

# OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS EM AMOSTRAS AQUOSAS USANDO HPLC-DAD

**GARCÊS, Luan H.**<sup>1</sup>; VAZ, Tamires S.<sup>2</sup>; PEREIRA, Pedro A.P. <sup>3</sup>; DOS ANJOS, Jeancarlo P.<sup>4</sup>;

<sup>1</sup>Graduando em Engenharia Química; Trabalho de pesquisa de iniciação científica voluntária; luan.hg@hotmail.com

<sup>2</sup>Doutoranda em Química; tamiresvaz@yahoo.com.br

<sup>3</sup>Doutor em Química; pedro.pereira@gmail.com

<sup>4</sup>Doutor em Química – orientador; jeancarlo.anjos@fieb.org.br

## RESUMO

As águas superficiais tem sido um dos principais compartimentos ambientais nos quais têm sido identificada a presença dos resíduos de medicamentos. A contaminação dos ecossistemas aquáticos se dá, em grande parte, por meio da descarga de águas residuais, visto que, os medicamentos quando ingeridos por humanos e animais, após metabolizados, são excretados pela urina e fezes. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo otimizar a separação cromatográfica de compostos utilizados como princípios ativos de medicamentos, de diferentes classes terapêuticas, para posterior aplicação na identificação e quantificação de resíduos destas substâncias em amostras aquosas. A otimização da separação cromatográfica de 17 fármacos foi realizada usando HPLC-DAD por meio de testes com diferentes fases móveis. Até o momento, foi possível obter boa separação cromatográfica para onze dos dezessete compostos estudados. Posteriormente, o método será validado e aplicado na determinação de resíduos de fármacos em amostras aquosas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Resíduos de medicamentos; fármacos; poluentes emergentes; HPLC-DAD

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente, com o avanço científico e tecnológico, tornou-se cada vez mais frequente o descobrimento e identificação de compostos químicos potencialmente prejudiciais nos mais diversos compartimentos ambientais, como por exemplo, águas superficiais. Com isso, naturalmente, aumentou-se a preocupação e o cuidado com poluentes emergentes (substâncias tóxicas encontradas em variados ecossistemas) e contaminantes não regulamentados que, invariavelmente, podem causar impactos tanto ambientais, como para a saúde humana.<sup>1</sup>

Considerados como poluentes emergentes, por serem recalcitrantes e de difícil biodegradação, os produtos farmacêuticos tem sido motivo de grande preocupação já que alguns tipos de fármacos podem ser prejudiciais aos ecossistemas ambientais e até mesmo para saúde humana, mesmo em baixas concentrações. A presença e persistência de resíduos de medicamentos no ambiente pode ocorrer devido a algumas propriedades químicas destas substâncias, tais como: solubilidade em água, polaridade, estrutura molecular e resistência a biotransformação<sup>3</sup>.

As águas superficiais tem sido um dos compartimentos ambientais nos quais têm sido identificada a presença dos resíduos de medicamentos, tendo sofrido grande impacto nos últimos anos e função da crescente utilização de fármacos no cotidiano dos cidadãos comuns, em áreas hospitalares e em produções pecuárias. Vale ressaltar que a presença de resíduos de medicamentos em ambientes aquáticos ocorre como uma mistura de vários compostos, e não de medicamentos individuais, o que acarreta num aumento significativo nos riscos à saúde humana e ambiental, explicitados anteriormente. A contaminação dos ecossistemas aquáticos se dá, em grande parte, por meio da descarga de águas residuais, visto que, os medicamentos quando ingeridos por humanos e animais, após metabolizados, são excretados pela urina e fezes. Desse modo, a descarga age como um caminho para os resíduos de fármacos cheguem a rios, lagos e oceanos<sup>2</sup>.

Considerando que os resíduos de medicamentos são encontrados em concentrações muito baixas, a cromatografia líquida de alta eficiência tem sido indicada como um método viável para a detecção destes compostos em amostras aquosas, tornando possível, com o método de detecção correto, a identificação e quantificação de resíduos destas substâncias em ecossistemas aquáticos.<sup>1</sup>

Diante disso, este trabalho tem como objetivo otimizar a separação cromatográfica de compostos utilizados como princípios ativos de medicamentos de diferentes classes terapêuticas para posterior aplicação na identificação e quantificação de resíduos destas substâncias em amostras aquosas.

## 2. METODOLOGIA

Foram adquiridos padrões de 17 fármacos de diferentes classes terapêuticas (antibióticos, anti-inflamatórios, analgésicos e estimulante): ácido acetilsalicílico, enrofloxacina, ibuprofeno, eritromicina, nimesulida, cetoprofeno, cafeína, cloridrato de tetraciclina, ciprofloxacina, paracetamol, naproxeno, amoxicilina, cefalexina monohidratada, cloridrato de oxitetraciclina, diclofenaco de sódio, trimetropim e sulfametoxazol.

Foram preparadas soluções estoque de cada fármaco, individualmente, em concentrações que variaram de 500 mg L<sup>-1</sup> a 580 mg L<sup>-1</sup>. Os solventes utilizados para a preparação da solução padrão de cada substância foi água ou metanol, visto que estas possuem propriedades diferentes. As soluções padrão dos fármacos enrofloxacina e trimetropim foram menores do que as mencionadas anteriormente, sendo 400 mg L<sup>-1</sup> e 250 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. A partir das soluções estoque, foi preparada uma solução de trabalho contendo a mistura de todos os fármacos na concentração de 10 mg L<sup>-1</sup>, diluídos em metanol.

Para a otimização da separação cromatográfica dos fármacos foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) da marca Shimadzu, equipado com uma unidade de bombeamento de solvente quaternária (LC-20AT), um injetor automático (SIL-20AHT), degaseificador (DGU-205), forno para coluna (CTO-20A) e uma interface controladora (CBM-20A), sendo os compostos injetados em uma coluna Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 (2,1 x 100mm; 2,7 µm).

Diferentes solventes foram utilizados em testes como fase móvel (Tabela 1), bem como o emprego de diferentes gradientes de eluição das fases móveis testadas. Sendo assim, foram realizados vários testes, variando as fases móveis e suas respectivas concentrações ao longo das corridas cromatográficas, visando melhorar a eficiência de separação dos fármacos estudados, bem como o aprimorando de métodos já existentes na literatura.

Após os testes, padrões individuais de cada fármaco foram injetados no sistema cromatográfico para a confirmação dos tempos de retenção dos mesmos bem como para ser realizada a otimização dos comprimentos de onda para a detecção de cada fármaco, a fim de obter maior sensibilidade durante as posteriores análises.

Em todos os testes, o volume injetado da solução padrão dos fármacos foi de 20 µL e temperatura do forno de 40°C. Os comprimentos de onda utilizados na detecção dos compostos foram otimizados individualmente para cada composto.

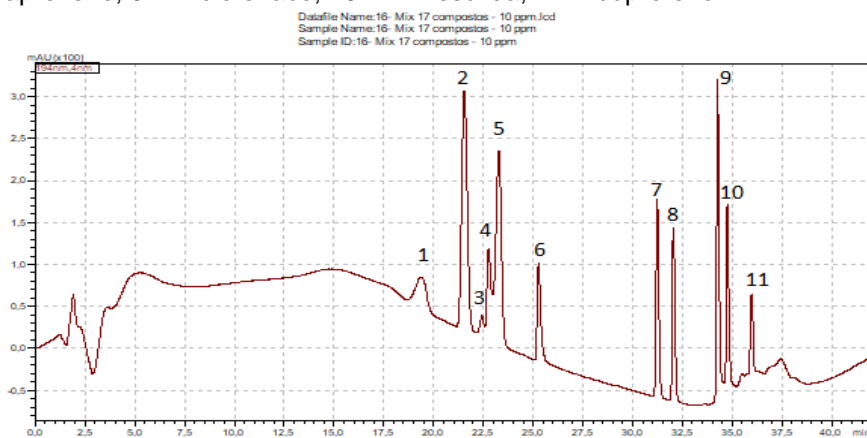
Tabela 1 – Solventes utilizados na composição da fase móvel nos diferentes testes para otimização da separação cromatográfica dos fármacos

	Solventes	
	A	B
a)	Ácido fórmico 0,1% em água	Acetonitrila
b)	Acetato de amônio 0,01mM e ácido fórmico 0,5 mM, em água	Acetato de amônio 0,01mM em metanol
c)	Hidróxido de amônio 0,05%, em água	Metanol
d)	Acetato de amônio 5mM : ácido acético	Metanol : Acetonitrila
e)	acetato de amônio 5mM : ácido acético	Ácido acético
f)	Acetato de amônio 5mM : ácido acético	Metanol : Acetonitrila (1:2)
g)	Acetonitrila / Metanol (2:1)	Tampão Acetato de amônio 5mM : ácido acético (pH=4,7)
h)	Tampão Acetato de amônio 5mM : ácido acético (pH=4,7)	Acetonitrila
i)	Formiato de amônio 5mM : ácido fórmico (pH = 3,8)	Metanol
j)	Metanol	Água
k)	Formiato de amônio 5mM : ácido fórmico (pH = 3,8)	Acetonitrila : Metanol (2:1)

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a análise dos cromatogramas obtidos nos diferentes testes realizados, a melhor resolução obtida até o momento, referente à separação dos fármacos está apresentado na Figura 1.

Figura 1 – Cromatograma referente à mistura dos 17 fármacos na concentração de 10 mg L<sup>-1</sup>, obtidos por HPLC-DAD, após a otimização da separação cromatográfica. Identificação dos picos: 1 - Cafeína; 2 - Cloridrato de oxitetraciclina; 3 – ciprofloxacina; 4 – Cloridrato de tetraciclina; 5 – Sulfametoxazol; 6 – Enrofloxacinina; 7 – Cetoprofeno; 8 – Naproxeno; 9 – Diclofenaco; 10 – Nimesulida; 11 - Ibuprofeno



Como mostrado no cromatograma acima, onde cada pico indica um fármaco, dos 17 compostos presentes na mistura, apenas onze foram identificados com uma boa separação e melhor resolução dos picos. Do total de compostos analisados, a melhor separação cromatográfica foi obtida para cinco antibióticos e cinco anti-inflamatórios. Observa-se que os antibióticos apresentam menores tempos de retenção que os anti-inflamatórios, devido às diferentes propriedades dos compostos estudados e, conseqüentemente, diferentes interações com a coluna cromatográfica.

Este fato propõe que novos testes devem ser efetuados a fim de obter a separação de todos os fármacos estudados.

### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pode-se inferir que a otimização da separação cromatográfica de fármacos que apresentam diferenças em sua composição, propriedades físico-químicas e classes terapêuticas é complexa, visto que, após a realização de 11 testes, ainda não foi possível obter um método com significativa resolução para a separação de todos os compostos propostos para análise.

Contudo, evidenciou-se uma evolução gradativa a cada teste realizado. Desse modo, após o término da otimização da separação cromatográfica dos fármacos o método proposto será validado e aplicado na determinação de resíduos destas substâncias em amostras aquosas, após procedimento de extração dos analitos nas amostras a serem analisadas.

### 5. REFERÊNCIAS

- 1 LIMA, D. R. S.; TONUCCI, Marina Caldeira; LIBANIO, Marcelo e AQUINO, Sérgio Francisco de. **Fármacos e desreguladores endócrinos em águas brasileiras: ocorrência e técnicas de remoção.** *Eng Sanit Ambient*, v.22 n.6, nov/dez 2017. DOI: 10.1590/S1413-41522017165207. Acesso em 30 mar 2018.
- 2 SOUSA, Ivo. **Métodos de eliminação de fármacos e seus metabolitos ao nível das Estações de Tratamento de Águas Residuais.** 2015 p.16-18, Projeto de Pós-Graduação/Dissertação apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.
- 3 MIRANDA, Susana Isabel. **Remoção de Fármacos de Águas Contaminadas. Avaliação de vários Substratos.** 2014 p 25-26, Mestrado em Análises Químicas Ambientais pela Universidade Évora.

## Declaração

Eu, **Jeancarlo Pereira dos Anjos**, orientador (a) de Luan Hereda Garcês, declaro ter realizado a análise e revisão do resumo expandido tendo como título: "Otimização de método cromatográfico para a determinação de resíduos de medicamentos em amostras aquosas usando HPLC-DAD".

Por ser verdade firmamos o presente.

Salvador, 12 de abril de 2019.



**Jeancarlo Pereira dos Anjos**  
Professor adjunto  
SENAI CIMATEC