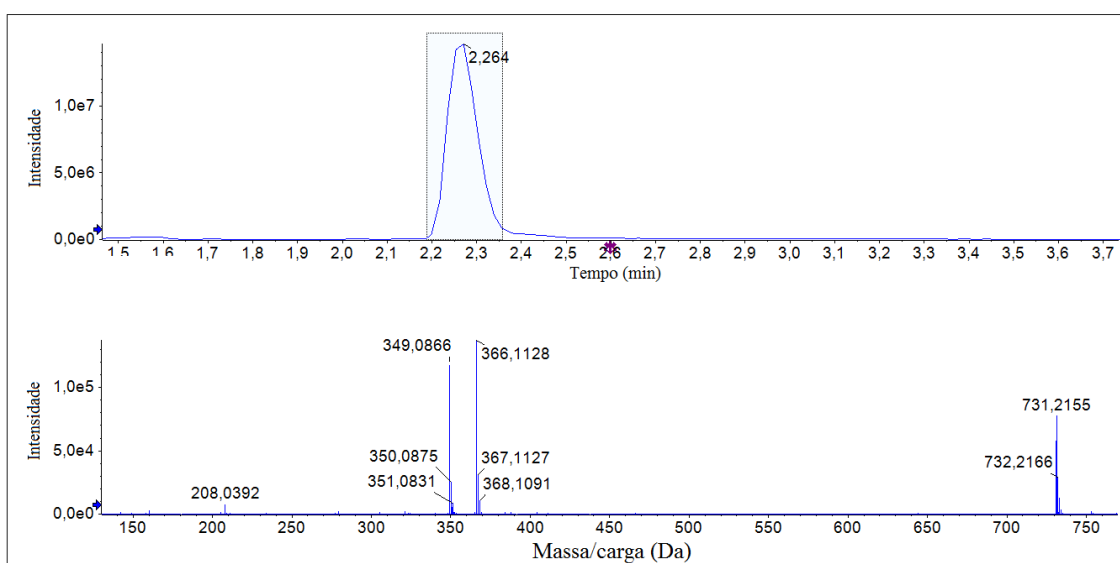


Figura 73 – Cromatograma expandido da amoxicilina em meio aquoso (quadro superior) e espectro de massa (MS) acumulados da região do pico cromatográfico que aparece em destaque (quadro inferior).

O pico com  $m/z$  366,1128 Da corresponde à AMX. O espectro MS ampliado na região de 366 Da e o espectro MS/MS obtido para a amoxicilina são apresentados na Figura 74.

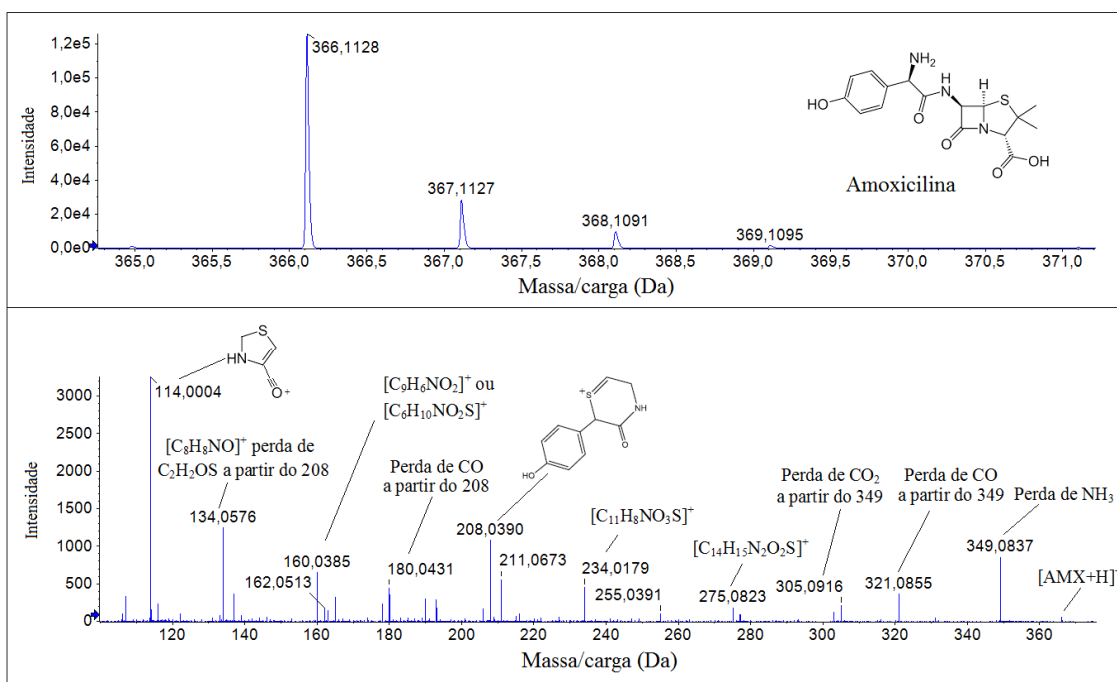


Figura 74 – Espectro em modo MS (quadro superior) e MS/MS da amoxicilina (quadro inferior).

A presença do anel  $\beta$ -lactâmico e de inúmeros grupos funcionais dificultam a interpretação do espectro de fragmentação da AMX, pois podem ocorrer diversos rearranjos durante o processo de fragmentação em CID. A utilização de equipamentos que permitam análise  $MS^3$  poderia facilitar a tarefa de determinação da estrutura de muitos dos fragmentos gerados na análise em modo MS/MS.

Além do pico referente à amoxicilina, podemos observar no quadro inferior da Figura 73 outros dois picos principais: o primeiro com  $m/z$  349,0866 Da e o segundo com  $m/z$  731,2155 Da. O pico com  $m/z$  349,0866 Da corresponde ao íon  $[C_{16}H_{17}N_2O_5S]^+$  e deve se formar a partir da perda de uma molécula de amônia pela amoxicilina. O Pico 731,2155 Da corresponde à espécie  $[C_{32}H_{39}N_6O_{10}S_2]^+$ . O íon é

formado pela protonação do composto constituído por duas moléculas de amoxicilina unidas, possivelmente através da interação entre os grupos ácido carboxílico das moléculas, formando um dímero. As Figuras 75 e 76 apresentam os espectros MS/MS desses dois compostos.

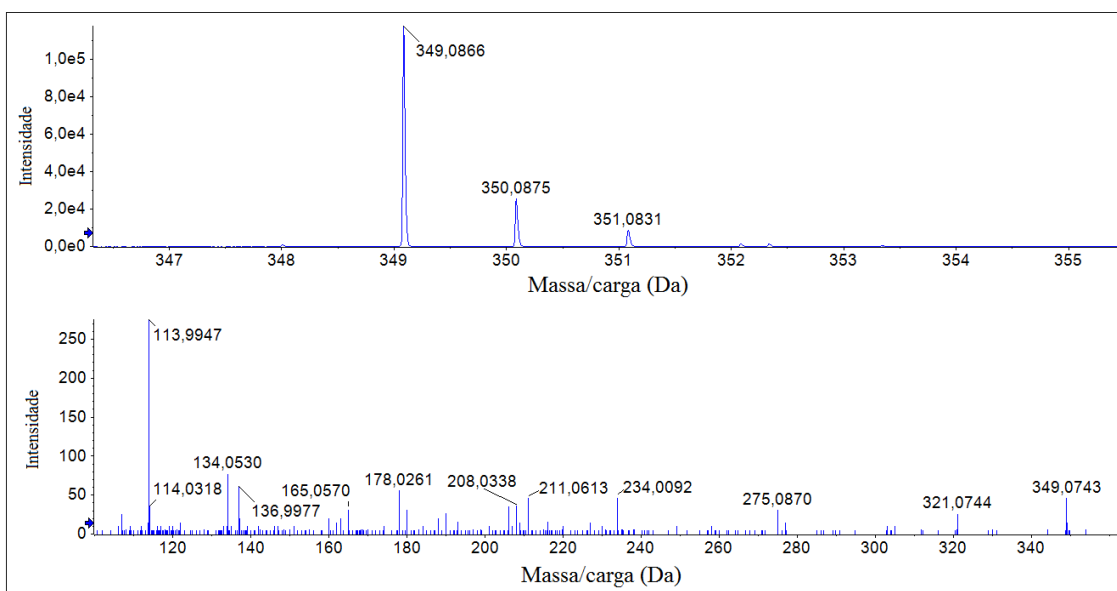


Figura 75 – Espectro em modo MS (quadro superior) e MS/MS do íon com  $m/z$  349,0866 Da (quadro inferior).

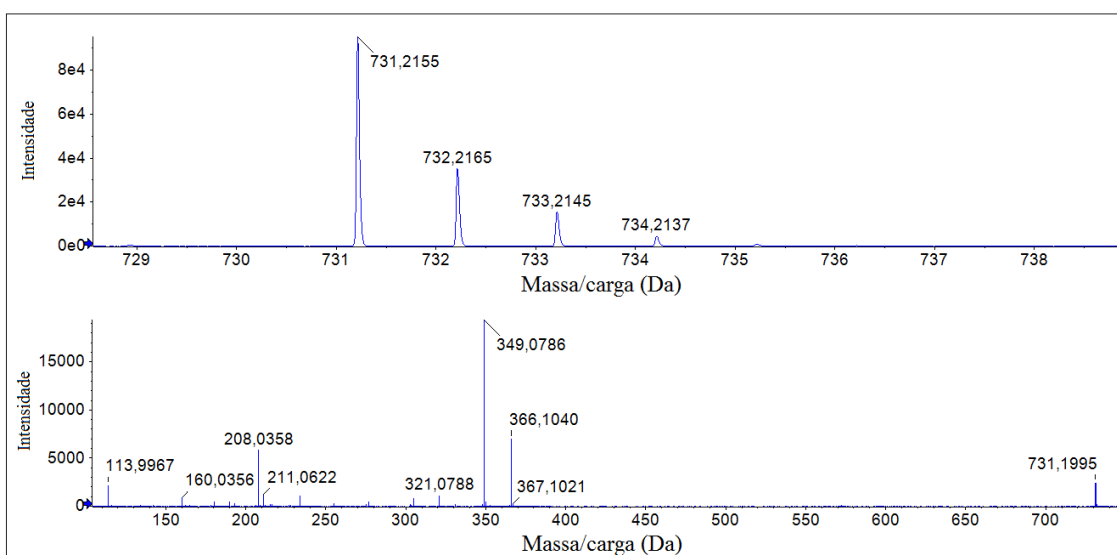


Figura 76 – Espectro em modo MS (quadro superior) e MS/MS do íon com  $m/z$  731,2155 Da (quadro inferior).

Podemos observar que o padrão de fragmentação desses dois compostos apresenta similaridade com o espectro MS/MS da AMX, o que reforça a hipótese que eles sejam derivados da amoxicilina. A partir deste dado, duas questões podem ser consideradas: ou bem eles já estavam presentes na solução padrão de amoxicilina, ou bem se formam ao entrarem em contato com a fase móvel. A segunda hipótese é a mais provável, haja vista que a instabilidade da amoxicilina é bem descrita na literatura sobre o assunto, especialmente na presença de meio ácido. Como a fase móvel contém ácido fórmico na concentração de 0,1%, a decomposição pode ocorrer em alguma medida. Além disso, é possível que a AMX tenha sofrido fragmentação na fonte, gerando o íon com  $m/z$  de 349 daltons, ou seja, o pico MS correspondente ao  $m/z$  349. Da que é mostrado no quadro inferior da Figura 73, é oriundo da perda de uma molécula neutra de amônia a partir da fragmentação da amoxicilina na fonte de ionização localizada na interface entre o cromatógrafo e o espectrômetro de massas. Cabe ressaltar que a AMX origina um produto de transformação/degradação denominado de amoxicilina dicetopiperazina. Ele é um isômero da amoxicilina que pode ser formado quando ela é submetida a condições ácidas. No quadro superior da Figura 73 não observamos a presença de um segundo pico com mesmo  $m/z$  da AMX, mas isso não significa necessariamente que o isômero não esteja presente, pois ele pode coeluir com a amoxicilina. Caso isso esteja ocorrendo, os espectros MS e MS/MS apresentados na Figura 74 possuem a contribuição também da amoxicilina dicetopiperazina em alguma extensão. Um estudo do padrão de fragmentação desse composto isolado poderia esclarecer essa questão se fosse identificado algum pico MS/MS característico que não esteja presente no espectro da AMX.

Quando exploramos a região da cauda direita do pico cromatográfico da amoxicilina, podemos observar que inúmeras outras substâncias estão presentes, conforme apresentado na Figura 77.

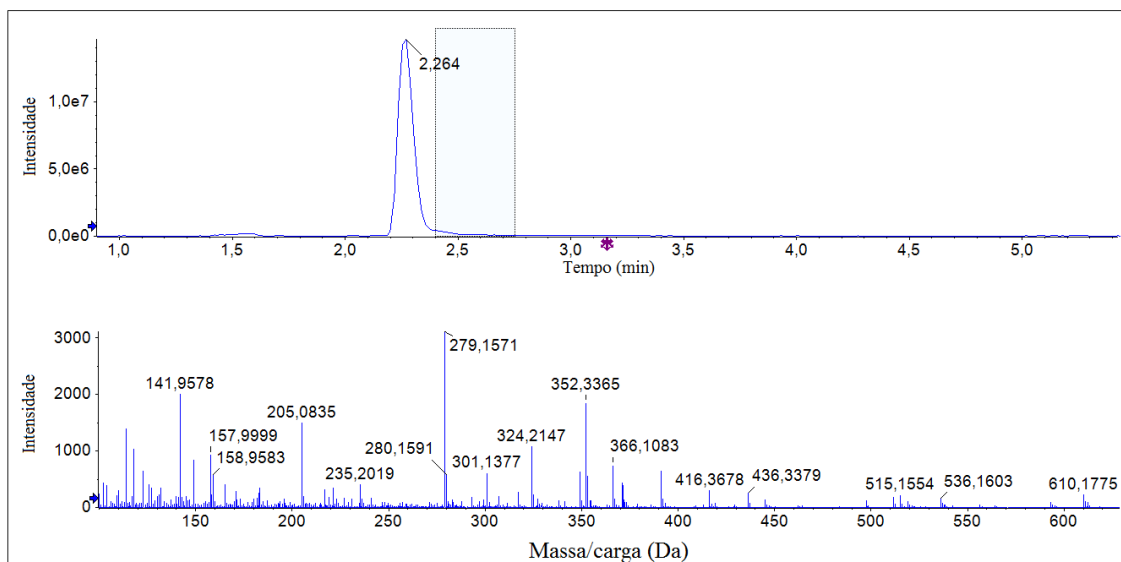


Figura 77 – Cromatograma da AMX, expandido na região entre 1,0 e 5,0 minutos (quadro superior); espectro de massas acumulado da região do cromatograma que aparece em destaque (quadro inferior).

Na Figura 77 podemos observar a presença de diversas moléculas. Elas podem ser oriundas da amoxicilina, de contaminantes presentes nos solventes ou podem ser formadas durante a análise. Como há uma certa separação cromatográfica em relação à amoxicilina, podemos descartar que esses compostos sejam formados por um processo de fragmentação da AMX na fonte de ionização. O pico com  $m/z$  515,1554 Da que aparece na Figura 77 pode corresponder ao íon  $[C_{24}H_{27}N_4O_7S]^+$ , já reportado na literatura<sup>(48)</sup> como um produto de transformação da AMX em meio ácido. A estrutura desse produto de transformação é apresentada no Quadro 8. A possibilidade da presença dessas inúmeras substâncias pode ser importante para a correta interpretação dos resultados obtidos em análises de quantificação ou em trabalhos que tenham o propósito de identificar produtos de transformação da amoxicilina.

O objetivo desta etapa do trabalho foi realizar uma avaliação inicial do comportamento da amoxicilina em meio aquoso quando submetida a condições frequentemente utilizadas na análise de resíduos de medicamentos através da técnica de LC-MS. Os dados obtidos indicam que a amoxicilina pode gerar outras substâncias durante o processo de análise, o que tem potencial de prejudicar a correta interpretação dos dados obtidos na análise de amostras que contenham AMX.



#### 4.7.2 Transferência da Amoxicilina para o Leite Bovino

O estudo da transferência da amoxicilina para o leite bovino foi realizado através da quantificação da AMX pela técnica de espectrometria de massas em modo MRM com o uso de um espectrômetro triplo-quadrupolo. O protocolo empregado foi baseado naquele utilizado pelo Lanagro/RS para esse tipo de análise, conforme descrito no capítulo 3. O espectrômetro foi configurado para fragmentar apenas o íon com  $m/z$  366,1 Da (com uma tolerância de  $m/z$  de  $\pm 0,5$  Da), durante toda a análise. Foram monitorados e registrados apenas os fragmentos MS/MS com  $m/z$  114,0 Da (utilizado como quantificador por ser o mais intenso) e o 207,9 (utilizado como qualificador por ser o segundo mais intenso). A tolerância aceita também foi parametrizada em  $\pm 0,5$  Da, conforme descrito no procedimento de análise do Lanagro/RS. Para a determinação da concentração da AMX nas amostras de leite coletadas em diferentes tempos após a administração do medicamento, foi preparada uma curva de calibração nessa matriz. Utilizou-se uma amostra de leite livre de amoxicilina e, a partir dela, foram preparadas as amostras apresentadas no Quadro 31, através da adição de um padrão de AMX em quantidade suficiente para se atingir a concentração final desejada. No Quadro 31 são apresentados os valores de área das duplicatas para os picos com  $m/z$  114 Da e 208 Da.

Quadro 31 – Concentrações e áreas dos picos da curva de calibração da AMX em leite.

Amostra	Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Área pico		Área pico	
		114 Da - primeira amostra)	114 Da (segunda amostra)	208 Da (primeira amostra)	208 Da (segunda amostra)
A1	0	$3,20 \times 10^2$	$1,94 \times 10^4$	$7,33 \times 10^3$	$1,28 \times 10^4$
A2	1	$4,70 \times 10^4$	$7,12 \times 10^4$	$2,93 \times 10^4$	$4,62 \times 10^4$
A3	2	$1,10 \times 10^5$	$1,11 \times 10^5$	$6,38 \times 10^4$	$7,58 \times 10^4$
A4	4	$1,75 \times 10^5$	$1,94 \times 10^5$	$1,05 \times 10^5$	$1,27 \times 10^5$
A5	6	$1,95 \times 10^5$	$3,22 \times 10^5$	$1,28 \times 10^5$	$2,05 \times 10^5$
A6	8	$4,05 \times 10^5$	$4,37 \times 10^5$	$2,51 \times 10^5$	$2,75 \times 10^5$
A7	20	$1,02 \times 10^6$	$1,11 \times 10^6$	$6,48 \times 10^5$	$7,01 \times 10^5$
A8	50	$2,81 \times 10^6$	$2,93 \times 10^6$	$1,80 \times 10^6$	$1,86 \times 10^6$

Ressalta-se que apesar da amostra A1, que corresponde ao leite sem adição de amoxicilina, apresentar a área diferente de zero para ambos os picos monitorados, eles não são oriundos da amoxicilina, mas de outro(s) composto(s) com um valor de  $m/z$  próximo ao da AMX e que geram fragmentos CID com  $m/z$  aproximado de 114 Da e/ou

208 Da. Isso se dá ao fato de que o quadrupolo apresenta uma baixa seletividade para íons com diferenças de  $m/z$  iguais ou inferiores a um dalton.

A partir dos dados obtidos (em duplicada), obteve-se a curva de calibração apresentada na Figura 78.

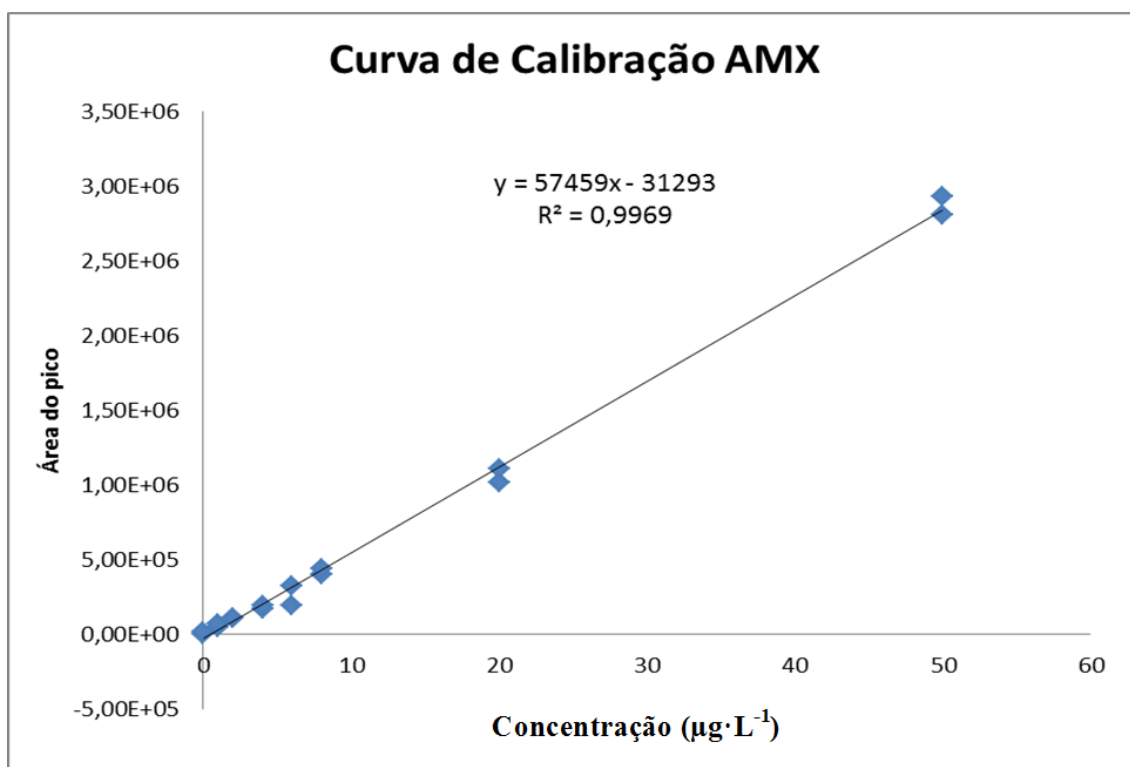


Figura 78 – Curva de calibração para a amoxicilina (pico 114 Da).

O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) encontrado foi 0,9969 e a reta obtida é descrita pela equação  $y=57459x - 31293$ .

Para a determinação da recuperação da amoxicilina foram utilizadas cinco amostras de leite. Duas dessas amostras de leite foram submetidas a todo o processo de preparo descrito no item 3, e ao final desse processo, foram fortificadas com uma solução padrão de amoxicilina para a concentração final de  $20 \mu\text{g L}^{-1}$ . As três outras amostras foram fortificadas com uma quantidade suficiente para uma concentração de  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  e então foram submetidas ao mesmo processo de preparo de amostra das duas anteriores. Após, foram determinadas as concentrações de AMX por espectrometria de massas. A recuperação calculada com base na área do pico mais intenso (quantificador) foi de 54%. O valor de recuperação calculado na validação do método pelo Lanagro RS

foi de 59%, o que indica que a recuperação obtida neste trabalho está próxima ao valor esperado.

Os resultados obtidos para as concentrações da amoxicilina transferida ao leite no experimento *in vivo* são citados no Quadro 32 e na Figura 79. Nesse mesmo quadro estão expressos os resultados da razão das áreas do pico qualificador e quantificador.

Quadro 32 – Áreas dos picos da análise em modo MRM, valores de concentração e razão das áreas do pico qualificador e quantificador da AMX.

Amostra	Média da área pico 114,0	Média da área do pico 207,9	Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Razão das áreas dos picos (207,9/114,0)
0 h	$2,10 \times 10^4$	$1,22 \times 10^4$	0,91	0,58
8 h	$3,22 \times 10^5$	$1,94 \times 10^5$	6,15	0,60
24 h	$5,86 \times 10^5$	$3,73 \times 10^5$	10,74	0,64
32 h	$1,35 \times 10^6$	$8,49 \times 10^5$	23,98	0,63
48 h	$5,38 \times 10^5$	$3,36 \times 10^5$	9,91	0,62
56 h	$3,00 \times 10^5$	$1,81 \times 10^5$	5,77	0,60
72 h	$4,38 \times 10^4$	$2,97 \times 10^4$	1,31	0,68
80 h	$3,53 \times 10^4$	$1,22 \times 10^4$	1,16	0,65
96 h	$2,36 \times 10^4$	$1,94 \times 10^5$	0,95	0,67
104 h	$2,16 \times 10^4$	$3,73 \times 10^5$	0,92	0,67

Os valores das concentrações citados no Quadro 33 foram utilizados na construção do gráfico apresentado na Figura 79.

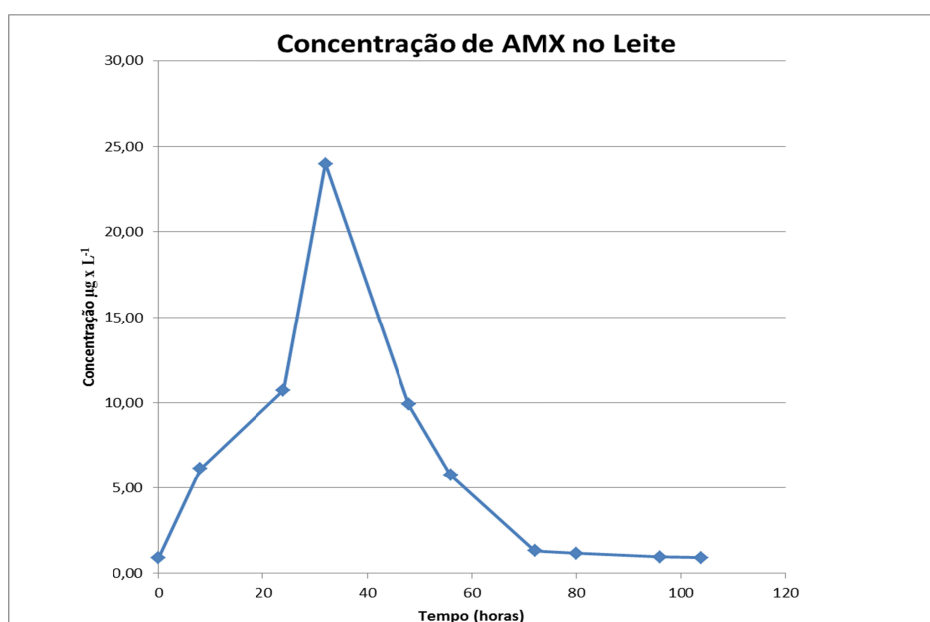


Figura 79 – Variação da concentração da amoxicilina no leite bovino até 104 horas após a administração da primeira dose.

Vale ressaltar que foram realizadas duas administrações do medicamento no animal durante a coleta das amostras: uma no tempo igual a zero, que corresponde à coleta logo antes da administração da primeira dose, e outra no tempo de 24 h, que corresponde à coleta 24 h após a primeira administração.

A bula do medicamento Bactrosina<sup>®</sup> indica que após a administração da sua última dose se faz necessário respeitar um período de carência de 18 dias antes do abate de animais destinados ao consumo humano e um período de dois dias antes da utilização do leite para consumo humano. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento estabeleceu que o limite máximo de resíduo de amoxicilina permitido em leite é de  $4,0 \mu\text{g L}^{-1}$ . Como a concentração de AMX na amostra coletada no tempo de 72 h (ou seja, 48 horas após a administração da última dose do medicamento) foi  $1,31 \mu\text{g L}^{-1}$ , concluímos que o tempo indicado na bula é suficiente para que a concentração de amoxicilina no leite fique abaixo do limite estabelecido pela legislação brasileira. Cabe ressaltar que se um alimento apresentar uma concentração de AMX abaixo do limite legal, isso não significa necessariamente que ele seja seguro para o consumo, especialmente para pessoas alérgicas à amoxicilina e derivados.

Outro parâmetro que é avaliado nas análises oficiais está relacionado com a razão entre as áreas dos dois picos mais intensos obtidos no modo MS/MS. Essa razão é determinada pela divisão da área do pico qualificador (207,9 Da) pela área do pico quantificador (114,0 Da). Primeiramente se calcula essa razão para cada ponto da curva de calibração e se faz uma média. Esse valor médio é utilizado como referência. Para cada uma das amostras se realiza o mesmo cálculo, dividindo-se a área do pico qualificador pela do quantificador. Após, verifica-se se os resultados das amostras estão contidos dentro de um intervalo de tolerância de -30 % e + 20% do valor de referência. Caso o valor encontrado esteja dentro do intervalo, considera-se que o parâmetro está sendo atendido, o que indica, no caso do experimento em questão, que o composto com  $m/z$  de 366,1 Da, que está gerando os picos MS/MS com 114,0 e 207,9 Da na fragmentação CID, trata-se da AMX. Caso o valor esteja fora dos limites, considera-se que o íon com  $m/z$  de 366,1 Da não se trata da amoxicilina.

Os dados para as razões das áreas dos picos constam na última coluna do Quadro 32. O valor de referência da razão obtida a partir dos dados da curva de calibração foi

0,63. Assim, os valores das razões das áreas dos picos qualificadores e quantificadores para as amostras coletadas ao longo do tempo devem estar contidos no intervalo entre 0,44 e 0,76. Pela análise dos resultados obtidos que são apresentados no Quadro 32, concluímos que esse parâmetro é atendido por todas as amostras coletadas ao longo das 104 horas do experimento, o que indica que o composto com massa de 366,1 Da que gera os picos MS/MS com 114 e 207,9 Da na fragmentação CID se trata da AMX.

Cabe registrar informações adicionais em relação a essa metodologia de quantificação para a amoxicilina. Na construção da curva de calibração é importante empregar os mesmos parâmetros de análise e a mesma matriz em que se encontra o analito para que a eventual fragmentação na fonte ou conversão da amoxicilina em algum produto de transformação durante o processo de preparo e durante a separação cromatográfica ocorra de forma similar para todas as amostras. Em análises de quantificação de amoxicilina, independentemente da matriz, caso o valor da razão das áreas dos picos qualificador/quantificador seja menor do que o limite inferior estabelecido para esse parâmetro, deve ser considerada também a possibilidade da presença da amoxicilina dicetopiperazina. Esse isômero da amoxicilina origina o pico MS/MS correspondente a 114 Da, mas não possui o pico com  $m/z$  207,9 Da, apesar de, em princípio, o espectro apresentar um pico com 206,2 Da, conforme citado por Nägele *et al* <sup>(48)</sup>. Porém, se faz necessário determinar o padrão de fragmentação dessa substância, seguindo-se os parâmetros empregados na análise da AMX, para verificar a presença dos íons 114 e 207,9 Da e a razão das suas áreas.

Segundo a literatura <sup>(48, 76, 77)</sup>, há algumas divergências em relação ao padrão de fragmentação proposto para a AMX e amoxicilina dicetopiperazina. Os espectros apresentados são muito pobres em informação, pois muitos foram obtidos em equipamentos de baixa resolução e com valores de energia de colisão não otimizados. Por exemplo, Geis-Asteggiant *et al* <sup>(77)</sup> apresenta como principal fragmento MS/MS da amoxicilina o íon com  $m/z$  de 114,0372 Da. Essa estrutura sugerida <sup>(77)</sup> está apresentada na Figura 80-A, e corresponde ao íon  $[C_5H_8NS]^+$ .

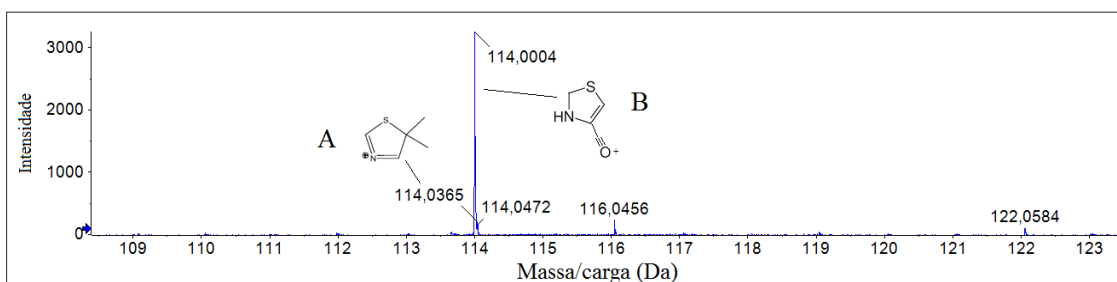


Figura 80 – Espectro experimental obtido para a AMX em água, ampliado na região de  $m/z$  114 Da e sugestões da estrutura dos íons.

Os resultados experimentais que foram obtidos na análise da amoxicilina em água, no presente trabalho, apontam que o pico mais intenso possui  $m/z$  104,0004 Da e corresponde ao íon  $[C_4H_4NOS]^+$  ( $m/z$  calculado de 104,0008 Da, estrutura “B” na Figura 80). O íon sugerido na referência bibliográfica em questão <sup>(77)</sup> também está presente, mas com intensidade bastante reduzida. Cabe ressaltar que as diferenças observadas nos espectros MS/MS podem estar relacionadas ao emprego de energias de colisão distintas entre os trabalhos. O aumento ou diminuição desse parâmetro pode levar ao surgimento de novos picos e desaparecimento de outros.

Conforme foi citado anteriormente, não foi possível a identificação dos metabólitos da amoxicilina que são transferidos para o leite. Como a matriz é muito complexa, foi identificada uma quantidade muito grande de substâncias em concentração bastante elevada, o que mascarou a presença de eventuais picos referentes aos metabólitos. A Figura 81 apresenta os cromatogramas obtidos por Q-TOF para as amostras de amoxicilina em leite, coletadas ao longo das 104 horas do experimento.

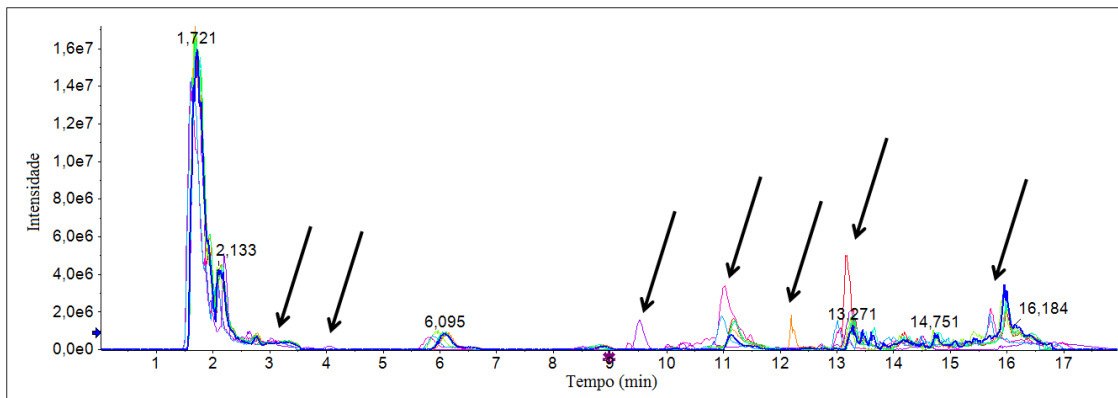


Figura 81 – Cromatogramas sobrepostos das amostras de leite coletadas ao longo de 104 horas.

Podemos observar diferenças significativas entre os cromatogramas, como nas regiões que aparecem destacadas pelas setas na Figura 81, mas a análise dos mesmos não demonstrou que se tratam de produtos de transformação ou metabólitos da amoxicilina. Além disso, a intensidade dos picos está muito acima daquela esperada para metabólitos ou produtos de transformação. A mudança do perfil dos cromatogramas pode ser devida a inúmeros fatores. Mudanças na alimentação do animal, alterações metabólicas induzidas pelo medicamento e alterações nas condições

ambientais, entre outras possibilidades, podem ser as responsáveis pelas diferenças observadas. A seguir são feitas algumas considerações que podem ser úteis em trabalhos futuros que tenham como objetivo a identificação de metabólitos ou produtos de transformação da amoxicilina.

O espectro de massas da amoxicilina em água que foi analisado neste trabalho mostrou a presença de produtos de transformação (ou impurezas) em concentração equivalentes as da AMX. É preciso avaliar cuidadosamente o comportamento do padrão de AMX em água para verificar se o meio ácido empregado na fase móvel provoca a hidrólise da mesma. A fragmentação na fonte de ionização também deve ser estudada. Outro parâmetro que pode levar à quebra da AMX, gerando picos MS adicionais, é a energia de colisão empregada no modo MS. Um valor muito baixo pode favorecer a formação de agregados de íons. Se o valor for muito elevado irá provocar a degradação, em algum grau, da amoxicilina. Também deve ser dada uma atenção especial para a formação da amoxicilina dicetopiperazina. A molécula apresenta grande similaridade com a amoxicilina. Se ela se formar durante a análise em meio ácido, poderá haver coeluição com a AMX. Se isso ocorrer, o espectro MS/MS obtido para AMX na verdade será o resultado da sobreposição de dois espectros MS/MS de substâncias distintas, o que dificulta muito a interpretação dos fragmentos. Uma alternativa seria conduzir a análise em modo negativo (ESI-), mas é preciso avaliar previamente se irá ocorrer a ionização da AMX nessa condição.

Para a identificação de metabólitos desconhecidos ou não previstos, se faz necessário melhorar o processo de purificação da amostra, pois o leite é uma matriz muito complexa. Quando muitas substâncias desconhecidas estão presentes, é difícil de distinguir os alvos. Para fins de quantificação da AMX em leite, o protocolo empregado mostrou-se adequado, apesar das ressalvas apontadas anteriormente.

A realização de estudos com a adição de amoxicilina ao leite *in natura* é bastante relevante para avaliar o comportamento da AMX ao longo do tempo nessa matriz. O emprego de concentrações elevadas do antibiótico pode facilitar muito a identificação de picos referentes a produtos de transformação que venham se originar pela ação da matriz e não pelos processos metabólicos do animal. A estratégia de utilização de concentrações mais elevadas no experimento *in vivo* seria muito útil, porém possui restrições evidentes.

O conhecimento prévio de potencias metabólitos simplificaria enormemente a tarefa de identificação. Por isso, seria muito importante tentar prever quais poderiam ser formados no processo de metabolização da amoxicilina pelo organismo do animal. De posse dessa informação, avaliar a transferência da AMX para o leite seria uma tarefa que poderia ser executada sem muitas alterações nos protocolos de preparo de amostra e análise aqui empregados.

## 5. CONCLUSÕES

O presente trabalho tem como principal contribuição o estabelecimento de uma metodologia sistematizada que pode ser empregada para a elucidação estrutural de produtos de transformação/degradação de fármacos de uso humano e veterinário, especialmente quando submetidos a processos oxidativos avançados. Porém, o seu uso não se restringe apenas a esse caso. A representação esquemática da Figura 19 resume bem a estratégia que está sendo proposta. A metodologia foi empregada para a identificação de produtos de transformação/degradação da rosuvastatina, sulfametoxazol, ciprofloxacino e norfloxacino e os resultados alcançados foram bastante satisfatórios. A sistemática aqui proposta pode ser muito útil nas etapas de planejamento e de execução dos experimentos. Também cabe ressaltar a contribuição inédita proveniente do estudo aprofundado dos produtos de transformação/degradação gerados a partir da fotocatalise da rosuvastatina na presença do ZnO. Os dez principais produtos de transformação/degradação identificados neste trabalho ainda não estavam reportados na literatura.

Cabe ressaltar que com a aplicação da metodologia aqui proposta também foi possível identificar inúmeros produtos de transformação/degradação de fotólise que ainda não estavam reportados na literatura: três para o sulfametoxazol (além de outros dois potencialmente novos em que não foi possível estabelecer a estrutura), cinco para o ciprofloxacino (além de outros dois potencialmente novos em que não foi possível estabelecer a estrutura) e doze produtos transformação/degradação da fotólise direta do norfloxacino, além de um potencialmente novo. O conhecimento desses produtos de transformação/degradação é importante para estudos de impacto ambiental proveniente da utilização desses antibióticos.



Outro resultado importante é que o estudo realizado estabeleceu as principais particularidades e dificuldades envolvidas na análise da amoxicilina e dos seus metabólitos, através da cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, especialmente em relação à quantificação de AMX em leite. Esses resultados podem contribuir para aprimorar o controle de resíduos desse medicamento em produtos de origem animal, o que gera um impacto relevante nos mecanismos públicos que visam preservar a saúde humana. Outras contribuições deste trabalho são descritas a seguir.

As técnicas de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas LC-Q-TOF MS e LC-Q-TOF MS/MS que foram empregadas demonstraram ser adequadas à identificação e quantificação de produtos de transformação oriundos de processos de fotólise e fotocatalise de fármacos.

A química computacional possui grande potencial como ferramenta auxiliar para a identificação dos produtos de transformação. Porém, ainda é necessário realizar estudos mais aprofundados para que se possa estabelecer protocolos específicos que simulem de forma fidedigna o meio e as reações que ocorrem durante os processos oxidativos avançados (fotólise e fotocatalise, que foram o foco deste trabalho), especialmente em relação à formação e mecanismo de reação dos radicais hidroxila.

No sistema empregado para a fotocatalise se observou que ocorre reação da rosuvastatina com o ZnO antes mesmo de se dar início ao processo fotocatalítico. A reação da RST com o catalisador resultou na formação de complexos com zinco.

Foram identificados dez produtos de transformação/degradação provenientes da fotocatalise da rosuvastatina com óxido de zinco. Na determinação das estruturas dos produtos de transformação designados por TP2, TP6 e TP10 foram empregados cálculos *ab initio*. Os valores de energia obtidos para os diferentes isômeros deram suporte adicional para a definição da posição mais provável de se encontrar a hidroxila proveniente do processo oxidativo avançado. Outros produtos minoritários da fotocatalise heterogênea da RST com ZnO foram observados, mas não foram identificados.

Os dados sugerem que a fotocatalise da RST com ZnO segue uma cinética de pseudo-primeira ordem. Nove dos dez TPs identificados alcançam uma concentração máxima em, aproximadamente, 5 minutos de fotocatalise. A concentração dos TPs diminui drasticamente após 30 minutos, exceto no caso do TP1, que permanece com a sua concentração praticamente constante até 260 minutos, para depois ser degradado completamente até, aproximadamente, 300 minutos.

Foram identificados 10 principais produtos de transformação na fotólise do sulfametoxazol em meio aquoso, apesar de não ter sido possível elucidar as estruturas de todos eles. Outros produtos minoritários foram observados, mas não identificados. Os valores de energia obtidos através de cálculos *ab initio* sugerem que a hidroxila no TP10 está localizada na posição meta em relação ao grupo NH<sub>2</sub> ligado ao anel aromático, porém quando se considera o mecanismo de reação radicalar, a posição mais favorável para a entrada da hidroxila seria na posição orto em relação ao grupo NH<sub>2</sub>, o que levanta dúvidas em relação aos resultados *in silico* para o caso em questão.

A análise das amostras de ciprofloxacino submetido à fotólise em meio aquoso resultou na identificação de quinze principais produtos de transformação. Observou-se a presença de inúmeros outros produtos minoritários que não foram estudados.

Foram identificados quinze principais produtos de transformação da fotólise do norfloxacino em meio aquoso. Outros produtos de transformação minoritários também foram observados, porém não foram estudados.

Durante os processos de fotólise e fotocatalise ocorrem reações inespecíficas, o que leva à formação de muitos produtos de transformação, especialmente de compostos hidroxilados.

A técnica de espectrometria de massas em modo MRM com equipamento do tipo triplo-quadrupolo, em alguns casos, pode deixar algumas dúvidas em relação a sua adequação para a quantificação da amoxicilina transferida ao leite bovino. O estudo realizado indicou que nas análises da AMX é preciso levar em consideração a possibilidade de degradação desse antibiótico durante o processo de preparo e análise das amostras. A fragmentação da amoxicilina na fonte de ionização deve ser avaliada. Pode ocorrer a hidrólise ácida da AMX, conduzindo à formação do isômero amoxicilina dicetopiperazina. Caso isso ocorra, poderemos ter variações nos cálculos de concentração e nos valores de razão entre as áreas dos picos qualificadores e quantificadores.

O período de carência de dois dias, que é indicado para o consumo do leite oriundo de bovinos submetidos ao tratamento com amoxicilina, é adequado para que o antibiótico atinja uma concentração inferior ao limite máximo de 4,0 µg L<sup>-1</sup> estabelecido pela legislação brasileira.

A análise da amoxicilina e de seus metabólitos em matrizes complexas possui inúmeras particularidades e dificuldades. A instabilidade da AMX, e talvez dos seus metabólitos, é um fator relevante que precisa ser considerado. O preparo de amostra que

é empregado na quantificação da amoxicilina em modo MRM não é adequado para a identificação de metabólitos desconhecidos em leite, porém pode ser eficaz investigação de metabólitos já esperados.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 – Ardrey, B.; *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry: An Introduction*, John Wiley: England, 2003.
- 2 – Sirtori, C.; López, A. M. A.; Rodríguez, S. M.; *Evaluación Analítica de Procesos de Transformación Biológica Fotoquímica y Fotocatalítica de Fármacos em Agua*, Editorial Ciemat: Madrid, 2010.
- 3 – Hoffmann, E.; Stroobant, V.; *Mass Spectrometry: Principles and Application*, John Wiley: 3<sup>a</sup> Ed., England, 2007.
- 4 – Prasain, J. K.; *Tandem Mass Spectrometry: Applications and Principles*; Croatia, 2012.
- 5 – Kandiah, M.; Urban, P. L.; *Advances in ultrasensitive mass spectrometry of organic molecules*; *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, 42, pp 5299.
- 6 – McKenna, A. M. et al; *Unprecedented Ultrahigh Resolution FT-ICR Mass Spectrometry and Parts-Per-Billion Mass Accuracy Enable Direct Characterization of Nickel and Vanadyl Porphyrins in Petroleum from Natural Seeps*; *Energy Fuels*, **2014**, 28, 4, pp 2454.
- 7 – [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2002/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2002/). Página acessada em 28/04/2015.
- 8 – Van Berkel, G. J.; Zhou, F.; *Characterization of an Electrospray Ion Source as a Controlled-Current Electrolytic Cell*; *Anal. Chem.*, **1995**, 67, pp 2916.
- 9 – Cech, N.; Enke, C. G.; *Practical Implications of Some Recent Studies in Electrospray Ionization Fundamentals*; *Mass Spectrometry Reviews*, **2001**, 20, pp 362.
- 10 – Wilm, M.; *Principles of Electrospray Ionization*; *Mol Cell Proteomics*; **2011**, 10, 7, pp 1.
- 11 – BorMan, S.; Russell, H.; Siuzdak, G.; *Chemistry Chronicles; A Mass Spec. Timeline*; American Chemical Society, 2003.
- 12 – Dookeran, N. N.; Yalcin, T.; Harrison, A. G.; *Fragmentation Reactions of Protonated  $\alpha$ -Amino Acids*, *Journal of Mass Spectrometry*, **1996**, 31, pp. 500.

- 13 – Picó, Y.; Barceló, D.; Transformation products of emerging contaminants in the environment and high-resolution mass spectrometry: a new horizon, *Anal Bioanal Chem*, **2015** (published online 20 May).
- 14 – Gentili, A.; Perret, D.; Marchese, S.; Liquid chromatography-tandem Mass Spectrometry for Performing Confirmatory Analysis of Veterinary Drugs in Animal-food Products, *Trends in Analytical Chemistry*, **2005**, 24, 7.
- 15 – Kind, T.; Fiehn, O.; Seven Golden Rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry; *BMC Bioinformatics*, **2007**, 8, 105.
- 16 – Berglund, M.; Wieser, M. E.; 2011 Isotopic compositions of the elements; *Pure Appl. Chem.*, **2011**, Vol. 83, No. 2, pp. 397.
- 17 – Grant, G. H.; Richards, W. G.; *Computational Chemistry*; Oxford University Press; Great Britain, 1995 reprinted (with corrections) 2003.
- 18 – Segalin, J.; Parâmetros de Carga para o Campo de Força do Aminoesteróide Esqualamina, dissertação de mestrado, UFRGS, 2008.
- 19 – <https://www.cas.org>. Página acessada em 08/05/2015.
- 20 – Barceló, D.; Emerging Pollutants in Water Analysis; *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **2003**, 22, 10, pp xiv.
- 21 – Alexsandro Dallegre: Determinação de hormônios estrógenos e progestágenos em amostras ambientais por GC-MS; *Dissertação de Mestrado*, UFRGS, 2012.
- 22 – 113th Congress First Session – March 14, 2013.
- 23 – Colborn, T., vom Saal, F. S.; Soto, A. M.; Developmental Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals in Wildlife and Humans; *Environmental Health Perspectives*, **1993**, 101, 5.
- 24 – Rice, W.R.; Friberg U.; Gavrilets, S.; Homosexuality as a Consequence of Epigenetically Canalized Sexual Development, *Quarterly Review of Biology*; **2012**, 87, 4.
- 25 – Paul, T.; Dodd, M. C.; Strathmann, T. J.; Photolytic and photocatalytic decomposition of aqueous ciprofloxacin: Transformation products and residual antibacterial activity water research, **2010**, 44, pp 3121.
- 26 – Batchu, S. R.; Panditi, V. R.; O'Shea, K. E.; Gardinali, P. R.; Photodegradation of antibiotics under simulated solar radiation: Implications for their environmental fate; *Science of the Total Environment*; **2014**, 470–471, pp 299.

- 27 – Xiaoxuan. W. *et al*; Distinct Photolytic Mechanisms and Products for Different Dissociation Species of Ciprofloxacin; *Environ. Sci. Technol.* **2013**, 47, pp 4284.
- 28 – Sturini M. *et al*; Photolytic and photocatalytic degradation of fluoroquinolones in untreated river water under natural sunlight; *Applied Catalysis B: Environmental*, 2012, 119– 120, pp 32.
- 29 – Burhenne, J.; *et al*; Photolytic Degradation of Fluoroquinolone Carboxylic Acids in Aqueous Solution; *Environ. Sci. & Pollut. Res.*; **1997**, 4, 1, pp 10.
- 30 – Babic, S.; Periša, M.; Škoric, I.; Photolytic degradation of norfloxacin, enrofloxacin and ciprofloxacin in various aqueous media; *Chemosphere*, **2013**, 91, pp 1635.
- 31 – Paul, T.; Miller P. L.; Strathmann, T. J.; Visible-Light-Mediated TiO<sub>2</sub> Photocatalysis of Fluoroquinolone Antibacterial Agents; *Environ. Sci. Technol.* **2007**, 41, pp 4720.
- 32 – Dewitte, B.; *et al*; Ozonation of Ciprofloxacin in Water: HRMS Identification of Reaction Products and Pathways; *Environ.; Sci. Technol.* **2008**, 42, pp 4889.
- 33 – Hubicka. U. *et al*; Separation and characterization of ciprofloxacin, difloxacin, lomefloxacin, norfloxacin, and ofloxacin oxidation products under potassium permanganate treatment in acidic medium by UPLC-MS/MS; *Talanta*, **2013**, 109, 91–100.
- 34 – Pei W., Yi-Liang H., Ching-Hua H.; Oxidation of fluoroquinolone antibiotics and structurally related amines by chlorine dioxide: Reaction kinetics, product and pathway evaluation; *water research*, **2010**, 44 pp 5989.
- 35 – Ahmad I. *et al*; Photodegradation of norfloxacin in aqueous and organic solvents: A kinetic study; *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **2015**, 302, pp 1.
- 36 – Lam, M. W.; Mabury, S. A.; Photodegradation of the pharmaceuticals atorvastatin, carbamazepine, levofloxacin, and sulfamethoxazole in natural Waters; *Aquat. Sci.*, **2005**, 67, pp 177.
- 37 – Zhou, W.; Moore, D. E.; Photochemical decomposition of sulfamethoxazole; *International Journal of Pharmaceutics*, **1994**, 110, pp 55.
- 38 – Trovó, A. G. *et al*; Photodegradation of sulfamethoxazole in various aqueous media: Persistence, toxicity and photoproducts assessment; *Chemosphere*, **2009**, 77, pp 1292.

- 39 – Bonvin. F.; et al; Direct Photolysis of Human Metabolites of the Antibiotic Sulfamethoxazole: Evidence for Abiotic Back-Transformation; Environ. Sci. Technol. **2013**, 47, pp 6746.
- 40 – Trovó, A. G. *et al*; Degradation of sulfamethoxazole in water by solar photo-Fenton. Chemical and toxicological evaluation; water research, **2009**, 4, 3, pp 3922.
- 41 – Shah, R. P.; Sahu, A.; Singh, S.; LC-MS/TOF, LC-MS<sup>n</sup>, on-line H/D exchange and LC-NMR studies on rosuvastatin degradation and in silico determination of toxicity of its degradation products: a comprehensive approach during drug development, Anal Bioanal Chem, **2013**, 405, pp 3215.
- 42 – Singh S. *et al*; A critical review on the use of modern sophisticated hyphenated tools in the characterization of impurities and degradation products ; Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **2012**, 69, pp 148.
- 43 – Khedr, A.; Belal, F.; Ibrahim, F. Elawady, T.; Analysis of rosuvastatin stress degradation behavior using liquid chromatography coupled to ultraviolet detection and electrospray ionization mass spectrometry; Anal. Methods, **2013**, 5, pp 6494.
- 44 – Litvic, M. *et al* A study of photodegradation of drug rosuvastatin calcium in solid state and solution under UV and visible light irradiation: The influence of certain dyes as efficient stabilizers, Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, **2013**, 252, pp 84.
- 45 – Gajjar, A. K.; Shah, V. D.; Development and Validation of a Stability-Indicating Reversed-Phase; HPLC Method for Simultaneous Estimation of Rosuvastatin and Ezetimibe from Their Combination Dosage Forms, Eurasian J Anal Chem **2010**, 5, 3, pp 265.
- 46 – Mehta, T. N.; Patel, A. K.; Kulkarni, G. M.; Suubbaiah, G.; Determination of Rosuvastatin in the Presence of its Degradation Products by a Stability-Indicating LC Method; AOAC International, **2005**, 88, 4, pp 1142.
- 47 – Liu, C.; Wang, H.; Jiang, Y.; Du, Z.; Rapid and simultaneous determination of amoxicillin, penicillin G, and their major metabolites in bovine milk by ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry; Journal of Chromatography B, **2011**, 879, pp 533.
- 48 – Nägele, E.; Moritz, R.; Structure Elucidation of Degradation Products of the Antibiotic Amoxicillin with Ion Trap MS<sup>n</sup> and Accurate Mass Determination ; by ESI TOF; J Am Soc Mass Spectrom, **2005**, 16, pp 1670.

- 49 – Reynolds, T. *et al*; Rapid method for the quantification of amoxicillin and its major metabolites in pig tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with emphasis on stability issues; *J. Chromatogr. B*, (2008, 861, pp 108.
- 50 – De Baere, S.; Cherlet, M.; Baert, K.; De Backer, P.; Quantitative Analysis of Amoxicillin and Its Major Metabolites in Animal Tissues by Liquid Chromatography Combined with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry; *Anal. Chem.*, **2002**, 74, pp 1393.
- 51 – Magureanu, M. *et al*; Degradation of antibiotics in water by non-thermal plasma Treatment; *water research*, **2011**, 45, pp 3407.
- 52 – Reynolds, T. *et al*; Influence of administration route on the biotransformation of amoxicillin in the pig; *J. vet. Pharmacol. Therap.*, **2008**, 32, pp 241.
- 53 – Längin, A.; Alexy R.; König, A.; Kümmerer, K.; Deactivation and transformation products in biodegradability testing of  $\beta$ -lactams amoxicillin and piperacillin; *Chemosphere*, 2009, 75, pp 347.
- 54 – Tian, C. *et al*, Cost-effective large-scale synthesis of ZnO photocatalyst with excellent performance for dye photodegradation, *Chem. Commun.*, **2012**, 48, pp 2858.
- 55 – Rao, A. N.; Sivasankar, B.; Sadasivamb, V.; Kinetic studies on the photocatalytic degradation of Direct Yellow 12 in the presence of ZnO catalyst, *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, **2009**, 306, 1-2, pp 77.
- 56 – Korolkovas, A. França, F. F. A. C.; *Dicionário Terapêutico Guanabara*; Editora Guanabara Koogan SA, 15<sup>a</sup> edição, Rio de Janeiro, 2008.
- 57 – McDermott, W. R.; *Social Ramifications of Control of Microbial Disease*, *Johns Hopkins Med. J.*, **1982**, 151, pp. 302.
- 58 – Foye, W. O.; *Principles of Medicinal Chemistry*, Second Edition; Lea & Febiger; Philadelphia, 1981.
- 59 – Hollis, A.; Ahmed, Z.; Preserving Antibiotics, Rationally, *The New England J. of Medicine*, **2013**, 26, pp, 2474.
- 60 – <http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/destaqueinicio>. Página acessada em 07/06/2014.
- 61 – Cogliani, C.; Goossens, H.; Greko, C.; Restricting Antimicrobial Use in Food Animals: Lessons from Europe; *Microbe*, **2011**, 6, 6.
- 62 – Monitoramento da Prevalência e do Perfil de Suscetibilidade aos Antimicrobianos em enterococos e salmonelas isso ladas de Carcaças de franco congeladas

- comercializadas no Brasil; Programa de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango PREBAF; Agência Nacional de Vigilância Sanitária ANVISA, 2008.
- 63 – Alekshun, M.; Levy, S.; Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*, **2007**, 128, pp 1037.
- 64 – Walsh, C.; Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*, **2000**, 406, pp 775.
- 65 – Patrick, Graham L.; An Introduction to Medicinal Chemistry; Oxford University Press Inc, fourth Edition, New York; 2009.
- 66 – Jank, L.; Implementação e Validação de Metodologia Analítica para Determinação da Presença de Antibióticos em Águas Residuárias; Dissertação de Mestrado, UFRGS, 2011.
- 67 – Freitas, A.; Barbosa, J; Ramos, F.; Determination of Amoxicillin Stability in Chicken Meat by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry; *Food Anal. Methods*, **2012**, 5, pp 471.
- 68 – Regulation EU N. 37/2010 of the Council of 22 December 2009.
- 69 – Stancu, C.; Sima, A.; Statins: Mechanism of action and effects; *J. Cell. Mol. Med.*, **2001**, 4; pp 378.
- 70 – Hartz I. *et al*; Aspects of statin prescribing in Norwegian counties with high, average and low statin consumption - an individual-level prescription database study; *BMC Clin. Pharmacol*, **2007**, 7, 14, pp 1.
- 71 – Loos R.; *et al*; EU-wide monitoring survey on emerging polar organic contaminants in wastewater treatment plant effluents *Water Res*, **2013**, 47, pp 6475.
- 72 – Gilroy, E. A. M. *et al*; Toxicology and bioconcentration of the pharmaceuticals moxifloxacin, rosuvastatin, and drospirenone to the unionid mussel *Lampsilis siliquoidea* *Science of the Total Environment*, **2014**, 487, pp 537.
- 73 – Machado, T. C.; Degradação fotocatalítica de rosuvastatina em solução aquosa empregando ZnO em suspensão : cinética, subprodutos e toxicidade; Dissertação de Mestrado; UFRGS; 2011.
- 74 – Wieser, M. E.; Berglund, M.; Atomic Weights of the Elements 2007, IUPAC Technical Report; *Pure Appl. Chem.*, **2009**, 81, 11; pp 2131.



- 75 – Krouse, H. R.; Bernhard, M.; Schoenau, J.J.; In: Boutton T.W. & S. Yamasaki (eds) Applications of stable isotopes techniques to soil sulphur cycling, In Mass spectrometry of soil, **1996**, Marcel Dekker, New York pp 246.
- 76 – Liu, C.; Wang H.; Jiangb, Y.; Dua, Z.; Rapid and simultaneous determination of amoxicillin, penicillin G, and their major metabolites in bovine milk by ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry; *Journal of Chromatography B*, **2011**, 879, pp 533.
- 77 – Geis-Asteggiate, L.; Nuñez, A.; Lehotay, S. J.; Lightfield, A. R.; Structural characterization of product ions by electrospray ionization and quadrupole time-of-flight mass spectrometry to support regulatory analysis of veterinary drug residues in foods; *Rapid Commun. Mass Spectrom.*; **2014**, 28, pp 1061.