

# DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE FÁRMACOS EM MEIO AQUÁTICO POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA E *HPLC*

João Henrique Zimnoch dos Santos<sup>1</sup>

Tânia Mara Pizzolato<sup>1</sup>

Ana Cristina Borba da Cunha<sup>2</sup>

## RESUMO

O presente trabalho apresenta o desenvolvimento de uma metodologia analítica para fármacos em nível de traços como poluentes no meio aquoso, envolvendo o uso de cromatografia líquida com detector espectrofotométrico na região do ultravioleta (HPLC-UV). Quatro fármacos (antibióticos), a saber: ampicilina, amoxicilina, tetraciclina e cefalexina, foram avaliados em presença de diversas fases móveis, que foram selecionadas de acordo com a melhor performance cromatográfica, sendo que ampicilina e amoxicilina apresentaram melhor performance cromatográfica na mesma fase móvel. Para extração em fase sólida dos fármacos foram avaliadas três fases comerciais: LC-18 (SUPELCLEAN), Supelclean™ ENVI™-Chrom P, Absolut NEXUS. Amoxicilina e ampicilina não apresentaram boas recuperações nas fases e eluentes estudados. Para tetraciclina e cefalexina, a fase comercial Chrom P apresentou boas recuperações quando utilizados os solventes metanol e a mistura 1% de solução aquosa de ácido acético e metanol (60:40), respectivamente.

**Palavras-chave:** fármacos, SPE, HPLC-UV.

## ABSTRACT

**Development of analytical methodology for quantification of pharmaceuticals in aqueous milieu by solid phase extraction and high performance liquid chromatography.** The present work propose the development of an analytical methodology for pharmaceuticals at trace levels in aqueous milieu, combining the use of solid phase extraction and high performance liquid chromatography, employing UV-vis detector (HPLC-UV). Four pharmaceuticals (antibiotics), namely: ampicillin, amoxilin, tetraciclín and cephalixin, were evaluated in the presence of different mobile phases, which were selected according to the best performance. Ampicilin and amoxilin

<sup>1</sup> UFRGS, Instituto de Química, Porto Alegre, RS.

<sup>2</sup> Unilasalle, Curso de Química. Av. Victor Barreto, 2.288, CEP 92010-000, Canoas, RS. E-mail anacunha@unilasalle.edu.br

showed the best performance in the same mobile phase. For the solid phase extraction procedure, three commercial phases were evaluated: LC-18 (SUPELCLEAN), Supelclean™ ENVITM-Chrom P and Absolut NEXUS. Amoxicilin and ampicillin did not show good recovery in the evaluated phases and eluents. For tetracycline and cephalexin, the commercial phase Chrom P showed the best performance using methanol as solvent and a 1% acetic acid/methanol (60:40) mixture.

**Key words:** pharmaceuticals, SPE, HPLC-UV

## INTRODUÇÃO

A contaminação do meio hídrico por compostos orgânicos é um fenômeno que se torna cada vez mais importante devido principalmente ao aumento constante na produção e consumo de substâncias orgânicas sintéticas, que inevitavelmente, depois de utilizadas, acabam sendo lançadas no meio hídrico (Baird, 2002).

Atualmente, fármacos e seus metabólitos vêm chamando muita atenção, pois resistem à decomposição podendo causar sérios riscos à espécie humana, ao ecossistema e contribuir para o aumento da resistência a antibióticos (Colburn et al., 1992). Os fármacos podem passar para a rede de esgoto através de urina, fezes de humanos e animais ou pelo lançamento inadequado desses no meio ambiente.

Nos últimos anos, milhões de toneladas de fármacos têm sido produzidos, prescritos por médicos e consumidos tanto pelo homem como por animais. Quando um fármaco entra no organismo é transformado, total ou parcialmente, em outras substâncias. A biotransformação ou metabolismo dos fármacos dá lugar à formação de compostos mais solúveis em água que, não sendo quase absorvidos nos canais renais, podem ser excretados com facilidade. Os processos de biotransformação e de excreção são essenciais para que cesse a atividade biológica do fármaco e esse seja eliminado pelo organismo. As modificações químicas que surgem no processo metabólico são responsáveis pela perda total ou parcial da atividade dos fármacos. Assim, as substâncias que se formam denominam-se metabólitos e podendo não ter atividade farmacológica, ou serem ativos a partir de um fármaco inativo (que também podem ser denominados de pós-fármaco) (Cedric, 1985). Segundo Richardson e Bowron (1985), nas estações de tratamento de efluentes (ETEs) há três destinos possíveis para qualquer fármaco individual:

- pode ser biodegradável, ou seja, mineralizado a gás carbônico e água, como é o caso do ácido acetilsalicílico;
- pode passar por algum processo metabólico ou ser degradado parcialmente, como ocorre com as penicilinas;
- e, finalmente, pode ser persistente, como o clofibato que é um antilipêmico.

De um modo geral, os fármacos e seus metabólitos que resistem à decomposição, causam diversos riscos à saúde humana e à vida animal, ameaçando o ecossistema, aumentando a resistência a antibióticos (Mckeon, 1995; Miranda, 1998) e, entrando nos sistemas de esgoto, passando pela planta de tratamento de água e acabando em águas consumidas por humanos e animais (Mckeon, 1995).

A ocorrência de fármacos residuais no meio ambiente pode apresentar efeitos adversos em organismos aquáticos e terrestres. Pouco se sabe sobre o destino e o comportamento dessas substâncias no ambiente aquático, assim como não está claro quais organismos são afetados e em que grau (Jorgensen e Halling-Sorensen, 2000). De toda forma, os efeitos atravessam toda a hierarquia biológica, indo desde células e órgãos; passando por organismos, população e até mesmo ecossistema. De acordo com Jorgensen (2000) e Miranda (1998), alguns desses efeitos podem ser observados em concentrações na ordem de  $\text{ng L}^{-1}$  e já há indícios de que o desenvolvimento de resistência antibiótica seja ainda favorecido por essas baixas concentrações.

Fármacos compreendem uma grande família de compostos para fins terapêuticos. Alguns exemplos de medicamentos freqüentemente utilizados por pessoas e em animais são antibióticos, antidepressivos, analgésicos, hipoglicemiantes, quimioterápicos, anti-hipertensivos, hormônios e antiespasmódicos (Merck, 2001).

No presente trabalho, foram selecionados quatro fármacos do grupo dos antibióticos: amoxicilina, ampicilina, cefalexina e tetraciclina, em função da disponibilidade de seus padrões.

A análise direta desses fármacos, em baixos níveis de concentração, é praticamente inviável, seja pela complexidade da matriz, seja pelo limite de detecção das técnicas instrumentais disponíveis. Assim, faz-se necessário um pré-tratamento da amostra para eliminar, ao máximo, os interferentes e pré-concentrar os analitos para alcançar os limites de detecção desejados. Esse pré-tratamento consiste basicamente em três etapas: percolação do analito (traços), eliminação dos interferentes e concentração do analito presentes na matriz.

Nesse âmbito, a técnica de extração em fase sólida (SPE, do inglês: *solid-phase extraction*) é uma alternativa prática para pré-concentração de amostras ambientais. Basicamente, a SPE consiste em percolar uma amostra através de um adsorvente sólido (sob forma de cartucho ou disco), de forma que analitos e interferentes que têm afinidade pela fase sólida ficam retidos, enquanto os demais compostos passam sem serem retidos. Os analitos retidos são recuperados mediante eluição do cartucho ou do disco com um solvente adequado, em geral, aquele permitido para a técnica de análise instrumental posterior. A seletividade do processo depende da escolha adequada do adsorvente e do solvente utilizado para a eluição (Barceló e Hennion, 1997).

A SPE vem sendo cada vez mais aplicada como técnica seletiva de preparação de amostra. Os objetivos da SPE são: reduzir o nível de interferentes, minimizar o volume final de amostra a fim de maximizar a sensibilidade, fornecer a fração de analito em solvente compatível com as peculiaridades da técnica instrumental a vir a ser empregada, além de servir como filtro, removendo particulados da matriz. A técnica de SPE isola analitos e simplifica matrizes com base nos mesmos princípios da cromatografia líquida clássica. Tanto na SPE como na cromatografia a líquido, ocorrem processos de migração diferencial na qual compostos são retidos e eluídos à medida que atravessam um meio poroso, funcionalizado ou não, sob fluxo de uma fase móvel. Diferenças entre ambas residem no formato da coluna (comprimento e diâmetro interno), tamanho de partícula do material de empacotamento e taxas de fluxo (Majors, 1997).

A seletividade da SPE depende da escolha adequada do adsorvente e do solvente utilizado para a eluição. Observa-se uma crescente disponibilidade de adsorventes comerciais ou materiais pesquisados para extração (Renner, 1997; Aguiar, 1999).

Atualmente, a questão da poluição ambiental relacionada aos fármacos tem sido objeto de estudo em todo o mundo, uma vez que esses são classificados como poluentes emergentes. Infelizmente ainda não existe nenhuma legislação que trate os fármacos como poluentes. Sabe-se que as técnicas analíticas para quantificação de fármacos são bem estabelecidas e registradas nos órgãos governamentais, como, por exemplo, a ANVISA. As metodologias oficiais são utilizadas tanto para o controle da qualidade da matéria-prima como para o controle do produto que acaba no mercado (ANVISA, 2003). Também muitos métodos foram desenvolvidos e implementados para o controle de resíduos de fármacos em alimentos (Kaufmann, 1999), podendo-se destacar em especial a presença de antibióticos no leite (Abate, 1997).

No entanto, quantificações de fármacos em meio aquoso em nível de traços (visando a amostras aquosas ambientais) é uma área mais recente. Trabalhos nessa área têm sido desenvolvidos por Buser (1988), Desbrow (1988), Hirsch (1998), Hartig (1999), Stumpf (1999), Termes (1999), Johson (2000), Sacher (2001), Winkler (2001), Xiao (2001), Kolpin (2002), entre outros autores. Especificamente, com relação à quantificação dos antibióticos, objeto de estudo do presente trabalho, poucos trabalhos empregaram a SPE como meio de pré-concentração em meio aquoso.

A crescente preocupação com a presença de fármacos e seus metabólitos em meios aquáticos e seus possíveis impactos ambientais tem impulsionado a pesquisa na busca de métodos cada vez mais sensíveis, capazes de permitir a detecção desses e outros analitos em matrizes complexas. Nesse contexto, a SPE tem sido apontada como uma técnica potencial de pré-concentração. Nessa técnica, parte do sucesso reside na especificidade da natureza das fases sólidas frente aos analitos em questão.

O presente artigo tem como objetivo avaliar a potencialidade de pré-concentrar fármacos (amoxicilina, ampicilina, cefalexina e tetraciclina) em fases sólidas comerciais através de SPE e HPLC-UV.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material

Toda a vidraria e materiais comuns de laboratório foram lavados com água, detergente diluído e água deionizada. O material não volumétrico foi enxaguado com acetona comum e levado ao forno a 300°C por duas horas. O material foi embalado com papel laminado. Para a vidraria volumétrica o enxágüe foi com acetona comum, acetona grau pesticida, n-hexano grau pesticida e, após a evaporação, foi coberto com folha de alumínio.

Os reagentes utilizados foram: acetona grau pesticida (OmniSolv); hexano grau pesticida (OmniSolvâ); acetonitrila - grau HPLC - (Carlo Erba); metanol - grau HPLC - (Mallinckrodt, LabGuardâ); ácido fórmico p.a.- (A.C.S., Nuclear), ácido oxálico (Merck); difosfato de potássio (Merck); ácido acético (Merck).

Os padrões de cefalexina, tetraciclina, ampicilina e amoxicilina (laboratórios New Delli) foram preparados a partir de seus sais. Todas as soluções padrões e fases móveis foram preparadas com água ultrapura obtida com sistema Milli-Q (Purifications Parck), seguida por filtração com filtro 0,45 mm.

As fases comerciais empregadas para pré-concentração foram LC-18 (SUPELLEAN, 6 mL/500mg - sílica funcionalizada com octadecilsilano), adquiridos da SUPELCO, Supelclean™ ENVI™-Chrom P (6 mL/500 mg), constituídos de material polimérico altamente reticulado), adquirido da Supelco, Absolut NEXUS (1 mL/30 mg - copolímero à base de estireno-divinilbenzeno) fornecido pela VARIAN. Para cada lote de cartuchos foram realizados testes em branco com um dos cartuchos. Para desgaseificação das fases móveis nas análises por HPLC foi empregado hélio grau 4,5 de pureza. Para redução de volumes das amostras foi utilizado nitrogênio grau 4,5 de pureza.

### Preparação dos Padrões

Para a preparação da solução padrão de cefalexina foi pesado cerca de 50 mg do sal em balança analítica com precisão de 0,0001g em um recipiente de vidro (barquinha) especialmente confeccionado para esse fim. O sal do fármaco foi então transferido para um balão volumétrico de 500 mL, adicionou-se 5 mL de metanol para dissolvê-lo e, após o volume foi ajustado com água ultrapura. Tetraciclina, amoxicilina e ampicilina foram dissolvidas em 500 mL (utilizando-se a mesmo procedimento de pesagem que o outro fármaco) de água ultrapura, resultando em

soluções-padrão de 100 mg L<sup>-1</sup>. Para a curva analítica foram preparadas cinco soluções (a partir de 2.000 mg L<sup>-1</sup>): 50, 100, 150, 200, 250 mg L<sup>-1</sup> em água ultrapura. Todas as soluções foram preparadas diariamente. O volume de injeção foi 50 mL. Também foi preparada uma curva analítica com padrão misto de amoxicilina e ampicilina com as mesmas soluções citadas anteriormente.

### **Fase móvel**

Diferentes composições de fases móveis foram avaliadas, todas em modo isocrático, para separação dos fármacos.

### **Instrumento**

Cromatógrafo a líquido, Shimadzu LC-10 A, equipado com detector de ultravioleta (UV), munido de pré-coluna com recheio Hyperprep C18 sílica, 30mm (Supelco) e coluna analítica Nucleosil C18, (5 mm x 250 mm ´ 4,6 mm) (Supelco).

### **Procedimentos para extração em fase sólida**

A partir da solução padrão 10 mg L<sup>-1</sup> foram preparadas diluições de 5 e 0,50 mg L<sup>-1</sup> para experimentos de retenção em fases comerciais.

### Efeito do volume da amostra pré-concentrada sobre a recuperação

Para quantificação do efeito do volume da amostra pré-concentrada sobre a recuperação 50 e 250 mL de soluções contendo tetraciclina, cefalexina, amoxicilina e ampicilina foram preparadas com concentrações de 5 e 0,5 mg L<sup>-1</sup> respectivamente.

### Fases comerciais

#### Condicionamento

- a) LC-18: 2 mL de metanol, seguido de 5 mL de água ultrapura
- b) Envi Chrom P: 5 mL de água ultrapura
- c) Nexus: não necessita condicionamento

#### Procedimento de extração

\* Para o volume de 50 mL:

- Amostras: Solução aquosa de tetraciclina, cefalexina, amoxicilina e ampicilina
- Concentração inicial: 5 mg L<sup>-1</sup>
- Vazão: 10 mL min<sup>-1</sup>

Envi Chrom P e LC-18

- Eluição: 5 mL do solvente adequado

- Volume final: 1 mL com fluxo de nitrogênio
- Concentração teórica final: 250 mg L<sup>-1</sup> (considerando-se 100% de recuperação)

#### Nexus

- Eluição: 1mL do solvente adequado
- Volume final: 1 mL
- Concentração teórica final: 250 mg L<sup>-1</sup> (considerando-se 100% de recuperação)

\* Para volume de 250 mL:

- Solução: Solução aquosa de amoxicilina, ampicilina, tetraciclina e cefalexina
- Concentração inicial: 0,5 ng mL<sup>-1</sup>
- Vazão: 10 mL min<sup>-1</sup>

#### Chrom P e C18

- Eluição: 5 mL do solvente adequado
- Volume final: 1 mL com fluxo de nitrogênio
- Concentração teórica final: 125 mg L<sup>-1</sup> (considerando-se 100% de recuperação)

#### Nexus

- Eluição: 1mL do solvente adequado
- Volume final: 1 mL
- Concentração teórica final: 125 mg L<sup>-1</sup> (considerando-se 100% de recuperação)
- Todas as amostras nos dois volumes foram analisadas por HPLC-UV.

### Recuperação

Recuperação é a medida da eficiência do procedimento de extração, a partir da matriz. A recuperação geralmente é dependente da concentração, por isso deve ser avaliada na faixa de concentração esperada para a amostra. A recuperação (R) foi calculada pela equação:

$$R(\%) = \frac{\text{massa obtida}}{\text{massa real}} \times 100$$

onde, R(%) = percentual de recuperação da amostra fortificada

Os valores de massa obtidos após a extração nas fases foram chamados de “valor obtido”, enquanto os valores de massa real relativo à concentração da solução padrão foram chamados de “valor real”.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Avaliação e seleção da fase móvel

A seleção das fases móveis em estudo envolveu primeiramente uma pesquisa bibliográfica em artigos de resíduos de fármacos em sangue e na farmacopéia (Farmacopéia, 2001). Com base nesses dados, algumas fases móveis foram avaliadas de acordo com a literatura, enquanto outras foram modificadas para esse trabalho. A tabela 1 apresenta as fases móveis avaliadas para cada um dos fármacos em estudo.

Tabela 1 - Composição das fases móveis empregadas para a separação dos fármacos em estudo.

<b>Tetraciclina <math>\Lambda = 350 \text{ nm}</math></b>	
<b>Fase Móvel</b>	<b>Proporção</b>
1) Metanol / Acetonitrila / Ácido Oxálico 0,01 mol L <sup>-1</sup>	20:30:50
2) Metanol/ Ácido Oxálico 0,01 mol L <sup>-1</sup>	50:50
3) Metanol / Acetonitrila/ Difosfato de Potássio 0,02 mol L <sup>-1</sup>	20:30:50
4) Metanol / Difosfato de Potássio 0,02 mol L <sup>-1</sup>	50:50
5) Acetonitrila / Água ultrapura	30:70
6) Ácido Acético 0,1 % / Acetonitrila	60:40
7) Ácido Acético 0,095% / Acetonitrila	60:40
8) Metanol / Acetonitrila / Ácido Oxálico 0,01 mol L <sup>-1</sup>	20:35:45
9) Ácido Oxálico 0,01 Mol L <sup>-1</sup> / Acetonitrila / Metanol	73:17:10
<b>Cefalexina <math>\Lambda = 254 \text{ nm}</math></b>	
<b>Fase Móvel</b>	<b>Proporção</b>
1) Metanol / Difosfato de Potássio 0,1 mol L <sup>-1</sup>	30:70
2) Ácido Acético 0,1% / Acetonitrila	60:40
3) Acetonitrila / Ácido Acético 1%	70:30
4) Ácido Acético Glacial / Metanol	70:30
5) Metanol / Acetonitrila / Ácido Oxálico 0,01 mol L <sup>-1</sup>	20:35:45
6) Ácido Acético 1,25% / Metanol	70:30
7) Ácido Acético 1% / Acetonitrila	60:40
8) Acetonitrila / Ácido Acético Glacial	70:30
<b>Amoxicilina <math>\Lambda = 234 \text{ nm}</math></b>	
<b>Fase Móvel</b>	<b>Proporção</b>
1) Ácido Acético 0,1 Mol L <sup>-1</sup> / Acetonitrila	60:40
2) Metanol / Ácido Acético 1,25%	30:70
3) Água ultrapura / Acetonitrila/Difosfato de Potássio 1 mol L <sup>-1</sup> / Ácido Acético Glacial	909:80:10:1
4) Água ultrapura / Acetonitrila /Difosfato de Potássio 1 mol L <sup>-1</sup>	910:80:10
<b>Ampicilina <math>\Lambda = 234 \text{ nm}</math></b>	
<b>Fase Móvel</b>	<b>Proporção</b>
1) Ácido Acético 0,1 mol L <sup>-1</sup> /Acetonitrila	60:40
2) Metanol/Ácido Acético 1,25%	30:70
3) Água ultrapura/ Acetonitrila/Difosfato de potássio 1 mol L <sup>-1</sup> / Ácido Acético 1 Mol L <sup>-1</sup>	909:80:10:1
4) Água ultrapura/ Acetonitrila/Difosfato de Potássio 1 mol L <sup>-1</sup>	910:80:10



Com base nas condições descritas na tabela 1, foram obtidos os seguintes resultados:

#### Tetraciclina:

As fases móveis ácido oxálico (0,01 mol L<sup>-1</sup>) / acetonitrila / metanol (73:17:10); metanol / acetonitrila / difosfato de potássio 0,01 mol L<sup>-1</sup> (20:30:50) e metanol / difosfato de potássio 0,02 mol L<sup>-1</sup> (50:50) apresentaram picos bem definidos, isentos de interferência. As demais fases avaliadas não apresentaram picos no tempo de retenção do padrão ou os picos com mesmo tempo de retenção do padrão apresentaram ombros ou caudas.

#### Cefalexina:

As fases móveis: ácido acético 1,25% / metanol (70:30) e ácido acético 1% / acetonitrila (60:40) apresentaram picos bem definidos nos tempos de retenção da cefalexina. Nas outras fases móveis não foram identificados picos referentes ao padrão.

#### Amoxicilina e Ampicilina:

Ampicilina e amoxicilina apresentaram absorção no mesmo comprimento de onda e semelhante performance cromatográfica para as fases móveis testadas. Por essas razões, esses dois fármacos foram avaliados nas mesmas fases móveis.

A fase móvel constituída por água ultrapura / acetonitrila / difosfato de potássio 1 mol L<sup>-1</sup>/ ácido acético 1 mol L<sup>-1</sup> (909:80:10:1) (indicada pela Farmacopéia Americana para testes cromatográficos com ampicilina) e uma modificação dessa fase para água ultrapura / acetonitrila / difosfato de potássio 1 mol L<sup>-1</sup> (910:80:10) foram avaliadas, apresentando bons resultados para esses dois fármacos. A fase móvel constituída de metanol / difosfato de potássio (30:70) apresentou picos pouco definidos (2 ou 3 ombros) e as outras fases em estudo não apresentaram pico referente ao padrão.

O detector UV utilizado permite somente a seleção de um comprimento de onda em cada corrida cromatográfica. Para otimização do procedimento foi feito um padrão duplo (amoxicilina e ampicilina) com os fármacos que apresentaram mesmo comprimento de onda. Na análise cromatográfica desses fármacos, as áreas dos picos referentes aos fármacos não reproduziam, diminuindo a cada reinjeção, sugerindo uma interação entre esses, inclusive ocorreu também a detecção de um novo pico ( $t_r = 19,39$  min) que não pôde ser identificado porque o instrumento de trabalho não dispunha de detector de massas.

Para testes de retenção, diferentes fases estacionárias ou diferentes fases móveis podem ser avaliadas. Nesse trabalho, foi escolhida a opção de diferentes fases móveis por ser economicamente mais viável.

Para todos os fármacos foram avaliadas diversas vazões da fase móvel de 0,8 a 1,2 mL min<sup>-1</sup> (considerando-se a melhor distribuição gaussiana do pico). A tabela 2 apresenta o resultado da avaliação da fase móvel, vazão, tempo de retenção ( $t_r$ ) e RSD para cada fármaco, para  $n=3$  (injeções).

Tabela 2 - Resultado da avaliação da fase móvel, vazão, tempo de retenção ( $t_r$ ) e RSD para cada fármaco, para  $n=3$  (injeções).

Fase Móvel	Vazão ( $\text{mL min}^{-1}$ )	$t_r$ (min)	RSD (%)
<b>Tetraciclina</b>			
Ácido Oxálico 0,01 mol L <sup>-1</sup> / Acetonitrila / Metanol (73:17:10)	1,0	8,8	0,4
<b>Cefalexina</b>			
Ácido Acético 1,25% / Metanol (70:30)	0,9	11,7	0,8
<b>Amoxicilina</b>			
Água Ultrapura / Acetonitrila / Difosfato de Potássio 1 mol L <sup>-1</sup> (910:80:10)	1,2	4,9	0,1
<b>Ampicilina</b>			
Água Ultrapura / Acetonitrila / Difosfato de Potássio 1 mol L (910:80:10)	1,2	14,4	0,2

### Extração em fase sólida

Para o estudo de extração em fase sólida foram avaliadas três fases comerciais disponíveis no mercado (LC-18, Envi Chrom P e NEXUS).

Dois volumes (50 e 250 mL) foram utilizados para avaliar o efeito do volume da amostra sobre a recuperação.

O volume que apresentou melhor retenção para os fármacos foi 50 mL. Para o volume de 250 mL observou-se que os analitos eram arrastados pelo próprio solvente da amostra, no caso, a água.

Cefalexina e tetraciclina apresentaram bons resultados nos testes de retenção dos cartuchos e recuperação dos analitos em estudo, entretanto ampicilina e amoxicilina não foram retidas nesses cartuchos.

De acordo com a literatura, para validação de procedimentos cromatográficos, as recuperações devem estar entre 85 e 115% (Lanças, 2004). Para RSD são aceitos valores de até 15% para analitos nesse nível de concentração (Causon, 1997). Na seqüência, será apresentado um estudo detalhado de extração e pré-concentração das fases comerciais para os fármacos: tetraciclina, cefalexina, amoxicilina e ampicilina, respectivamente.

#### Tetraciclina:

A tabela 3 apresenta o resultado das recuperações de tetraciclina para os experimentos de SPE, em três fases comerciais (C-18, Envi Chrom P e NEXUS), eluídas com solventes e/ou mistura de solventes.

Tabela 3: Recuperação da tetraciclina para os experimentos de SPE, em três cartuchos comerciais (C - 18, Envi Chrom P e NEXUS), eluídas com solventes e/ou mistura de solventes (n=3).

Fase	Solventes (v/v)	Recuperação (%)	RSD (%)	V (mL) eluição
Chrom P	0,01% de Ácido Acético/Acetonitrila, 60:40	31,5	9,0	5
Chrom P	1,25% de Ácido Acético/Metanol, 60:40	54,9	9,1	5
<b>Chrom P</b>	<b>Metanol</b>	<b>81,0</b>	<b>4,0</b>	<b>5</b>
Chrom P	1% de Ácido Acético/Acetonitrila, 60:40	nd	-	5
LC-18	0,01% de Ácido Acético/Acetonitrila, 60:40	28,9	9,9	5
LC-18	1,25% de Ácido Acético/Metanol, 60:40	nd	-	5
<b>LC-18</b>	<b>Metanol</b>	<b>62,9</b>	<b>8,4</b>	<b>5</b>
LC-18	0,1% de Ácido Acético/Acetonitrila, 60:40	nd	-	5
Nexus	0,01% de Ácido Acético/Acetonitrila, 60:40 +	52,9	11,4	1
	1,25% de Ácido Acético/Metanol, 60:40			
<b>Nexus</b>	<b>1,25% de Ácido Acético/Metanol, 60:40</b> +	<b>58,3</b>	<b>12,0</b>	<b>1</b>
	<b>1,25% de Ácido Acético/Metanol, 60:40</b>			
Nexus	Metanol	24,1	6,9	1
Nexus	1 % de Ácido acético/Acetonitrila, 60:40	23,2	23,2	1

nd: não detectado

Para os ensaios de retenção da tetraciclina, a fase Chrom P apresentou melhor recuperação com o solvente metanol (81,0 %, RSD 4,0%). Valores Similares foram encontrados na literatura: (84-103%) (Hidalgo, 1997); (62%-100%) (Sabik, 1998), para recuperação de poluentes em nível de traços.

#### Cefalexina:

A tabela 4 apresenta a recuperação da Cefalexina para os experimentos de SPE, em três fases comerciais (C-18, Envi Chrom P e Nexus), eluídos com solventes e/ou mistura de solventes.

Tabela 4: Recuperação da Cefalexina para os experimentos de SPE, em três cartuchos comerciais (C-18, Envi Chrom P e Nexus), eluídos com solventes e/ou mistura de solventes, (n=3).

Fase	Solventes (v/v)	Recuperação (%)	RSD (%)	V (mL) eluição
Chrom P	0,1% de Ácido Acético/Acetonitrila, 60:40	54,0	9,8	5
Chrom P	1,25% de Ácido Acético/Metanol, 60:40	71,7	7,5	5
<b>Chrom P</b>	<b>1% de Ácido Acético/Acetonitrila, 60:40</b>	<b>95,6</b>	<b>2,4</b>	<b>5</b>
LC-18	0,01% de Ácido Acético/Acetonitrila, 60:40	nd	-	5
LC-18	0,1% de Ácido Acético/Acetonitrila, 60:40	nd	-	5
<b>LC-18</b>	<b>1,25% de Ácido Acético/Metanol, 60:40</b>	<b>64,3</b>	<b>7,2</b>	<b>5</b>
Nexus	Metanol	nd	-	1
Nexus	1,25% de Ácido Acético/Metanol, 60:40	nd	-	1

nd: não detectado

Para a cefalexina, os cartuchos Nexus não apresentaram boa retenção pois, no descarte, foi constatada a presença do fármaco, indicando que a retenção não foi efetiva. A melhor recuperação foi atribuída à fase Chrom P, utilizando-se a mistura de solventes de ácido acético 1% / Acetonitrila 60:40 como eluente (95,6 %, RSD =2,4 %).

#### Amoxicilina e Ampicilina:

Os testes de recuperação para amoxicilina e ampicilina, utilizando-se cartuchos Chrom P, LC-18 e Nexus, apresentaram baixo percentual de recuperação inferior. Na análise do descarte desses fármacos, foi detectada a presença de até 95% de amoxicilina e ampicilina. Com base nesses resultados pôde ser concluído que amoxicilina e ampicilina não são adsorvidas nos cartuchos citados.

## CONCLUSÕES

A presença de fármacos em águas, solos e em outros ambientes é uma realidade atual e necessita de regulamentação e monitoramento ambiental.

A preocupação dos químicos analíticos com contaminantes presentes em baixas concentrações no ambiente e o grande avanço das técnicas instrumentais alavancaram o estudo de analitos em nível de traços (entre esses fármacos) nos últimos anos.

Aliadas ao avanço das técnicas instrumentais as metodologias de extração e pré-concentração foram aprimoradas, sendo as extrações em fase sólida (SPE) atualmente preferidas em relação às extrações líquido-líquido. Uma das grandes vantagens da SPE em relação às extrações líquidas é a minimização na geração de resíduos. Uma desvantagem da SPE são os elevados preços das fases comerciais utilizadas na retenção do analito. Felizmente atualmente já existem fases sintetizadas em laboratórios de pesquisa com preços mais acessíveis.

Para estudo de fármacos, nesse trabalho foi utilizada a técnica de HPLC-UV. Diversas fases móveis foram avaliadas. As fases móveis: ácido oxálico 0,01 mol L<sup>-1</sup>/ acetonitrila / metanol (73:17:10), ácido acético 1,25% / metanol (70:30) e água ultrapura / acetonitrila / difosfato de potássio 1 mol L<sup>-1</sup> (910:80:10) foram selecionadas por apresentarem melhor performance cromatográfica.

As avaliações da extração em fase sólida demonstraram que cefalexina e tetraciclina apresentaram boa retenção nas fases comerciais Chrom P e boa eluição com a mistura de solventes 1% de ácido acético e metanol (60:40) e o solvente metanol, respectivamente. Ampicilina e amoxicilina não foram retidas nessas fases.

O procedimento analítico para quantificação de fármacos por HPLC-UV ficou estabelecido e poderá ser utilizado para quantificação de fármacos em amostras aquosas.

## REFERÊNCIAS

- ABETE, M. C.; GENTA, E.; SQUADRONE, S. 1997. Tetracyclines in milk: determination by HPLC/DAD. **Industrie Alimentari**, 36(360):753.
- BARCELÓ, D.; HENNION, M. C. 1997. **Trace Determination of Pesticides and Their Degradation Products in Water**. Amsterdam: Elsevier, 542 p.
- AGUILAR, C. et al. 1999. Monitoring of pesticides in river water based on samples previously stored in polymeric cartridges followed by on-line solid-phase extraction liquid chromatography diode array detection and confirmation by atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Analytical Chimica Acta**, 386(3): 237-248.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Material informativo. Disponível em: <[http:// www.anvisa.org.br](http://www.anvisa.org.br)>. Acesso em: 18 maio 2004.
- BAIRD, C. 2002. **Química Ambiental**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 622 p.
- BUSER, H.,R.; POIGER, T.; MULLER, M. D. 1998. Occurrence and fate of the pharmaceutical drug diclofenac in surface waters: Rapid photodegradation in a lake. **Environmental science & Technology**, 32(22):3449-3456.
- CAUSON, R. 1997. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis - Viewpoint and discussion. **Journal of Chromatography B**, 689(1):175-180.
- DESBROW, C. et al. 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. **Environmental science & Technology**, 32(11):1549-1558.
- FARMACOPÉIA. Material informativo. Disponível em: <<http://www.farmacopeia.org.br/>>. Acesso em: 23 maio 2001.
- FERRER, I.; HENNION, M. C.; BARCELO, D. 1997. Immunosorbents coupled on line with liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for the part per trillion level determination of pesticides in sediments and natural waters using low preconcentration volumes. **Analytical Chemistry**, 69(22):4508-4514.

FREITAS, L. G. et al. 2004. Quantification of the new triketone herbicides, sulcotrione and mesotrione, and other important herbicides and metabolites, at the ng/l level in surface waters using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, **1028**(2):277-286.

LANÇAS, M.F. 2004. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise**, 3 ed. São Paulo: RiMa, 45p.

HARTIG, C.; STORM, T.; JEKEL, M. 1999. Detection and identification of sulphonamide drugs in municipal waste water by liquid chromatography coupled with electrospray ionisation tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, **854**(1-2):163-173.

HIDALGO, C.; SANCHO, J. V.; HERNANDEZ, F. 1997. Trace determination of triazine herbicides by means of coupled-column liquid chromatography and large volume injection. **Analytica Chimica Acta**, **338**(3):223-229.

HIRSCH, R. et al. 1998. Determination of antibiotics in different water compartments via liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, **815**(2):213-223.

JOHNSON, A. C.; BELFROID, A.; DI CORCIA, A. 2000. Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. **Science of the Total Environment**, **256**(2-3):163-173.

JORGENSEN, S. E.; HALLING-SORENSEN, B. 2000. Drugs in the environment. **Chemosphere**, **40**(7):691-699.

KAUFMANN, A. 1999. Bestimmung von Rückständen von Tetracyclinen in Lebensmitteln. **Mitt. Lebensm**, **90**:167-176.

KOLPIN, D. W. et al. 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: A national reconnaissance. **Environmental science & Technology**, **36**(6):1202-1211.

MAJORS, R. E. 1997. **Sample preparation in Analytical Chemistry**: handbook of instrumental techniques for Analytical Chemistry. New Jersey: Prentice Hall, 995 p.

MCKEON, D. M.; CALABRESE, J. P.; BLOSSONETE, G. K. 1995. Antibiotic-resistant gram-negative bacteria in rural groundwater supplies. **Water Research**, **29**(8):1902-1908.

MIRANDA, C. D.; CASTILLO, G. 1998. Resistance to antibiotic and heavy metals of motile aeromonads from Chilean freshwater. **Science of the total environment**, **224**(1-3):167-176.

MERCK. Material Informativo. Disponível em: <<http://merckhomeedition.com/home>>. Acesso em: 20 abr. 2001.

MMA. Resoluções. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama>>. Acesso em: 13 maio 2005.

NOGUEIRA, J. M. F.; SANDRA, T.; SANDRA, P. 2004. Multiresidue screening of neutral pesticides in water samples by high performance liquid chromatography - electrospray mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, **505**(2):209-215.

RENNER, T.; BAUMGARTEN, D.; UNGER, K. K. 1997. Analysis of organic pollutants in water at trace levels using fully automated solid-phase extraction coupled to high-performance liquid chromatography. **Chromatographia**, **45**:199-205.

RICHARDSON, M. L.; BOWRON, J. M. 1985. The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment. **Journal of pharmacy and pharmacology**, **37**(1):1-12.

SABIK, H.; JEANNOT, R. 1998. Determination of organonitrogen pesticides in large volumes of surface water by liquid-liquid and solid-phase extraction using gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection and liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, **818**(2):197-207.

SACHER, F. et al. 2001. Pharmaceuticals in groundwaters - Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Wurttemberg, Germany. **Journal of Chromatography A**, **938**(1-2):199-210.

STUMPF, M. et al. 1999. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Science of the total environment**, **225**(1-2):135-141.

TAMMY, J. L.; GERLACH, L.; COOTER, E. J. 2000. The power of analytical methods for measuring suspected endocrine disrupting compounds: a pilot field study. **Trends in Analytical Chemistry**, **19**(5):286-291.

TERNES, T. A. et al. 1999. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. **Science of the total environment**, **225**(1-2):81-90.

WINKLER, M.; LAWRENCE, J. R.; NEU, T. R. 2001. Selective degradation of ibuprofen and clofibric acid in two model river biofilm systems. **Water Research**, **35**(13):3197-3205.

XIAO, X. Y.; MCCALLEY, D. V.; MC EVOY, J. 2001. Analysis of estrogens in river water and effluents using solid-phase extraction and gas chromatography-negative chemical ionisation mass spectrometry of the pentafluorobenzoyl derivatives. **Journal of Chromatography A**, **923**(1-2):195-204.