

## **AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA PARA ANÁLISE DE CIPROFLOXACINO EM ÁGUAS SUPERFICIAIS**

Ana Paula T. N. Ferreira<sup>1</sup>; Madson M. Nascimento<sup>2</sup>; Jeancarlo P. dos Anjos<sup>3</sup>; Edith Cristina L. Cazedey<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal da Bahia (UFBA), 40170-115, Salvador, BA, Brasil; <sup>2</sup>Centro Universitário SENAI CIMATEC, 41650-010, Salvador, BA, Brasil; <sup>3</sup>Universidade Federal do ABC (UFABC), 09210-580, Santo André, SP, Brasil; <sup>4</sup>Departamento do Medicamento, Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia (UFBA), 40170-115, Salvador, BA, Brasil.

**Palavras-Chave:** Contaminante emergente, planejamento fatorial fracionário, otimização multivariada.

### **Introdução**

Com a evolução tecnológica, o surgimento de novas moléculas e o desenvolvimento industrial, novas tecnologias estão sendo aplicadas para avaliar o controle de qualidade hídrico, o que permite a avaliação criteriosa de agentes que anteriormente não eram analisados ou sequer detectados gerando uma falsa sensação de proteção. A ponto que, atualmente, diversas moléculas e compostos estão sendo estudados para avaliar a sua ecotoxicidade, potencial de bioacumulação e concentração presente no meio ambiente como resultante de ações antrópicas (BORGES et al., 2016; MONTAGNER; VIDAL; ACAYABA, 2017). A esses compostos foi dado o nome de Contaminantes Emergentes (CEs).

Estima-se que os CEs sejam em torno de 3 milhões de moléculas, incluindo produtos de higiene pessoal, desinfetantes, surfactantes, hormônios, pesticidas agrícolas, drogas ilícitas, produtos de degradação, subprodutos de desinfecção, aditivos da gasolina, desreguladores endócrinos, micro e nanoplásticos, fármacos e outros (ASSIS et al., 2020; BORGES et al., 2016; LIMA et al., 2017; MONTAGNER; VIDAL; ACAYABA, 2017). Com foco na avaliação de fármacos como contaminantes emergentes, existe um destaque para os antibióticos devido ao potencial de provocar o desenvolvimento de resistência bacteriana (; EUROPEAN COMMISSION, 2018).

O ciprofloxacino (CIP) é um dos antibacterianos orais mais consumidos no mundo, segundo o relatório GLASS (WHO, 2022). Esse fármaco foi caracterizado como agente genotóxico e, devido a sua baixa biodegradabilidade, pesquisas estão sendo desenvolvidas em diversos compartimentos ambientais, principalmente nas águas residuais e superficiais, a fim de determinar os riscos e possíveis impactos que o CIP pode causar quando disponível no meio ambiente. (AL-AHMAD, A.; DASCHNER, F. D.; KUMMERER, 1999; EUROPEAN COMMISSION, 2018).

Análises realizadas em efluentes brutos municipais encontraram 1900 ng L<sup>-1</sup>, 3035 ng L<sup>-1</sup> e 3496 ng L<sup>-1</sup> de CIP na Suécia, Vietnã e Cingapura, respectivamente. No Vietnã, a concentração medida no efluente conferiu a essa região um Quociente de Risco (RQ<sub>ARM</sub>) de 151,8, indicando uma elevada susceptibilidade ao desenvolvimento de resistência bacteriana. Para o esgoto tratado, foi encontrada a concentração de 260 ng L<sup>-1</sup>, nos Estados Unidos, e 591 ng L<sup>-1</sup>, na Grécia. (SAHLIN; LARSSON; ÅGERSTRAND, 2018; TRAN et al., 2019).

Frente a dificuldade de remoção dos antibióticos pelos tratamentos convencionais das estações de tratamento, o resíduo remanescente do CIP no efluente tratado desemboca nas águas superficiais e a concentração é ainda maior nas regiões onde não há tratamento dos efluentes

(ARSAND et al., 2020; MAHMOOD; AL-HAIDERI; HASSAN, 2019; SARAFRAZ et al., 2020).

Estudo realizado por WATKINSON *et al.* (2009), em bacia hidrográfica a sudeste de Queensland, na Austrália, detectou 1300 ng L<sup>-1</sup> de CIP (WATKINSON et al., 2009). Concentrações de 2950 ng L<sup>-1</sup> e 2745 ng L<sup>-1</sup> foram detectadas em rios da França e da Polônia respectivamente (FEITOSA-FELIZZOLA; CHIRON, 2009; WAGIL et al., 2014).

Para essas determinações faz-se necessário a aplicação de técnicas para preparação da amostra que favoreça a separação e quantificação do composto de interesse, sendo essa etapa um fator crítico para a precisão do ensaio e representa grande parte do tempo despendido para o processo de análise (BADAWY et al., 2022).

Uma vez que este analito encontra-se em baixas concentrações em amostras ambientais de água, a Extração em Fase Sólida (SPE) é uma técnica amplamente utilizada na etapa de extração do CIP, a fim de concentrar o analito, minimizar os efeitos de matriz ou isolar a matriz de outros componentes que sejam interferentes para o que se propõe (ANDRADE-EIROA et al., 2016; BADAWY et al., 2022; JARDIM, 2010; LANÇAS, 2009).

Nesse contexto, esse estudo tem o propósito de avaliar os parâmetros da etapa de extração de ciprofloxacino para a análise deste contaminante emergente em amostras de águas superficiais, empregando a técnica de extração em fase sólida (SPE), seguida da análise por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fotodiodos (HPLC-PDA).

## Material e Métodos

Foram preparadas soluções padrão 10 µg L<sup>-1</sup> utilizando a Substância Química de Referência (SQR) do ciprofloxacino da marca Sigma-Aldrich®, solubilizada com água ultrapura, ajustada em pH 2,3 com ácido fosfórico, utilizando o pHmetro Hanna Instrument 902 Automatic Titrator. A extração em fase sólida foi executada utilizando o cartucho HLB 6cc, Oasis® aplicando como condicionamento 5 mL de metanol e 5 mL de água ultrapura.

Foi executado um planejamento fatorial fracionário de resolução IV, no qual foram avaliados os parâmetros volume da amostra (100 mL a 500 mL), pH da amostra (2 a 6), tipo de solvente (metanol ou etanol) e volume de solvente eluente (4 mL a 8 mL). O eluato foi seco utilizando centrífuga à vácuo RVC 2-18 CDplus, Christ, a 30°C.

Os extratos foram analisados por meio de método cromatográfico usando HPLC-PDA, com gradiente de eluição da fase móvel, utilizando os solventes H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1% (v/v) (solvente A) e etanol grau HPLC (solvente B), com tempo total de corrida de 10 minutos. Foi empregada uma coluna Zorbax Eclipse Plus C18 Agilent® 5 µm, 250 x 4,6 mm, comprimento de onda 278 nm, fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, temperatura do forno de coluna 30°C e volume de injeção de 20 µL.

## Resultados e Discussão

Na tabela 1 estão descritos os valores reais dos fatores avaliados no planejamento fatorial fracionário, e os resultados obtidos através da área do pico cromatográfico do ciprofloxacino.

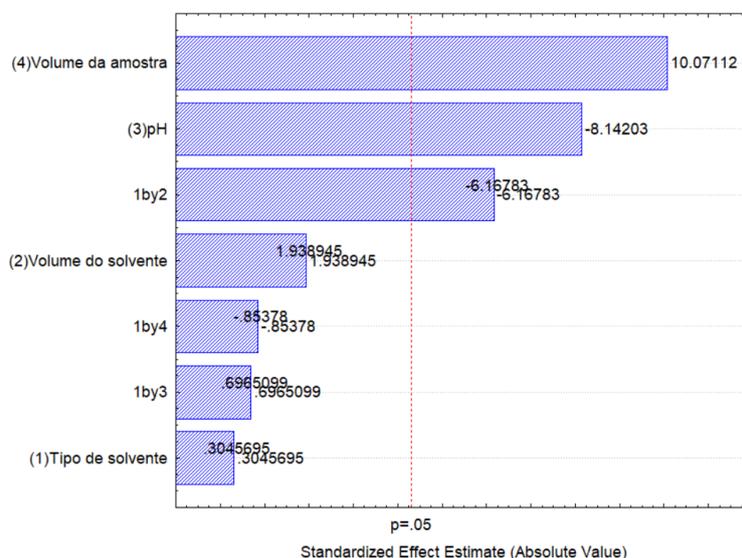
**Tabela 1: Dados do planejamento fatorial fracionário para SPE do ciprofloxacino**

Ensaio	Solventes	Volume do solvente	pH	Volume da amostra	Resposta Analítica (Área)
1	MeOH	4,00000	2,00000	100,00000	83664
2	EtOH	4,00000	2,00000	500,00000	638313
3	MeOH	8,00000	2,00000	500,00000	749777
4	EtOH	8,00000	2,00000	100,00000	167692
5	MeOH	4,00000	6,00000	500,00000	156687
6	EtOH	4,00000	6,00000	100,00000	55109
7	MeOH	8,00000	6,00000	100,00000	58052
8	EtOH	8,00000	6,00000	500,00000	229706
9 (C)	MeOH/EtOH 1:1	6,00000	4,00000	300,00000	292781
10 (C)	MeOH/EtOH 1:1	6,00000	4,00000	300,00000	375324
11 (C)	MeOH/EtOH 1:1	6,00000	4,00000	300,00000	381382

Aplicando a ANOVA ( $p < 0,05$ ) para avaliar os parâmetros do modelo linear ajustado, foi possível verificar que três dos fatores estudados apresentaram efeitos significativos na resposta analítica (área da banda cromatográfica). Eles foram pH, volume da amostra e a interação entre o tipo de solvente e o volume de solvente. Além disso, constatou-se que o solvente que apresentou melhores resultados de extração para o CIP foi o etanol, uma vez que foram obtidas as maiores respostas analíticas quando este solvente foi utilizado.

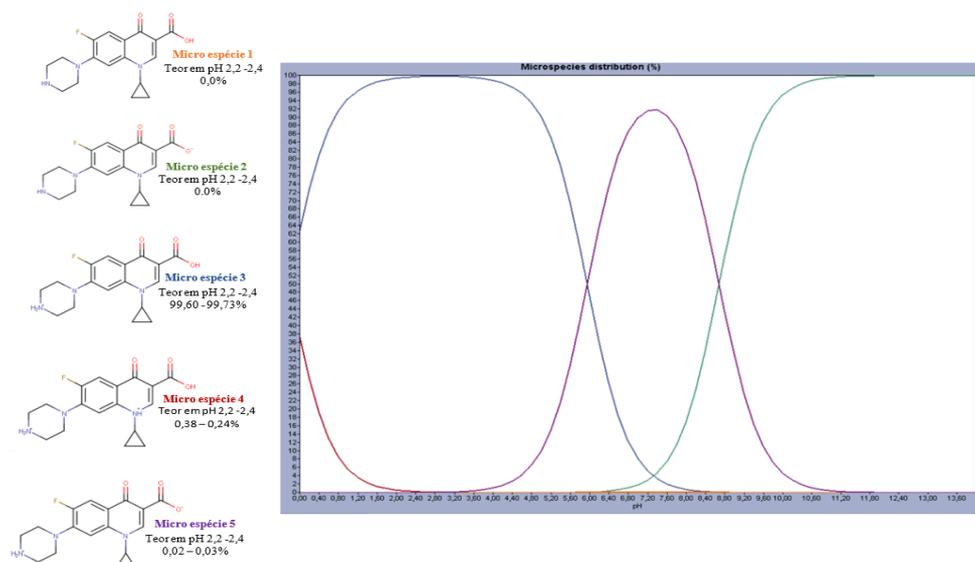
O gráfico de Pareto de efeitos padronizados mostra os fatores e a magnitude do efeito na resposta (Figura 1), indicando a influência das três variáveis citadas anteriormente.

**Figura 1: Gráfico de Pareto dos parâmetros avaliados na SPE do ciprofloxacino**



O fator “volume da amostra” apresentou um pronunciado efeito positivo na resposta, indicando que a resposta aumenta quando o volume da amostra é estudado no nível superior do planejamento. Em contrapartida, o fator “pH” apresentou um forte efeito negativo, sugerindo que a resposta aumenta quando o pH é estudado no nível inferior do planejamento. Esse resultado corrobora com o fato do ciprofloxacino ter um comportamento zwitteriônico (LI *et al.*, 2014) e em pH ácido apresenta aumento da microespécie 3 (Figura 2), intensificando o seu caráter polar, o que favorece a interação com o solvente de extração.

**Figura 2: Formação de Micro espécies de ciprofloxacino de acordo com pH do meio.**

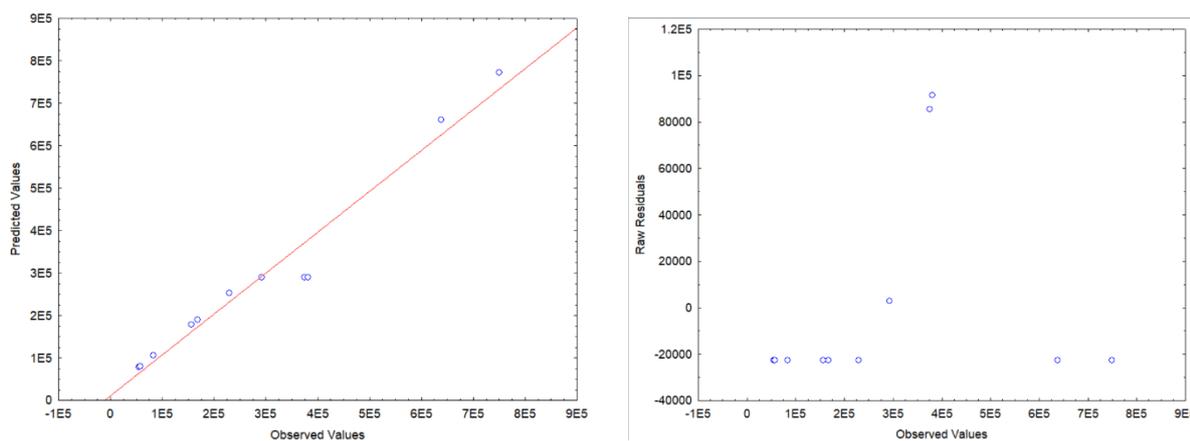


Fonte: Software MarvinSketch 23.7

Embora o tipo e o volume do solvente de eluição não apresentasse significância quando esses fatores foram estudados isolados, a interação entre eles (1 by 2) mostrou-se significativa, com efeito negativo na resposta analítica.

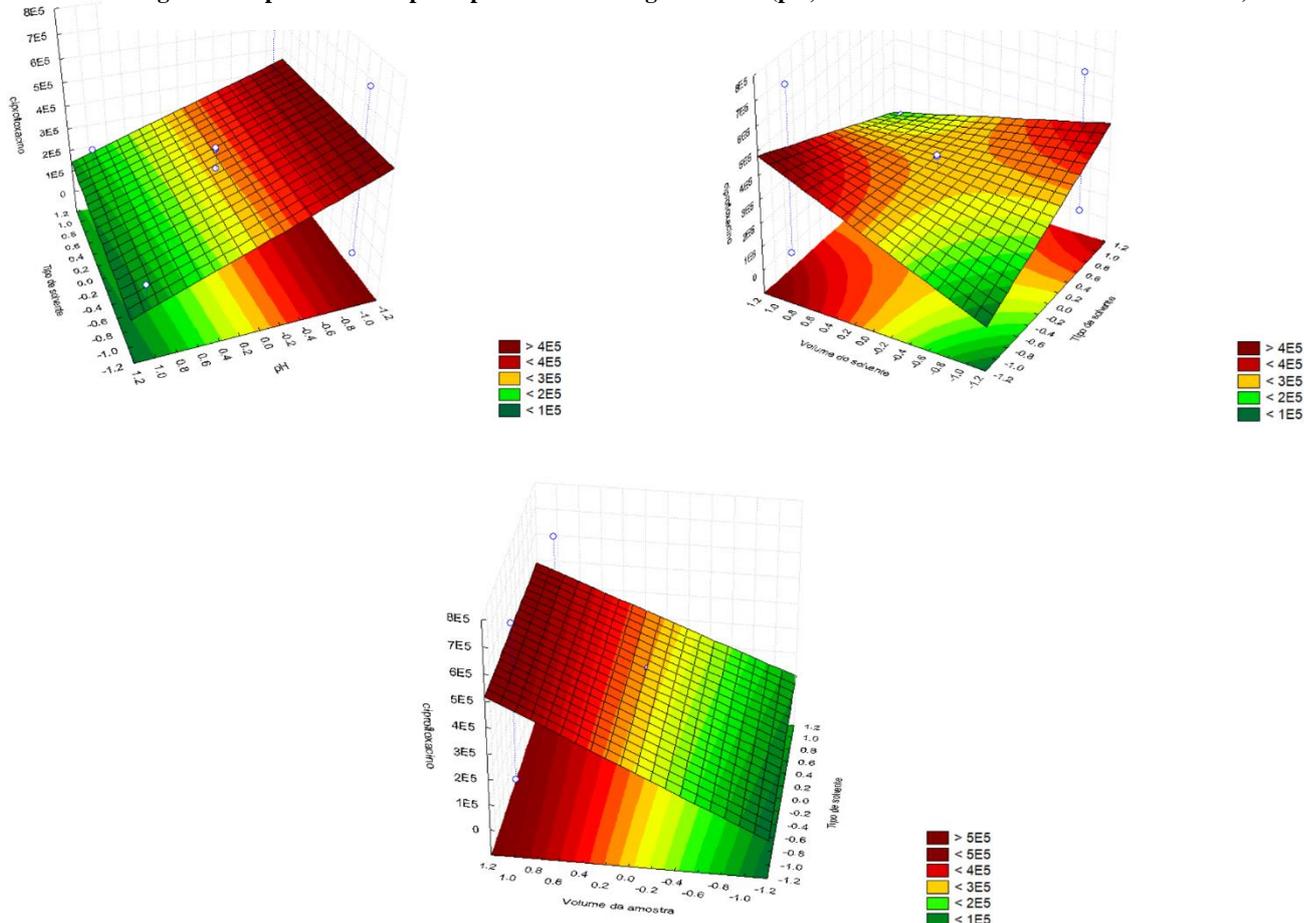
O modelo linear mostrou-se bem ajustado às respostas experimentais. O gráfico de valores preditos versus valores observados indicou que o modelo deixou resíduos baixos e aleatórios (Figura 3).

**Figura 3: Correlação entre valores preditos e valores observados no planejamento experimental**



Aplicando o gráfico de superfície foi possível avaliar a direção de máxima resposta para cada um dos fatores significativos. A região em vermelho escuro é onde está o máximo de resposta dentro do domínio experimental (Figura 3).

Figura 2: Superfície de resposta para os fatores significativos (pH, Volume de solvente e volume da amostra)



## Conclusões

O planejamento executado permitiu verificar que os fatores pH da amostra, volume da amostra e volume de solvente interferem de forma ativa no processo de extração do ciprofloxacino, por SPE, em água e devem ser avaliados com maior detalhamento a fim de estabelecer a melhor condição de extração do analito para análise em águas superficiais. O fator tipo do solvente não apresentou efeito significativo frente a extração, no entanto o maior resultado analítico foi obtido com o etanol, sendo, portanto, o solvente escolhido para a extração. Visando os princípios da química analítica verde, esse solvente será aplicado para otimização do processo de extração que indicará condição ótima para obtenção do ciprofloxacino residual presente em amostras reais de águas superficiais.

## Agradecimentos

Agradecemos à CAPES e a todos os colaboradores do Núcleo de Pesquisa e Análise de Medicamentos – NuPAM – UFBA.

## Referências

- AL-AHMAD, A. ; DASCHNER, F. D. ; KUMMERER, K. Biodegradability of Cefotiam , Ciprofloxacin , Meropenem , Penicillin G , and Sulfamethoxazole and Inhibition of Waste Water Bacteria. ARCHIVES OF Environmental Contamination and Toxicology, v. 37, p. 158–163, 1999.
- ANDRADE-EIROA, A. et al. Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I). TrAC - Trends in Analytical Chemistry Elsevier B.V., , 1 jun. 2016.
- ARSAND, J. B. et al. Presence of antibiotic resistance genes and its association with antibiotic occurrence in Dilúvio River in southern Brazil. Science of the Total Environment, v. 738, p. 139781, 2020.
- ASSIS, R. C. et al. Application of aqueous two-phase systems for the extraction of pharmaceutical compounds from water samples. Journal of Molecular Liquids, v. 301, p. 112411, 1 mar. 2020.
- BADAWY, M. E. I. et al. A review of the modern principles and applications of solid-phase extraction techniques in chromatographic analysis. Analytical Sciences Springer, , 1 dez. 2022.
- BORGES, R. M. et al. Uso de filtros de carvão ativado granular associado a microrganismos para remoção de fármacos no tratamento de água de abastecimento. Engenharia Sanitaria e Ambiental, v. 21, n. 4, p. 709–720, 2016.
- CARDOZA, L. A. et al. Factors affecting the fate of ciprofloxacin in aquatic field systems. Water, Air, and Soil Pollution, v. 161, n. 1–4, p. 383–398, 2005.
- EUROPEAN COMMISSION. DECISÃO DE EXECUÇÃO (UE) 2018/ 840 da Comissão de 5 de Junho de 2018. Jornal Oficial da União Europeia, 2018. Disponível em: <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32018D0840&from=EN>>
- FEITOSA-FELIZZOLA, J.; CHIRON, S. Occurrence and distribution of selected antibiotics in a small Mediterranean stream (Arc River, Southern France). Journal of Hydrology, v. 364, n. 1–2, p. 50–57, 15 jan. 2009.
- JARDIM, I. C. S. F. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. Scientia Chromatographica, v. 2, n. 1, p. 13–25, 2010.
- LANÇAS, F. M. Cromatografia Líquida Moderna: HPLC/CLAE. Átomo ed. Campinas, SP.
- LIMA, D. R. S. et al. Fármacos e desreguladores endócrinos em águas Brasileiras: Ocorrência e técnicas de remoção. Engenharia Sanitaria e Ambiental, v. 22, n. 6, p. 1043–1054, 2017.
- MAHMOOD, A. R.; AL-HAIDERI, H. H.; HASSAN, F. M. Detection of Antibiotics in Drinking Water Treatment Plants in Baghdad City, Iraq. Advances in Public Health, v. 2019, p. 1–10, 2019.
- MONTAGNER, C. C.; VIDAL, C.; ACAYABA, R. D. Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: Cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. Química Nova, v. 40, n. 9, p. 1094–1110, 2017.
- NAKATA, H. et al. Determination of fluoroquinolone antibiotics in wastewater effluents by liquid chromatography-mass spectrometry and fluorescence detection. Chemosphere, v. 58, n. 6, p. 759–766, 2005.



SAHLIN, S.; LARSSON, D. G. J.; ÅGERSTRAND, M. Ciprofloxacin EQS data overview. ACES report number 15. Department of Environ. Science and Analytical Chemistry, Stockholm University, 2018.

SARAFRAZ, M. et al. A global systematic, review-meta analysis and ecological risk assessment of ciprofloxacin in river water. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, p. 1–15, 2020.

TRAN, N. H. et al. Occurrence and risk assessment of multiple classes of antibiotics in urban canals and lakes in Hanoi, Vietnam. Science of the Total Environment, v. 692, p. 157–174, 20 nov. 2019.

WAGIL, M. et al. Development of sensitive and reliable LC-MS/MS methods for the determination of three fluoroquinolones in water and fish tissue samples and preliminary environmental risk assessment of their presence in two rivers in northern Poland. Science of the Total Environment, v. 493, p. 1006–1013, 5 set. 2014.

WATKINSON, A. J. et al. The occurrence of antibiotics in an urban watershed: From wastewater to drinking water. Science of the Total Environment, v. 407, n. 8, p. 2711–2723, 1 abr. 2009.